**PHỤ LỤC II-B**

**MẪU QUY TRÌNH THỰC HÀNH CHUẨN VỀ**

**NHUỘM SOI TRỰC TIẾP TÌM AFB**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Đặt Logo (nếu có) | BỆNH VIỆN ĐA KHOA TỈNH XYZKHOA XÉT NGHIỆM XX | *Mã số:* ***XX-QTKT-06****Phiên bản:* ***1.0****Ngày ban hành:* ***15/10/2014*** |
| **QUY TRÌNH****NHUỘM SOI TRỰC TIẾP TÌM AFB** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Người biên soạn** | **Người xem xét** | **Người phê duyệt** |
| Họ tên | Nguyen Van A | Le Thi C | Tran Van B |
| Ký tên |  |  |  |
| Ngày | …… / …… / ……… | …… / …… / ……… | …… / …… / ……… |

**THEO DÕI XEM XÉT/SỬA ĐỔI TÀI LIỆU**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Phiên bản số** | **Vị trí sửa đổi** | **Nội dung sửa đổi** | **Ngày xem xét/ sửa đổi** | **Người xem xét/ sửa đổi** |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |

*Tài liệu nội bộ*

1. **Mục đích**
* Mô tả và hướng dẫn cách thực hiện xét nghiệm đờm trực tiếp tìm AFB bằng phương pháp nhuộm Ziehl-Neelsen.
1. **Phạm vi**
* Áp dụng tại khoa xét nghiệm XX – Bệnh viện Đa Khoa XYZ.
1. **Trách nhiệm**
* Nhân viên được giao nhiệm vụ thực hiện xét nghiệm này tuân thủ đúng quy trình.
* Cán bộ QLCL, tổ trưởng chuyên môn chịu trách nhiệm giám sát việc tuân thủ quy trình và nhận định kết quả xét nghiệm.
1. **Định nghĩa và từ viết tắt**

|  |  |
| --- | --- |
| AFB | Acid fast bacilli - Trực khuẩn kháng cồn, kháng axit thuộc họ *Mycobacteriaceae* |
| BCĐN | Bạch cầu đơn nhân |
| ZN | Zeihl-Neelsen |

BCĐN Bạch cầu đa nhân

1. **Nguyên lý**
* Phương pháp nhuộm Ziehl-Neelsen là phương pháp sử dụng 2 hoá chất nhuộm màu là đỏ fuchsin và xanh methylen kết hợp với chất tẩy màu (hỗn hợp acid HCL và cồn 96o) để phát hiện AFB. Phương pháp này được sử dụng để phát hiện các vi khuẩn thuộc họ *Mycobacteriacae* là các vi khuẩn có đặc điểm kháng cồn, kháng acid. Chúng có thể tồn tại trong môi trường có nồng độ cồn, acid nhất định và không bị mất màu khi tẩy bằng cồn và acid.
1. **Thiết bị và vật liệu**

***6.1. Thiết bị***

* Kính hiển vi quang học 2 mắt với vật kính 100X, 10X
* Tủ an toàn sinh học cấp 1
* Đồng hồ phút

***6.2. Vật liệu***

6.2.1 Dụng cụ

* Lam kính có đầu mờ
* Bút chì đen HB
* Cốc nhựa đựng đờm
* Que gỗ phết đờm dùng 1 lần
* Giá nhuộm tiêu bản
* Giấy lau kính

6.2.2 Hóa chất

* Dung dịch Fuchsin 0,3%
* Dung dịch cồn tẩy HCL 3%
* Dung dịch xanh Methylen 0,3%
* Dung dịch sát khuẩn Phenol 5% hoặc Javen 0,5%
* Dầu soi kính

6.2.3. Mẫu bệnh phẩm:

* Đờm đựng trong ống nhựa sạch vô trùng có nắp đậy.
1. **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 số XX-QTQL-10.
* Các thao tác kỹ thuật phải nhẹ nhàng tránh tạo hạt mù khi mở nắp lọ đờm, lấy mẫu đờm, dàn tiêu bản và khi cố định tiêu bản chưa khô hoàn toàn.
1. **Nội dung thực hiện**

***8.1. Chuẩn bị***

* 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 huỷ chất dầu còn dính trên lam kính, để nguội.
* Đánh dấu bằng cách dùng bút chì đen HB ghi mã số bệnh phẩm lên đầu mờ lam kính.
* Sếp cốc đờm và lam kính theo tứ tự để tránh nhầm lẫn

*Lưu ý: Số xét nghiệm phải đồng nhất giữa sổ xét nghiệm, phiếu xét nghiệm, cốc đờm và lam kính*

***8.2. 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 mẩu đờm bằng cach 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 phenol 5% hoặc Jave 0,5%.

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

***8.3. Làm khô tiêu bản:***

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

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

***8.4. 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 lần, mỗi lần 3 giây.

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

***8.5. 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.

***8.6. 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.

***8.7. Nhuộm nền:***

* Phủ dung dịch xanh Methylen 0,3% trong 1 phút.

Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ (l*ưu ý: Không xối vòi nước thẳng vào vết dàn)*

* Để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng.

***8.8. 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
* Dương tính: AFB là trực khuẩn hình que, mảnh, hơi cong, bắt màu đỏ Fuchsin, đứng riêng lẻ, từng đôi hoặc thành từng đám trên nền xanh.
* Âm tính: Không tìm thấy AFB.
1. **Kiểm tra chất lượng:**

Theo 6 tiêu chuẩn sau:

* 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 liện 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 xuất 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.
1. **Diễn giải và báo cáo kết quả:**

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

Lưu ý: 1 dòng lam tương đương 100 vi trường. Soi ít nhất 3 dòng.

1. **Lưu ý (cảnh báo):**
* 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.
1. **Lưu trữ hồ sơ**
* Ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm đờm tìm AFB Lưu trữ các biểu mẫu phiếu kiểm tra chất lượng theo đúng quy định của khoa.
1. **Tài liệu liên quan:**

|  |  |
| --- | --- |
| **Tên tài liệu** | **Mã tài liệu** |
| 1. Quy trình an toàn phòng xét nghiệm
 | XX-QTQL-10 |
| 1. Hướng dẫn sử dụng kính hiển vi vật kính dầu
 |  XX.HD.03 |

1. **Tài liệu tham khảo:**
* Bộ Y tế, Hướng dẫn quản lý bệnh lao, NXB Y học, 2009.
* Bộ Y tế, Chương trình chống lao quốc gia, Hướng dẫn quy trình thực hành chuẩn xét nghiệm vi khuẩn lao, 2012, trang 23-38.