| | | |
|---|---|---|
| | TRUNG TÂM Y TẾ HOÀNG MAI<br>**KHOA CẬN LÂM SÀNG**<br><br>**PHÒNG XÉT NGHIỆM** | Mã số: **HM-QTKT.VS.08.01**<br>Lần ban hành: 01<br>Ngày ban hành: 22/8/2023<br>Số trang: 6 |
| | **QUY TRÌNH KĨ THUẬT<br>TÌM AFB TRỰC TIẾP NHUỘM ZIEHL- NEELSEN** | |

| | **Người biên soạn** | **Người kiểm tra** | **Người phê duyệt** |
|---|---|---|---|
| **Họ và tên** | CN. Chu Thị Hòa | BS.Nguyễn Đức Thương | BS. Lê Đăng Luận |
| **Ký tên** | | | |
| **Chức vụ** | KTV Trưởng CLS | Trưởng Khoa CLS | Phó Giám Đốc |

## THEO DÕI SỬA ĐỔI TÀI LIỆU

| TT | Vị trí | Nội dung sửa đổi | Người sửa | Ngày sửa |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

# QUY TRÌNH KĨ THUẬT
# Tìm AFB trực tiếp nhuộm Ziehl- Neelsen

## I. MỤC ĐÍCH

Phát hiện các trực khuẩn bền vững với acid (AFB - acid fast bacillus) thuộc chi *Mycobacterium*.

## II. PHẠM VI ÁP DỤNG

Áp dụng tại Phong xét nghiệm Vi sinh – Trung Tâm Y Tế Hoàng Mai

## III. TRÁCH NHIỆM

- Người thực hiện: Cán bộ xét nghiệm đã được đào tạo và có chứng chỉ hoặc chứng nhận về chuyên ngành Vi sinh.

- Người nhận định và phê duyệt kết quả: Cán bộ xét nghiệm có trình độ đại học hoặc sau đại học về chuyên ngành Vi sinh.

- Cán bộ QLCL, tổ trưởng chuyên môn chịu trách nhiệm giám sát việc tuân thủ quy trình

## IV. ĐỊNH NGHĨA, THUẬT NGỮ, CHỮ VIẾT TẮT

| | |
|---|---|
| HD: | Hướng dẫn |
| QLCL: | Quản lý chất lượng |
| QTKT: | Quy trình kỹ thuật |
| VK: | Vi khuẩn |
| VS: | Vi sinh |

## V. NGUYÊN LÝ

Do đặc tính kháng acid của AFB nên khi được nhuộm bằng phương pháp Ziehl-Neelsen và soi dưới kính hiển vi quang học, hình ảnh của AFB sẽ có màu đỏ, các vi khuẩn và các tế bào (nếu có) không có đặc tính kháng acid sẽ có màu xanh.

## VI. TRANG THIẾT BỊ VÀ VẬT TƯ

### *6.1. Trang thiết bị*

- Kính hiển vi
- Tủ an toàn sinh học cấp 2
- Đồng hồ bấm giờ
- Dụng cụ sấy lam (nếu có)

### *6.2. Dụng cụ hóa chất, vật tư tiêu hao*

Dung dịch fuchsin 0,3%

Dung dịch cồn tẩy HCL 3%

Dung dịch xanh methylen 0,3%

Cồn 96°(vệ sinh dụng cụ và ngâm lam)

Dung dịch khử khuẩn ngâm que phết đờm

Cồn sát trùng tay nhanh

Dung dịch nước rửa tay

Lọ/cốc/ tuýp lấy bệnh phẩm

Que cấy

Lam kính

Que phết đờm

Dầu soi kính

Giấy lau kính

Bông

Đèn cồn

Panh

Khay đựng bệnh phẩm

Hộp vận chuyển bệnh phẩm

Hộp lưu tiêu bản

Bô can (bình chứa) vật nhiễm

Mũ

Khẩu trang

Găng tay

Găng tay xử lý dụng cụ

Quần áo bảo hộ

Khăn lau tay

Túi chứa rác thải lây nhiễm

Khăn giấy vệ sinh các bàn làm việc

Bút viết kính

Bút bi

Bật lửa

Sổ nhận bệnh phẩm

Sổ lưu kết quả xét nghiệm

Sổ bàn giao kết quả xét nghiệm

Giấy trả kết quả xét nghiệm

***6.3. Mẫu bệnh phẩm***

Đờm, dịch phế quản, phân, mủ, dịch não tủy, các loại dịch khác, …

**VII. NỘI DUNG**

***7.1. Chuẩn bị***

- Bệnh phẩm: Lấy bệnh phẩm theo đúng quy định của Sổ tay lấy mẫu - Khoa Vi Sinh

- Kiểm tra thông tin bệnh nhân trên phiếu yêu cầu xét nghiệm, kiểm tra thông tin và chất lượng mẫu bệnh phẩm.

- Khởi động tủ an toàn sinh học ít nhất 15 phút trước khi thực hiện.

- Sắp xếp các dụng cụ cần thiết vào tủ an toàn sinh học

- Chọn lam kính sạch, không xước. Hơ lam kính qua ngọn lửa đèn cồn để hủy chất dầu còn dính trên lam kính, để nguội lam tự nhiên.

- Đánh dấu tiêu bản bằng cách dùng bút chì đen HB ghi mã số bệnh phẩm lên đầu mờ lam kính.

- Xếp cốc đờm và lam kính theo tứ tự để tránh nhầm lẫn

***7.2. Dàn tiêu bản***

- Thực hiện trong tủ an toàn sinh học

- Mở nắp cốc đờm nhẹ nhàng, đặt nắp ngửa trên khay inox

- Dùng đầu vát của que phết bằng chọn lấy chỗ đờm nhầy mủ nhẹ nhàng cắt mẫu đờm bằng cách di cạnh vát que gỗ vào thành cốc đờm (lưu ý: mỗi bệnh phẩm dùng que phết riêng)

- Đậy nắp cốc đờm

- Đặt que phết có mẫu bệnh phẩm vào giữa lam kính và dàn trải theo vòng xoắn ốc từ trong ra ngoài, dàn đều đặn liên tục tạo độ mịn dày vừa phải hình ô van kích thước dài 2 cm rộng 1cm.

- Ngâm que phết sau khi dàn vào dung dịch sát khuẩn.

***Lưu ý:*** *Chỉ hủy bỏ lọ đờm sau khi đã trả kết quả xét nghiệm*.

***7.3. Làm khô tiêu bản***

Đặt tiêu bản lên mâm kính và đê tiêu bản khô tự nhiên hoàn toàn ở nhiệt độ phòng (18-25°C).

***Lưu ý:*** *Không làm khô tiêu bản bằng đèn cồn hoặc ánh nắng mặt trời.*

***7.4. Cố định tiêu bản***

- Thực hiện bên ngoài tủ an toàn sinh học
- Hơ nóng tiêu bản qua lại trên ngọn lửa đèn cồn 3-4 làn, mỗi lần 3 giây.

***Lưu ý**: Không cố định khi tiêu bản chưa khô hoàn toàn.*

***7.5. Nhuộm màu***

- Đặt tiêu bản lên giá nhuộm
- Phủ đầy dung dịch Fuchsin 0,3% lên mặt phết tiêu bản đã được cố định.
- Hơ nóng trên ngọn lửa đèn cồn đến khi bốc hơi (không được để sôi) 1 lần.
- Để nguội tự nhiên trong 5 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.

***7.6. Tẩy màu***

- Phủ đầy dung dịch cồn tẩy HCL 3%.
- Để yên tiêu bản trong 3 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ.
- Tẩy lại lần 2 (1-3 phút) nếu tiêu bản còn màu hồng.

***7.7. Nhuộm nền***

- Phủ dung dịch xanh Methylen 0,3% trong 1 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ (lưu ý: *Không xối vòi nước thẳng vào vết dàn)*
- Để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng.

***7.8. Đọc kết quả***

Soi tiêu bản bằng việc sử dụng kính hiển vi quang học vật kính dầu 100X theo hướng dẫn sử dụng kính hiển vi vật kính dầu mã XX.HD.03

## VIII. DIỄN GIẢI KẾT QUẢ

### 1. Dương tính

Quan sát AFB bằng vật kính dầu (100X) trên kính hiển vi quang học: AFB có hình ảnh trực khuẩn mảnh, hơi cong, bắt màu đỏ đứng riêng lẻ hay xếp đôi hoặc từng đám trên nền xanh. Đếm số lượng AFB và ghi kết quả như bảng sau:

| **Số lượng AFB** | **Kết quả** | **Phân loại** |
|---|---|---|
| Có > 10 AFB/ 1 vi trường<br>(Soi ít nhất 20 vi trường) | Dương tính | 3 + |
| Có từ 1-10 AFB/ 1 vi trường<br>(Soi ít nhất 50 vi trường) | Dương tính | 2 + |
| Có từ 10-99 AFB/ 100 vi trường | Dương tính | 1 + |
| Có từ 1-9 AFB/ 100 vi trường | Dương tính | Ghi số lượng cụ thể |

| | |
|---|---|
| Không AFB/ 100 vi trường | Âm tính |

*Lưu ý*: 1 dòng tương đương 100 vi trường. Soi ít nhất 1 dòng (tiêu bản dương). Soi ít nhất 3 dòng (tiêu bản âm)

Âm tính: Không tìm thấy AFB.

## IX. KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

### *9.1. Chất lượng bệnh phẩm*

- Quan sát: tốt nhất là bệnh phẩm có nhầy mủ, không nước bọt, không có máu.

- Tiêu chuẩn khi soi kính:

+ Có 25 BCĐN/1 vi trường (soi vật kính 10X, thị kính 10X).

+ Có 3-4 BCĐN/1 vi trường (soi vật kính 100X, thị kính 10X).

+ Hoặc có đại thực bào.

### *9.2. Kích cỡ mẫu bệnh phẩm trên lam kính*

- Hình ovan nằm ở giữa lam.

- Chiều rộng 1 cm, chiều dài 2 cm.

### *9.3. Độ mịn*

- Bề mặt tiêu bản liên tục, đều đặn, không bị rỗng, bong.

- Soi kính: Các vi trường liên tục không có nhiều vi trường rỗng độ sáng đều.

### *9.4. Độ dày*

- Độ dày tiêu bản khoảng 0,04 mm. Kiểm tra bằng cách khi tiêu bản khô chưa nhuộm để 1 tờ giấy có in chữ xuống dưới tiêu bản cách 4-5 cm.

+ Đạt: Nếu nhìn thấy chữ mờ, có thể đọc được

+ Quá dày: Không đọc được chữ

+ Mỏng: Nhìn chữ rõ.

- Soi thấu chiều sâu của tiêu bản (vi trường màu xanh sáng).

- Nếu tiêu bản quá dày: Nhiều lớp, soi không thấu vi trường (vi trường màu xanh tối).

- Nếu tiêu bản quá mỏng: Các vi trường thưa thớt (nền xanh nhạt).

### *9.5. Nhuộm và tẩy màu*

- Soi kính: AFB bắt màu đỏ rõ ràng trên nền màu xanh.

- Chưa đạt: Tiêu bản nhìn bằng mắt thường mà còn màu đỏ.

### *9.6. Độ sạch*

- Soi không thấy các cặn bẩn, cặn Fuchsin, tinh thể....

- Nếu thấy các cặn bẩn có thể do thuốc nhuộm để lâu hoặc do hơ nóng quá lâu trong quá trình nhuộm.

***9.7. Cách kiểm tra***

- Tần suất kiểm tra: hàng ngày hoặc ít nhất 1 tuần/1 lần.
- Kiểm tra bằng 1 tiêu bản dương tính để đếm số lượng và màu của AFB.
- Kiểm tra bằng 1 tiêu bản âm tính để kiểm tra bộ thuốc nhuộm và nguồn nước có bị nhiễm AFB không.
- Ghi kết quả vào sổ kiểm tra chất lượng.

## X. 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 mã hiệu

## XI. LƯU Ý

- AFB nhạt màu có thể do tẩy quá lâu hoặc nhuộm chưa đủ (thời gian, sức nóng).
- Nếu AFB tối màu có thể do nhuộm nền quá lâu.
- Mỗi mẻ nhuộm không nên quá 12 tiêu bản, các tiêu bản để cách nhau ít nhất 1 cm

## XII. HỒ SƠ LƯU

Lưu trữ các biểu mẫu phiếu QC theo đúng quy định của khoa.

## XIII. TÀI LIỆU LIÊN QUAN

| **Tên tài liệu** |
|---|
| Sổ tay lấy mẫu bệnh phẩm Khoa Vi Sinh |
| Hướng dẫn sử dụng kính hiển vi |
| Hướng dẫn sử dụng tủ an toàn sinh học |
| Quy trình trả kết quả xét nghiệm Khoa Vi Sinh |

## XIV. TÀI LIỆU VIỆN DẪN

- Quyết định 26/QĐ-BYT ban hành ngày 03/01/2013 về việc ban hành tài liệu "*Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Vi sinh Y học*"
- Bộ Y tế, Giáo trình thực hành Vi sinh vật, NXB Y học, 2004.