

Chức danh : Kỹ sư hạng III – Chuyên ngành Sinh học (K. XNDTYH)

Phòng xét nghiệm đạt chuẩn an toàn sinh học cấp 2 cần đạt những nội dung hoặc tiêu chí nào?

An toàn sinh học trong xét nghiệm là việc sử dụng các biện pháp để giảm thiểu hoặc loại trừ nguy cơ lây truyền tác nhân gây bệnh truyền nhiễm trong phòng xét nghiệm, từ phòng xét nghiệm ra môi trường và cộng đồng (theo Luật phòng, chống bệnh truyền nhiễm). Tác nhân gây bệnh truyền nhiễm cần được xác định nhóm nguy cơ, từ đó xác định được cấp độ an toàn sinh học phù hợp. Phòng xét nghiệm an toàn sinh học cấp 2 làm việc với nhóm vi sinh vật nhóm nguy cơ 2 (nhóm có nguy cơ lây nhiễm cho cá thể ở mức độ trung bình nhưng nguy cơ cho cộng đồng ở mức độ thấp bao gồm các loại vi sinh vật có khả năng gây bệnh nhưng ít gây bệnh cho người, có khả năng lây truyền sang người và có biện pháp phòng, chống lây nhiễm, điều trị hiệu quả trong trường hợp mắc bệnh). Phòng xét nghiệm đạt chuẩn an toàn sinh học cấp 2 cần đáp ứng các yêu cầu sau:

1. Cơ sở vật chất

- Diện tích tối thiểu 20m² (không bao gồm khu vực hành chính).
- Hệ thống cửa: cửa sổ, cửa đi có khuôn, có chốt, khóa an toàn. Cửa đi có phần lắp kính trong để quan sát bên trong PXN.

- Tường, trần, sàn nhà, hệ thống điện, nước, ánh sáng, phòng cháy, chữa cháy ... đạt theo tiêu chuẩn thiết kế PXN.

- Mặt bàn xét nghiệm không được sử dụng chất liệu gỗ, kính.

- Bồn nước rửa tay làm bằng chất liệu dễ cọ rửa, vòi nước có cần gạt, có ống chống trào ngược.

- Thiết bị rửa mắt khẩn cấp và hộp sơ cứu phải đặt vị trí thuận lợi sử dụng.

- Có hệ thống cấp nước sạch.

- Hệ thống biển cảnh báo tương ứng từng khu vực.

- Chỗ treo áo choàng PXN riêng biệt.

- Hệ thống xử lý nước thải đạt quy chuẩn quốc gia về môi trường (QCVN 28:2010)

2. Trang thiết bị

- Kê khai thiết bị xét nghiệm (lý lịch, nhãn dán thông tin, hướng dẫn sử dụng thiết bị)

- Dụng cụ chứa chất thải đúng quy định.

- Trang thiết bị bảo hộ cá nhân phù hợp.

- Có tủ ATSH cấp 2 và nôi hấp ướ

3. Nhân sự

- 2 nhân viên xét nghiệm trở lên, có bằng cấp, chứng chỉ đào tạo phù hợp, được tập huấn về ATSH cấp 2, được khám sức khỏe ban đầu và định kỳ.

- Có người phụ trách ATSH.

- Nhân viên được tập huấn về an toàn lao động, phòng cháy chữa cháy và được tiêm chủng hoặc dùng thuốc phòng bệnh liên quan các tác nhân gây bệnh.

4. Quy định thực hành

- Quy định chế độ báo cáo ATSH.

- Quy định về lưu trữ hồ sơ, kết quả XN (phân loại, thời gian, phương pháp, trách nhiệm và xử lý lưu trữ)

- Quy định ra vào PXN.

- Quy trình XN tương ứng mỗi kỹ thuật XN (trong đó có phần nội dung về ATSH).

- Quy trình khử nhiễm, xử lý chất thải, sử dụng tủ ATSH; lưu giữ, bảo quản, thải bỏ tác nhân gây bệnh truyền nhiễm.

5. Phòng ngừa và xử lý sự cố

- Đánh giá nguy cơ xảy ra sự cố định kỳ và khi cần thiết.

- Có kế hoạch phòng ngừa và xử lý sự cố ATSH.

- Đào tạo, tập huấn cho nhân viên về biện pháp phòng ngừa và xử lý sự cố.

- Có quy trình xử lý sự cố liên quan tác nhân gây bệnh truyền nhiễm sử dụng trong PXN; lưu hồ sơ và biện pháp xử lý sự cố ít nhất 3 năm.

Ưu và nhược điểm của phương pháp TRF trong xét nghiệm sàng lọc trước sinh là gì?

- Sàng lọc trước sinh (SLTS) là chương trình sàng lọc nguy cơ bất thường số lượng NST 13, 18, 21 và dị tật ống thần kinh cho thai dựa trên nghiệm phẩm là máu mẹ. Tùy theo tuổi thai, SLTS được thực hiện một trong hai loại sau:

+ Xét nghiệm Double test (thai 11 đến 13 tuần 6 ngày), xét nghiệm 2 chất PAPP và β HCG, kết hợp với độ mờ da gáy (NT) cho tỷ lệ phát hiện đến 90 %.

+ Xét nghiệm Triple test (thai 14 đến 20 tuần 6 ngày), xét nghiệm 3 chất AFP, β HCG và UE3, cho tỷ lệ phát hiện 65%.

- Tại khoa XNDTYH, xét nghiệm SLTS được thực hiện bằng hệ thống xét nghiệm miễn dịch tự động AutoDelfia 1235. Các thành phần sinh hóa PAPP, β HCG, UE3 và AFP có trong máu thai phụ được định lượng dựa trên nguyên lý miễn dịch huỳnh quang trì hoãn (**time - resolved fluorometry**). Trong đó, chất mục tiêu sẽ được nhận diện và giữ lại bởi kháng thể đặc hiệu đã được cố định trên pha rắn, các tạp chất sẽ bị rửa trôi sau quá trình rửa. Phức hợp kháng thể - kháng nguyên mục tiêu sẽ được tiếp tục bắt cặp với một kháng thể khác đã được đánh dấu phát huỳnh quang. Những kháng thể mang chất phát huỳnh quang không được bắt cặp với kháng nguyên mục tiêu sẽ bị rửa trôi sau quá trình rửa tiếp theo. Dựa trên cường độ phát huỳnh quang đo được có thể định lượng được nồng độ kháng nguyên mục tiêu có trong nghiệm phẩm.

- Hiện nay, có nhiều kỹ thuật xét nghiệm double test, triple test và phần mềm tính nguy cơ trong SLTS. Trong đó, kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trì hoãn trên hệ thống AutoDELFI A và tính toán nguy cơ bằng phần mềm LifeCycle được sử dụng rộng rãi nhất ở các nước phát triển, được tổ chức FMF ưu tiên sử dụng nhờ ưu điểm sau:

+ Sử dụng đặc tính của các kim loại hiếm (Lanthanine) để tạo phản ứng đặc hiệu, hạn chế tối đa sai lệch kết quả do tạp chất gây ra.

+ Xét nghiệm trên hệ thống khép kín và tự động hoàn toàn, yêu cầu đầy đủ mẫu chuẩn và mẫu chứng trong mỗi lần chạy máy, tránh được nguy cơ nhầm lẫn, sai sót và sai số do cố ý hoặc vô ý.

+ Kết quả được Tổ chức y học thai nhi (FMF) khuyến cáo hàng đầu sử dụng cho phần mềm tính nguy cơ FMF.

+ ~3-5h/lần chạy nên tiết kiệm thời gian đối với mục đích sàng lọc hàng loạt một số lượng lớn nghiệm phẩm.

+ Độ nhạy cực cao: Xác định đến phạm vi Femtogram với đối tượng có nồng độ thấp mà có thể bị bỏ sót bởi các phương pháp kém nhạy hơn.

+ Khoảng tuyến tính rộng: Khoảng tuyến tính (Dynamic Range) của công nghệ DELFIA cao gấp 2 lần so với ELISA.

+ Độ ổn định tuyệt hảo: Công nghệ DELFIA loại bỏ được những vấn đề liên quan đến Enzyme như độ phân rã hay mẫu nhiễm khuẩn.

- Tuy nhiên, kỹ thuật này còn tồn tại những nhược điểm sau:

+ Vì là hệ thống khép kín nên trong trường hợp khẩn cấp không thể bỏ thêm mẫu vào khi máy đang chạy.

+ Chỉ xem được kết quả khi hoàn tất việc chạy máy.

+ Giá thành cao hơn các kỹ thuật khác.

Tại sao lại xét nghiệm 17OH-P để sàng lọc và chẩn đoán tăng sản tuyến thượng thận

- Tuyến thượng thận là một cơ quan hình tam giác, nằm trên thận, sát với thành sau của khoang bụng.

- Tăng sản tuyến thượng thận bẩm sinh (TSTTTBS) là một bệnh nội tiết di truyền do đột biến gen nằm trên cánh ngắn của nhiễm sắc thể (NST) số 6, mã hóa tổng hợp các enzyme xúc tác quá trình tổng hợp cortisol và aldosteron từ cholesterol của vỏ thượng thận. Trên thế giới, tỷ lệ mắc bệnh là 1/14.000 và ở Việt Nam tỷ lệ này là 1/10.000. Bệnh TSTTTBS thường gặp nhất là do thiếu enzyme 21-OH (chiếm 90-95%).

- Tuyến thượng thận có vai trò trong việc tổng hợp hormon cortisol, aldosteron và testosterone từ nguyên liệu ban đầu là cholesterol. 17-hydroxyprogesteron (17OH-P) khi có sự xúc tác của enzyme 21 hydroxylase (enzyme 21-OH) sẽ chuyển hóa thành Cortisol. Khi thiếu hụt enzyme 21-OH sẽ dẫn đến giảm nồng độ của hai hormon Aldosteron và Cortisol trong cơ thể.

- Nồng độ cortisol giảm sẽ kích thích tuyến yên tăng sản xuất ACTH và làm cho các chất 17-OHP và progesterone tăng cao.

- Nồng độ 17-OHP tăng sẽ dẫn đến tăng tổng hợp testosterone làm cho nồng độ chất này tăng cao hơn rất nhiều so với trẻ bình thường. Giảm hormon cortisol, aldosteron và tăng hormon testosterone làm cho trẻ có các triệu chứng bệnh sau: lừ đừ, nôn ói, sụt cân, tụt huyết áp, thậm chí có thể tử vong do mất nước và rối loạn điện giải. Đồng thời, quá trình phát triển giới tính của bé gái sẽ bị nam hóa, ảnh hưởng đến khả năng sinh sản của trẻ khi trưởng thành.

- Bệnh tăng sản tuyến thượng thận bẩm sinh ở trẻ nguyên nhân do sự thiếu hụt enzyme 21-OH có thể được chẩn đoán gián tiếp qua nồng độ chất 17OH-P.

Để thực hiện tốt thao tác với chất lỏng bằng micromicropipet, người thực hiện cần lưu ý

Micropipet hay còn gọi là micromicropipette, micropipetman, micropipettor là một dụng cụ phòng thí nghiệm dùng để hút nhả chính xác một lượng chất lỏng có thể tích xác định. Việc sử dụng micromicropipet sẽ ảnh hưởng đến thành công và độ lặp lại của thí nghiệm. Độ chính xác của micropipet rất khác nhau, tùy thuộc vào hãng sản xuất, công nghệ sản xuất và thao tác của người sử dụng.

Các lưu ý khi sử dụng micromicropipet

1. Cách thức sử dụng micropipet

- Không sử dụng để hút lượng dung dịch ngoài khoảng giới hạn cho phép của micropipet. Hạn chế dùng micropipet thể tích lớn để hút một lượng nhỏ. Ví dụ, không nên dùng micropipet loại 100-1000 μl để hút 100 μl , thay vào đó nên dùng loại 10-100 μl để hút. Thể tích hút nên tiệm cận với giá trị trên là tốt nhất. Vì micropipet càng lớn thì sai số càng nhiều, khi đó nếu hút lượng nhỏ sẽ có sai số lớn.

- Thao tác với micropipet theo chiều thẳng đứng, nếu cầm nghiêng thì lượng chất lỏng hút vào sẽ không chính xác do ảnh hưởng của áp suất thủy tĩnh. Khi nhả chất lỏng, nên để đầu tip chạm vào thành của vật chứa sau đó kéo dần lên để tránh chất lỏng dính vào đầu tip sau khi nhả.

- Thả piston từ từ để tăng độ chính xác, thả quá nhanh hay dứt quãng sẽ gây nên bọt khí, hoặc văng bắn chất lỏng ra ngoài, gây nhiễm hay mất đi một lượng chất lỏng.

- Trong lúc đẩy chất lỏng ra khỏi đầu tip, nhấn piston đến điểm dừng thứ hai. Trong lúc hút chất lỏng, nhấn piston đến nấc dừng thứ nhất để hút lượng mẫu mong muốn và không được đẩy dịch ra khỏi tip. Nếu bạn bơm hút với một thể tích nhỏ (thường $\leq 10 \mu\text{l}$), bạn có thể tráng nhanh đầu tip bằng cách hút và đẩy dịch lỏng cần dùng nhiều lần.

- Độ nhúng sâu của micropipet nên khoảng 1-3 mm tính từ đầu tip đến bề mặt chất lỏng. Vì nếu quá sâu thì chất lỏng có thể bám vào tip và được chuyển vào cùng với lượng chất lỏng cần chuyển nên lượng chất lỏng được chuyển sẽ nhiều hơn. Còn nếu nhúng quá nông thì chất lỏng hút vào sẽ ít hơn do ảnh hưởng của không khí.

- Nên sử dụng tip có phân lọc để giảm thiểu nhiễm các hạt sol khí (aerosol) của dịch.

- Sử dụng cẩn thận khi bơm hút mẫu một thời gian dài. Bàn tay của bạn sẽ làm ấm micropipet và thay đổi thể tích bơm do sự giãn nở của các thành phần. Do đó giữa các lần hút nhả không nên cầm pipet trong bàn tay, quá trình nghỉ cần được thực hiện để cho phép các micropipet làm mát và giảm thiểu sự khó khăn khi vận hành.

2. Các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng hút chính xác của micropipette

- Đầu tip: tip không đảm bảo chất lượng sẽ ảnh hưởng lớn tới khả năng hút chính xác của pipet. Vì vậy yêu cầu tip phải sạch, mặt trong tip trơn nhẵn, đồng nhất, thẳng cạnh và không thấm nước.

- Độ nhớt chất lỏng: các micropipet dùng để hút các chất lỏng có độ nhớt cao như máu, huyết tương...phải là loại khác với dùng để hút nước.

- Nhiệt độ: là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến thể tích chất lỏng được phân phối do sự giãn nở vì nhiệt của các chất. Các loại micropipet được sản xuất thường áp dụng ở nhiệt độ từ 20 đến 25 độ C.

- Độ ẩm: độ ẩm thích hợp cho sử dụng micropipet trong khoảng 45 đến 75%. Độ ẩm có ảnh hưởng lớn đến khả năng hút chính xác của micropipet vì nếu độ ẩm thấp (<30%) thì tốc độ bay hơi tăng, còn nếu độ ẩm quá cao thì khả năng ngưng tụ chất lỏng tăng.

- Áp suất khí quyển: càng lên cao áp suất càng giảm, tuy nhiên nó chỉ ảnh hưởng nhỏ đến sự thay đổi tỉ trọng của chất lỏng nên sai số do áp suất khí quyển là không đáng kể và thường được bỏ qua.

Trong kỹ thuật karyotype máu, tại sao phải thực hiện bước sốc nhược trương và cần lưu ý những gì khi thực hiện bước này

- Xét nghiệm karyotype hay Lập bộ nhiễm sắc thể là xét nghiệm khảo sát bộ nhiễm sắc thể bao gồm các đặc điểm về kích thước, hình dáng, số lượng và cấu trúc bộ nhiễm sắc thể (NST) trong một mẫu tế bào.

- Xét nghiệm karyotype máu được chỉ định để chẩn đoán các rối loạn NST cho những đối tượng nghi ngờ bị mắc các hội chứng di truyền, dị tật bẩm sinh, chậm phát triển tâm thần, vô sinh – hiếm muộn, vô kinh, xác định giới tính, những cặp vợ chồng có tiền căn thai lưu / sảy thai liên tiếp / sinh con dị tật bẩm sinh,...

- Ở XN karyotype máu, NST được khảo sát dựa trên việc nuôi cấy tế bào máu ngoại vi hoặc máu cuống rốn trong môi trường chuyên biệt. Sau thời gian thích hợp, colchicine được sử dụng để làm ngừng quá trình phân bào ở kỳ giữa nguyên phân. Sau đó, các tế bào được thu hoạch, nhỏ lame, nhuộm bằng các loại thuốc nhuộm thích hợp và quan sát dưới kính hiển vi (độ phóng đại 1000 lần), các cụm NST được chụp ảnh và được sử dụng để lập karyotype hoàn chỉnh nhờ phần mềm chuyên dụng. Khi đó, những bất thường về kích thước, hình dáng, số lượng và cấu trúc của bộ nhiễm sắc thể sẽ được phát hiện.

- XN này bao gồm nhiều bước, mỗi giai đoạn đều có vai trò quan trọng, quyết định đến chất lượng, kết quả của xét nghiệm. Trong đó, giai đoạn sốc nhược trương là giai đoạn đóng vai trò quan trọng, và cần lưu ý nhất. Đây là bước sử dụng **dung dịch nhược trương** cho vào cặn tế bào sau nuôi cấy, giúp làm tế bào lympho trương phồng, các nhiễm sắc thể ở kỳ giữa sẽ phân tán, không xếp chồng lên nhau, đồng thời các tế bào hồng cầu sẽ bị phá vỡ và giải phóng các thành phần nội bào (do đó sau giai đoạn sốc nhược trương, dung dịch sau ly tâm sẽ có màu đỏ sẫm).

- Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến thành công của giai đoạn này. Trong đó ảnh hưởng lớn nhất là nồng độ của dung dịch sử dụng sốc nhược trương. Hiện nay qui trình kỹ thuật sử dụng dung dịch nồng độ là KCl 0.075M. Để đảm bảo dung dịch sử dụng là đúng nồng độ, người thực hiện xét nghiệm cần lưu ý ngay từ lúc chuẩn bị hóa chất, bao gồm hạn sử dụng của hóa chất, chất lượng của hóa chất, độ tinh sạch của nước cất sử dụng để pha dung dịch sốc nhược trương, qui trình sử dụng cân phân tích. Ngoài ra, khi sử dụng người thực hiện cần lưu ý thêm nhiều yếu tố khác như: đảm bảo lượng dung dịch được thêm vào mỗi ống nghiệm chứa cặn tế bào phù hợp, cặn tế bào được hòa trộn đều, tiếp xúc đều với dung dịch sốc nhược trương. Cũng cần đảm bảo đủ thời gian của giai đoạn sốc nhược trương (30 phút) sao cho tế bào căng phồng đến mức độ vừa đủ để có thể thực hiện các giai đoạn tiếp theo, vì nếu sốc nhược trương quá mức, các tế bào sẽ vỡ sớm, nhiễm sắc thể sẽ phân tán khắp trong dung dịch, làm cho nhiễm sắc thể không tập trung thành từng cụm trên tiêu bản. Ngược lại, sốc nhược trương không đủ sẽ dẫn đến các nhiễm sắc thể chồng chéo lên nhau, gây khó khăn hoặc không thể phân tích bộ nhiễm sắc thể. Trong suốt quá trình ủ trong bể ổn nhiệt, cần lưu ý về nhiệt độ của bể và tốc độ lắc, điều này làm tối ưu hiệu quả sốc nhược trương, đảm bảo các tế bào được xử lý đồng đều nhau.

- Xét nghiệm karyotype máu trải qua nhiều bước thực hiện, sai sót ở một giai đoạn bất kỳ nào cũng có thể ảnh hưởng lớn đến kết quả của xét nghiệm, do đó người thực hiện kỹ thuật cần cẩn thận và thực hiện đúng quy trình, trau dồi kỹ năng trong từng giai đoạn, đảm bảo tính chính xác của từng kết quả xét nghiệm.

Làm thế nào để xử lý nhiễm chéo DNA trong phòng thí nghiệm sinh học phân tử

PCR là một kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Tuy nhiên, với khả năng khuếch đại từ một lượng khuôn mẫu nhỏ thành một lượng sản phẩm khổng lồ sau một số chu kỳ nhất định nên chỉ cần một lượng DNA rất nhỏ bị nhiễm có thể gây nên dương tính giả hoặc làm sai lệch kết quả xét nghiệm.

Vì vậy, ngay khi nghi ngờ có sự nhiễm chéo DNA trong phòng thí nghiệm sinh học phân tử, cần thực hiện ngay các biện pháp xử lý nhiễm chéo.

- Trước tiên, cần nhận diện được nguồn gây nhiễm. Nguồn gây nhiễm có thể là sản phẩm của quá trình PCR, DNA từ mẫu ly trích khác, hóa chất sử dụng, vật tư tiêu hao, thiết bị, quần áo, chất thải...

- Đối với nguồn gây nhiễm là từ hóa chất sử dụng, có thể xác định thành phần hóa chất bị nhiễm bằng cách thiết lập các phản ứng âm với các thành phần khác biệt rõ không bị nhiễm, sau đó thêm thành phần nghi ngờ bị nhiễm vào. Nếu sau phản ứng có sản phẩm được khuếch đại chứng tỏ thành phần hóa chất được thêm vào bị nhiễm. Cần loại bỏ ngay hóa chất bị nhiễm và thay thế bằng lô hóa chất mới khi sử dụng cho các phản ứng tiếp theo.

- Vệ sinh các loại pipet bằng khăn giấy với cồn 70 độ, nếu có chất lỏng bị hút vào bên trong pipet, liên hệ với nhà sản xuất để được hướng dẫn xử lý. Các loại vật dụng khác (rack, dụng cụ nghiền mẫu...) được xử lý bằng cách ngâm trong NaOCl 15% từ 15 phút đến 1 giờ, thời gian xử lý tùy thuộc vào đối tượng, ví dụ như vật dụng kim loại ngâm lâu sẽ bị ăn mòn. Sau đó ngâm vật dụng trong nước cất ít nhất 2 giờ, lặp lại 2 lần, sau đó lau sạch nước và để khô tự nhiên.

- Với máy móc, thiết bị, cũng tiến hành lau bề mặt với NaOCl 15%, để khô, sau đó lau lại bằng cồn 70 độ, để khô, tiếp tục chiếu UV trong 30 phút.

- Ngoài ra, cần vệ sinh các bề mặt sàn, tường, mặt bàn thí nghiệm bằng NaOCl 15%, sau đó lau lại bằng nước sạch, để khô và chiếu UV trong 30 phút. Ngâm giặt quần áo mặc trong phòng thí nghiệm với chất tẩy rửa, loại bỏ các chất thải trong phòng thí nghiệm.

- Sau quá trình vệ sinh các máy móc, thiết bị và môi trường phòng thí nghiệm, loại bỏ các nguồn lây nhiễm nghi ngờ, cần kiểm tra lại bằng cách thực hiện một số phản ứng PCR không chứa DNA khuôn mẫu để chắc chắn hiện tượng nhiễm chéo được loại bỏ.

- Khi xảy ra nhiễm chéo DNA trong phòng thí nghiệm sinh học phân tử, việc xử lý để loại nhiễm gây tốn nhiều thời gian, công sức và hóa chất, do đó để tránh xảy ra nhiễm, mỗi người thực hiện thao tác tại các phòng thí nghiệm sinh học phân tử cần tuyệt đối tuân thủ các quy định về an toàn, vệ sinh và phòng chống nhiễm chéo DNA.

Tại sao phải làm già (aging) tiêu bản nhuộm sắc thể (NST) trước khi nhuộm GTG

Xét nghiệm karyotype là xét nghiệm lập bộ NST để khảo sát cấu trúc và số lượng bộ nhiễm sắc thể. Xét nghiệm này thường được chỉ định cho các cặp vợ chồng vô sinh - hiếm muộn, sảy thai liên tiếp, tiền căn có con hoặc thai bị dị tật bẩm sinh; các trường hợp bị dị tật bẩm sinh, chậm phát triển tâm thần, trí tuệ, vận động, ...; hoặc thai có siêu âm bất thường.

Quy trình kỹ thuật karyotype gồm các bước sau:

- Nuôi cấy tế bào bằng môi trường có thành phần dinh dưỡng đặc biệt
- Dùng phân bào bằng demecolcine để thu NST ở kỳ giữa, sốc nhuộm trương tế bào và cố định NST bằng dung dịch Carnoy
- Nhỏ lame, cố định NST trên tiêu bản
- Làm già tiêu bản NST, nhuộm GTG
- Chụp hình và phân tích bộ NST

Bộ NST người gồm có 46 chiếc gồm 44 NST thường và 2 NST giới tính, các NST thường được phân chia thành 7 nhóm: A, B, C, D, E, F, G dựa theo kích thước và vị trí tâm động.

Để có thể dễ dàng khảo sát cấu trúc NST, các tiêu bản lame được xử lý bằng enzyme sau đó nhuộm bằng thuốc nhuộm để có các băng đặc trưng cho từng NST. Có nhiều kỹ thuật nhuộm khác nhau, nhưng kỹ thuật nhuộm băng G (GTG, Giemsa – Trypsin – Gbanding) được sử dụng phổ biến nhất vì thao tác dễ dàng, hóa chất ít độc hại, NST sau nhuộm dễ phân tích và tiêu bản có thể lưu trữ

được lâu. Trong kỹ thuật nhuộm GTG các băng tối là đoạn DNA giàu A, T (ngược lại với băng R), băng sáng là những đoạn giàu G, C.

Quy trình nhuộm GTG như sau:

- Làm già (aging) tiêu bản lame
- Xử lý tiêu bản lame bằng trypsin 0,05%
- Nhuộm tiêu bản đã xử lý bằng Giemsa

Phần khó nhất của kỹ thuật nhuộm GTG là chọn được thời gian xử lý tiêu bản lame bằng trypsin tối ưu nhất. Nếu thời gian xử lý quá dài, NST sẽ bị cắt nát và không còn rõ hình dạng, nếu thời gian xử lý không đủ, NST sẽ không có băng rõ ràng và khó phân tích. Các phần trên cùng một tiêu bản lame hoặc giữa các tiêu bản lame trong cùng một đợt sẽ có độ ẩm khác nhau, điều này cũng gây khó khăn cho việc xử lý trypsin.

Vì vậy, trước khi nhuộm GTG các tiêu bản lame được làm già (aging) bằng 1 trong các phương pháp sau:

- Sấy ở 60°C qua đêm
- Sấy ở 80°C trong 1 giờ
- Để ở nhiệt độ phòng trong 5 – 7 ngày

Mục đích của bước làm già lame là dùng nhiệt độ làm giảm độ ẩm của các tiêu bản lame, khiến các tiêu bản có độ ẩm đồng đều, giúp NST không bị nhòe khi xử lý trypsin làm tăng độ sắc nét của băng NST khi nhuộm GTG.

Các thành phần cơ bản của phản ứng nhân chuỗi DNA (PCR) và vai trò của chúng

Phản ứng nhân chuỗi DNA (Polymerase Chain Reaction, viết tắt: PCR), còn gọi là "phản ứng khuếch đại gen", do Karl Mullis và cộng sự phát minh năm 1985. Đây là một kỹ thuật phổ biến trong sinh học phân tử nhằm khuếch đại (tạo ra nhiều bản sao) một đoạn DNA nhờ enzyme DNA polymerase mà không cần sử dụng các sinh vật sống như E. coli hay nấm men. PCR được sử dụng trong các nghiên cứu sinh học và y học phục vụ nhiều mục đích khác nhau, như phát hiện các bệnh di truyền, nhận dạng, chẩn đoán những bệnh nhiễm trùng, tách dòng gene, và xác định huyết thống.

PCR là một chuỗi phản ứng nhiều chu kỳ nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ gồm ba bước:

- Biến tính: tách chuỗi DNA từ dạng mạch đôi thành mạch đơn
- Bắt cặp mồi: gắn cặp mồi đặc hiệu theo nguyên tắc bổ sung
- Kéo dài: tổng hợp chuỗi DNA mới giống chuỗi DNA gốc

Một chu kỳ ba bước trên sẽ được lặp đi lặp lại nhiều lần, sau mỗi lần lại làm tăng gấp đôi lượng mẫu của lần trước.

Một phản ứng PCR cần có các thành phần như sau:

1. Nước

Nước sử dụng cho phản ứng PCR phải thật tinh khiết, không chứa ion nào, không chứa DNAase, RNAase, enzyme cắt giới hạn... Nói cách khác là không chứa bất kỳ một thành phần nào khác.

2. Dung dịch đệm cho phản ứng PCR

Dung dịch đệm cho PCR là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chất lượng phản ứng PCR.

Thành phần dung dịch đệm của phản ứng PCR thường phụ thuộc vào loại enzyme DNA polymerase sử dụng trong PCR, thường chứa muối đệm Tris HCl 10 mM, KCl 50mM và MgCl₂ 1.5mM. Trong các thành phần trên, nồng độ của Mg²⁺ là nhân tố ảnh hưởng lớn đến quá trình PCR. Nồng độ tối ưu từ 0,5 đến 2,5 mM. Chính ion Mg²⁺ gắn liên kết dNTP với DNA polymerase, tăng khả năng bám nối của mồi. Nồng độ MgCl₂ cao sẽ tạo nhiều sản phẩm không đặc hiệu, nồng độ MgCl₂ quá thấp sẽ không tạo sản phẩm PCR.

3. dNTP (deoxy nucleoside triphosphate)

Là đơn vị để có thể tổng hợp được các bản sao của DNA đích. dNTP có cấu tạo gồm một đường deoxyribose có gắn một base, có thể là Adenine (dATP) hay Thymine (dTTP) hay Cytosine (dCTP) hay Guanine (dGTP), ở carbone số 1 (C1). Ba phân tử phosphate (triphosphate) được gắn tại carbone

số 5 (C5) của phân tử deoxyribose này và đây chính là nơi mà dNTP gắn vào đầu 3' của chuỗi bổ sung trên chuỗi DNA đích. Năng lượng để cho phản ứng này xảy ra được lấy từ các nối phosphate giàu năng lượng của triphosphate trên dNTP. Đó cũng chính là lý do tại sao phải là dNTP chứ không phải là dNDP (diphosphate) hay dNMP (monophosphate).

4 loại nucleotide dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), thường được sử dụng ở nồng độ 20 – 200 microM đối với mỗi loại. Nồng độ cao hơn sẽ dễ tạo các sản phẩm phụ, nồng độ các loại nucleotide không đều sẽ làm tăng các lỗi sao chép của polymerase.

4. *Mồi (primer)*

Mồi là những đoạn DNA sợi đơn ngắn dài khoảng 20-30 bases có trình tự bổ sung với hai đầu của đoạn DNA và cần thiết cho việc xúc tiến phản ứng dây chuyền tổng hợp DNA. Chúng nhận ra phần DNA cần được nhân lên, bắt cặp bổ sung với một đầu của DNA mẫu và tạo ra vị trí bắt đầu tái bản. Các mồi này có chiều ngược nhau, bao gồm một mồi xuôi (forward primer) và một mồi ngược (reverse primer).

Mồi là yếu tố quan trọng nhất của phản ứng PCR, quyết định tính đặc hiệu của phản ứng

Trong thử nghiệm PCR, đoạn mồi có hai vai trò chính: (1) Quyết định nên tính đặc hiệu của thử nghiệm, vì nếu đoạn mồi được chọn càng đặc hiệu cho chuỗi đích, nghĩa là chỉ có thể bắt cặp trên chuỗi đích mà không thể bắt cặp được trên các chuỗi DNA khác ngoài chuỗi đích, thì sản phẩm PCR càng đặc hiệu và thử nghiệm PCR càng đặc hiệu. (2) Khởi động enzyme DNA polymerase vì enzyme DNA polymerase chỉ có thể bắt đầu tổng hợp sợi bổ sung cho chuỗi DNA đích một khi nó nhận dạng được đầu 3' (là đầu mà nó xúc tác cho một dNTP được gắn vào) đang ở tình trạng sợi đôi.

5. *Enzyme DNA polymerase*

Kết quả của phản ứng PCR phụ thuộc vào khả năng chịu nhiệt của enzyme polymerase là enzyme xúc tác cho quá trình lắp ráp các nucleotide dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) vào mạch DNA mới tổng hợp.

Theo quy trình PCR gốc của Mullis, enzyme phản ứng nhân bản DNA được thực hiện trong ống nghiệm (in vitro). Sợi DNA đôi bị tách thành 2 sợi đơn khi đun nóng ở 96°C. Tuy nhiên, ở nhiệt độ này DNA polymerase bị phá hủy vì vậy cần bổ sung enzyme sau mỗi giai đoạn nung nóng của mỗi chu kỳ. Sau đó, quy trình gốc này được phát triển bằng cách dùng DNA polymerase lấy từ vi khuẩn ưa nhiệt sống trong mạch nước phun ở nhiệt độ trên 110°C. DNA polymerase từ sinh vật này ổn định ở nhiệt độ cao và khi dùng trong PCR nó không bị phá vỡ khi hỗn hợp được nung nóng để tách sợi DNA. Từ đó, quá trình sao chép DNA có thể đơn giản và tự động hơn.

Một trong những DNA polymerase chịu nhiệt đầu tiên được phân lập được từ *Thermus aquaticus* và được gọi là Taq.

6. *DNA mẫu (DNA template)*

Là mẫu DNA mà chúng ta sẽ khuếch đại. Có thể là DNA kép, đơn, hoặc RNA được tách chiết từ các đối tượng nghiên cứu. DNA mẫu cần có độ nguyên vẹn cao tránh lẫn tạp chất, DNA còn nhiều tạp chất có thể ức chế phản ứng, nồng độ DNA quá cao có thể tạo ra các sản phẩm phụ không mong muốn.

Phản ứng PCR tối ưu xảy ra khi mẫu DNA không được dài quá, thường khuếch đại tốt nhất đối với đoạn DNA dài khoảng 1-1,5kb.

Mẫu DNA tinh sạch sẽ cho kết quả tốt, tuy nhiên kỹ thuật chuẩn đoán bằng phương pháp này vẫn đạt kết quả tốt trong trường hợp mẫu DNA không có độ tinh sạch cao, như vết máu khô, những mẫu vật khảo cổ. Phương pháp này cho phép xác định DNA với một lượng thấp, khoảng 100 ng.

Quy trình xử lý tràn đổ nghiệm phẩm sinh học cấp II

An toàn sinh học (ATSH) phòng xét nghiệm (PXN) là thuật ngữ được sử dụng để mô tả những nguyên tắc, kỹ thuật và thực hành cần thiết để ngăn ngừa những phơi nhiễm không mong muốn hoặc làm thất thoát tác nhân gây bệnh (TNGB) và độc tố. Việc xác định một cấp độ ATSH cho một PXN cần quan tâm đến loại vi sinh vật được xét nghiệm, thiết bị sẵn có cũng như các tiêu chuẩn thực hành và các quy trình cần thiết để tiến hành công việc trong PXN một cách an toàn. Các đơn

vị dịch vụ chăm sóc sức khỏe ban đầu, cơ sở chẩn đoán, nghiên cứu thường nằm ở mức độ ATSH cấp II.

Người làm việc trong PXN ATSH cấp II luôn phải đối mặt với nguy cơ bị lây nhiễm tác nhân gây bệnh liên quan đến việc không đảm bảo an toàn sinh học trong PXN trong đó có nguy cơ do tràn đổ nghiệm phẩm sinh học cấp II.

Nghiệm phẩm sinh học cấp II là nhóm nghiệm phẩm có nguy cơ lây nhiễm cho cá thể ở mức độ trung bình nhưng nguy cơ lây nhiễm cho cộng đồng ở mức thấp bao gồm các loại vi sinh vật có khả năng gây bệnh nhưng ít gây bệnh nặng cho người, có khả năng lây truyền sang người và có biện pháp phòng, chống lây nhiễm, điều trị hiệu quả trong trường hợp mắc bệnh. Ví dụ như: virus viêm gan A, B, C; virus sởi; vi khuẩn tả; ...

Để đảm bảo ngăn ngừa phơi nhiễm cho với nhân viên PXN hoặc làm thất thoát TNGB và độc tố ra môi trường, khi xảy ra sự cố tràn đổ nghiệm phẩm sinh học cấp II, tùy theo vị trí xảy ra tràn đổ cần phải xử lý theo một trong các quy trình sau:

1. Sự cố làm đổ dung dịch chứa TNGB trong tủ an toàn sinh học

Phải có hộp đựng cụ xử lý đánh đổ dung dịch có chứa TNGB: dung dịch khử nhiễm, giấy thấm, panh, kẹp, túi đựng chất thải lây nhiễm, trang bị bảo hộ cá nhân phù hợp. Các dụng cụ này phải làm bằng các vật liệu không bị ăn mòn bởi các hóa chất trong PXN.

Khi đánh đổ dung dịch chứa TNGB trong tủ ATSH, người làm xét nghiệm không được tắt tủ và tiến hành các bước sau:

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

2. Sự cố đổ dung dịch chứa tác nhân gây bệnh lên sàn nhà hoặc bàn xét nghiệm

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

- Ngay lập tức cảnh báo cho đồng nghiệp đang làm việc trong cùng PXN;
- Thay găng tay sạch và quần áo bảo hộ (nếu dung dịch chứa tác nhân gây bệnh bắn lên quần áo), bao giày, đeo kính;
- Lấy bộ dụng cụ xử lý sự cố đổ mẫu bệnh phẩm;
- Nhặt các vật sắc nhọn nếu có bằng kẹp;
- Phủ giấy thấm lên toàn bộ bề mặt có dung dịch bị đổ theo trình tự từ ngoài vào trong;
- Đổ hóa chất khử trùng (dung dịch Bleach pha loãng 10 lần hoặc NaClO 0,5%) lên chỗ đã được phủ giấy thấm theo chiều từ ngoài vào trong;
- Đợi 30 phút cho chất khử trùng phát huy tác dụng diệt khuẩn;
- Thay găng tay mới;
- Lau sạch vùng bị đổ bằng khăn/giấy thấm và cho khăn/ giấy thấm và tất cả các vật dụng lây nhiễm cho vào túi đựng chất thải lây nhiễm để tiệt trùng;
- Khăn/ giấy thấm và vật sắc nhọn (nếu có) được xử lý theo hướng dẫn xử lý chất thải lây nhiễm;

- Kết thúc quá trình xử lý;
- Sau khi kết thúc quá trình xét nghiệm, ra ngoài, ghi chép và báo cáo người phụ trách PXN về sự cố và các biện pháp xử lý đã được tiến hành.

3. Sự cố đánh đổ dung dịch chứa TNGB lây nhiễm qua đường hô hấp bên ngoài tủ ATSH

- Nín thở và rời khỏi phòng ngay lập tức;
- Báo đồng nghiệp làm trong phòng (nếu có) rời khỏi phòng xét nghiệm và đóng cửa lại;
- Đặt dấu hiệu cảnh báo những người xung quanh ở cửa ra, vào;
- Cởi bỏ quần áo bảo hộ, găng tay, khẩu trang... và cho vào túi, thùng thích hợp để mang đi khử nhiễm bằng nồi hấp tiệt trùng;
- Rửa tay, mặt và những phần trên cơ thể có khả năng bị phơi nhiễm;
- Đợi 30 phút để khí dung tạo ra do đánh đổ lắng xuống hoặc trao đổi ra ngoài PXN;
- Thực hiện theo các bước của quy trình xử lý sự cố đối với TNGB không lây nhiễm qua đường hô hấp

Làm thế nào để phòng chống nhiễm chéo DNA trong phòng thí nghiệm sinh học phân tử

PCR có khả năng khuếch đại từ một phân tử thành một lượng sản phẩm khổng lồ sau một số chu kỳ nhất định, nên nếu nhiễm một lượng vết DNA thì với khả năng khuếch đại tuyệt vời này, chính DNA nhiễm có thể trở thành khuôn mẫu cho PCR và kết quả là một sản phẩm đích không mong muốn được khuếch đại (dương tính giả). Các nguồn có thể gây nhiễm DNA là khu vực bàn làm việc, trang thiết bị máy móc, các loại pipette nhiễm DNA từ những lần làm thử nghiệm trước, nhiễm sản phẩm của lần khuếch đại trước hay nhiễm chéo DNA giữa các mẫu. Để tránh nhiễm và làm giảm tỷ lệ dương tính giả, cần tuân thủ các nguyên tắc phòng thí nghiệm như sau:

1. Trang thiết bị phòng thí nghiệm

- Ít nhất phải tách biệt được các khu vực làm việc trước PCR, PCR, và sau PCR, các khu vực này được bố trí theo luồng một chiều;
- Nếu có thể, nên làm PCR trong hốt sinh học phân tử có trang bị đèn tím, máy ly tâm nhẹ (máy spin down) và găng tay dùng một lần chuyên dụng cho sinh học phân tử. Không nên sử dụng bộ pipette cho sinh học phân tử chung với các loại thử nghiệm khác, pipette cho chứng dương phải riêng biệt, và luôn dùng các loại đầu côn lọc vô trùng.

2. Xử lý mẫu và kỹ thuật thao tác

- Luôn tuân thủ các kỹ thuật vô trùng, đi găng tay mới khi làm việc ở khu vực PCR và tuyệt đối tránh tạo bọt khí;
- Khi chuẩn bị sinh phẩm, hóa chất, luôn sử dụng dụng cụ thủy tinh hay nhựa mới và/hoặc vô trùng, và trước đây chưa bao giờ được sử dụng để tách chiết DNA. Sấy ướt mọi sinh phẩm và dung dịch không ảnh hưởng đến phản ứng, trừ môi, các dNTP, và Taq Sinh phẩm
- Dung dịch dùng cho PCR cần được chia thành một lượng nhỏ và bảo quản riêng biệt, không dùng chung với các loại kỹ thuật khác;
- Mỗi phản ứng luôn kèm các chứng gồm chứng âm (có đầy đủ các thành phần của phản ứng nhưng không có mặt khuôn mẫu), các chứng dương (lý tưởng nên có chứng dương tính vừa và dương tính yếu để kiểm soát hiệu quả khuếch đại của phản ứng). Khi cần xác định sự có mặt của chất ức chế trong mẫu bệnh phẩm thì cho vào chứng dương tính yếu một lượng dư mẫu bệnh phẩm hoặc dùng kỹ thuật đồng khuếch đại chứng dương bằng cách thay thế một khu vực nào đó trong sản phẩm PCR gốc bằng một trình tự đã biết và thêm sản phẩm biến đổi này vào các tube bệnh phẩm cần xét nghiệm, sau đó dùng đầu dò đặc hiệu với trình tự đã biết để phát hiện sản phẩm biến đổi và nếu trong mẫu bệnh phẩm không có mặt các chất ức chế thì phản ứng sẽ có kết quả dương tính.

3. Loại nhiễm bằng UNG

Một trong số các nguồn dễ gây nhiễm nhất cho PCR là sản phẩm PCR của chính những lần khuếch đại trước nên có thể sử dụng enzyme Uracil DNA Glycosylase (UNG) để phá hủy các sản phẩm này bằng cơ chế enzyme và hóa học nhưng không phá hủy DNA tự nhiên (khuôn mẫu hay đoạn môi). UNG xúc tác quá trình loại bỏ uracil khỏi DNA sợi đơn hoặc kép được tổng hợp từ

dUTP – một trong 3 loại nucleotide của PCR. Dưới tác dụng của UNG, các vị trí kiềm được hình thành và trong điều kiện nhiệt độ cao, pH kiềm, các vị trí kiềm này sẽ bị phân cắt.