

ĐẢM BẢO VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM SINH HỌC PHÂN TỬ

TS. BS. Nguyễn Minh Hà

drnguyenminhha@gmail.com

07.2019

Nội dung

- Đảm bảo và kiểm tra cả ba khâu của quá trình XN
- Vấn đề về cơ sở vật chất, trang thiết bị, hóa chất
- Các vấn đề về mẫu bệnh phẩm
- Vấn đề lựa chọn kỹ thuật XN
- Ý nghĩa của các mẫu chứng (control) trong XN bằng kỹ thuật PCR
- Ngoại kiểm tra XN SHPT



ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG CHO XN SHPT

Mục tiêu

- Bảo tồn chất lượng và nồng độ vật chất di truyền đang quan tâm.
- Tránh nhiễm chéo giữa các mẫu và với hoá chất; giữa mẫu với nhau.
- Tránh KQ âm giả, dương giả.

Trước xét nghiệm

CÁC YẾU TỐ	ĐẶC ĐIỂM
1.Thiết kế kỹ thuật	Chọn lựa kỹ thuật phù hợp (độ nhạy, giá thành...) Chọn lựa đoạn mồi, đoạn dò phù hợp vùng gen mong muốn. Chọn lựa các hóa chất đi kèm Tối ưu hóa các điều kiện phản ứng
2.Hành chánh	Tên, tuổi, phương thức liên lạc
3.Lấy mẫu	Một số vấn đề về mẫu bệnh phẩm SHPT Không cần nhịn đói Chuẩn bị ống chứa chất chống đông phù hợp
4.Bảo quản mẫu	Thường $\leq -20^{\circ}\text{C}$

5

Trong xét nghiệm

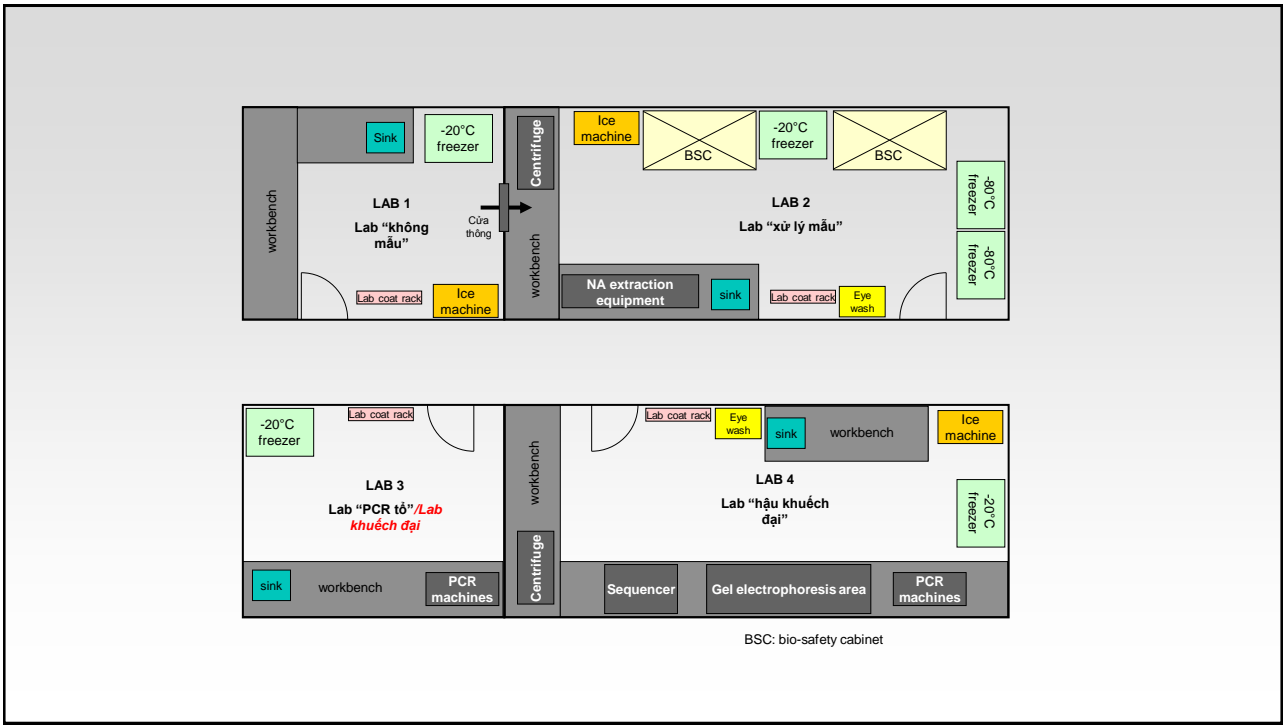
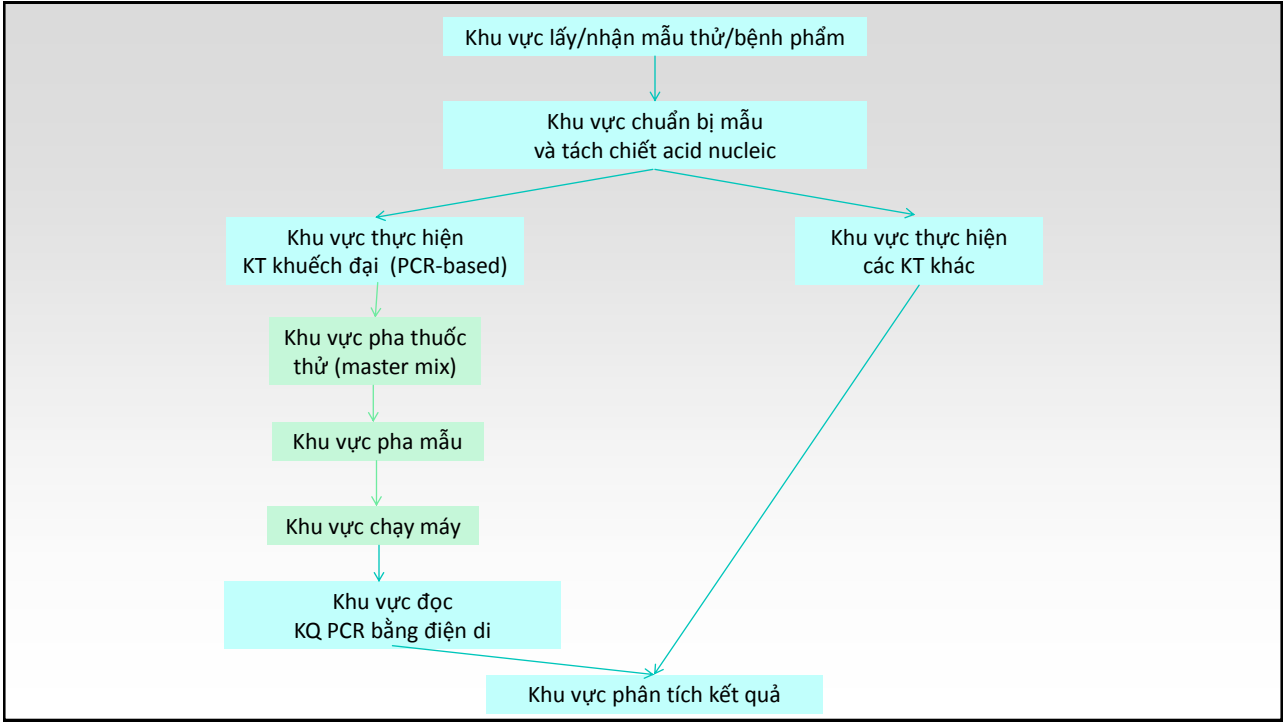
- KTCL quá trình ly trích và tinh sạch
- KT tính đặc hiệu của đoạn mồi
- KT sự không lây nhiễm.
- Tay nghề của KTV : quan trọng trong các hệ thống bán tự động hoặc hệ thống hóa chất tự xây dựng.

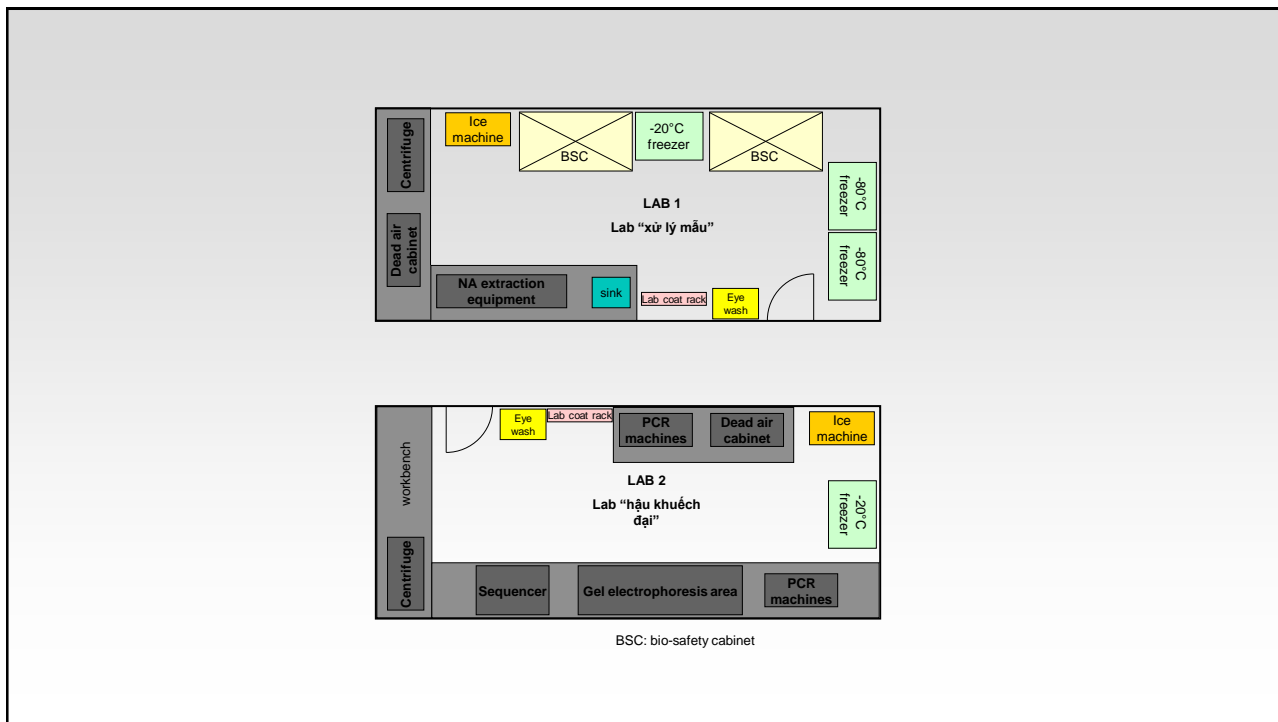
Sau xét nghiệm

- Biện luận KQ: xem xét Xác nhận phân tích và Xác nhận lâm sàng
- Hành chánh : bảo đảm KQ trả đúng BN, lựa chọn trả lời kết quả phù hợp.
- Quản lý máy móc và hóa chất.
- Lưu trữ mẫu bệnh phẩm sau XN (thường là dịch chứa vật chất di truyền sau tách chiết)

Một số quy tắc bố trí PXN SHPT

- Tuân theo các quy tắc chung về **Đảm bảo an toàn sinh học trong PXN** (thường là cấp 2)
- Có khu vực làm KT liên quan đến khuếch đại và khu vực làm các KT không liên quan đến khuếch đại gen.
- Bố trí các khu vực theo một chiều để hạn chế và kiểm soát lây nhiễm
- Trang bị hệ thống đèn UV





Một số lưu ý về TTB XN SHPT

- Tủ âm 80°C, máy ly tâm lạnh, máy ủ lắc, máy trộn, máy tạo đá bào, hệ thống điện di ...
- Các thiết bị luân nhiệt, real-time PCR, máy giải trình tự ...
- Các thiết bị cần được bảo dưỡng, hiệu chuẩn định kỳ. Các thiết bị chuyên dùng XN cho bệnh nhân cần đạt chuẩn IVD
- Sử dụng Pipettor cơ và điện tử, đơn kênh và nhiều kênh
- Sử dụng Pipette tips có đầu lọc

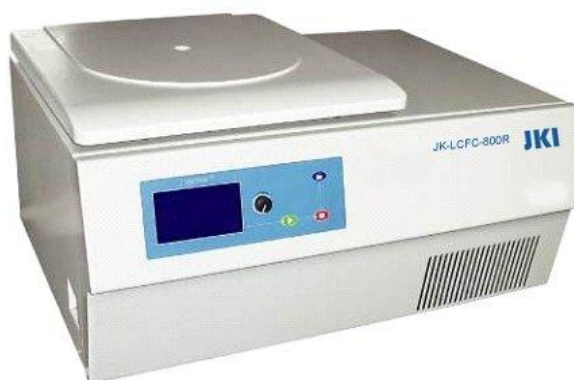
**Máy ly tâm mini / để bàn
(mini centrifuger)**



TS.BS.Nguyễn Minh Hà

07/12/2019

13



**Máy ly tâm lạnh
(freeze centrifuger)**

Mục đích ?

07/12/2019

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

14



Máy trộn mẫu để bàn
(Mini vortexer)

07/12/2019

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

15

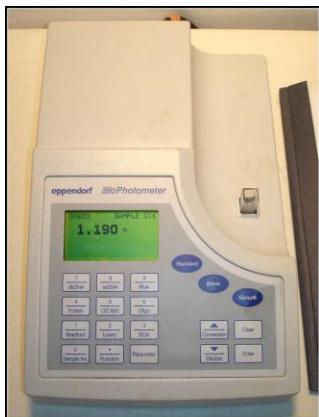


Máy ủ lắc mẫu
(Thermomixer)

07/12/2019

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

16



Máy quang phổ đo nồng độ DNA, RNA, protein
(Photospectrometer)

07/12/2019

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

17



Máy quang phổ đo nồng độ DNA, RNA
(NanoDrop)

	NanoDrop 2000c	NanoDrop 3300
How does it work?	Absorbance of UV-Visible light	Fluorescence
What is the usable concentration range?	0.4 - 15,000 <u>nanograms</u> / μ L	0.05 - 2,000 <u>picograms</u> / μ L
Can it detect contaminants?	Yes - spectral data and purity ratios indicate sample purity	No - quantification only
Can I selectively measure dsDNA/ssDNA/RNA even when the others are present?	No - measures the total absorbance of the sample	Yes - assays are selective for dsDNA/ssDNA/RNA
Which is faster?	No specific sample preparation needed. Measurement takes 5 seconds.	Requires reagent preparation and mixing with samples and measurement of standards
Do I need a standard curve?	No	Yes

07/12/2019

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

18



07/12/2019

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

19



07/12/2019

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

20



Pipettor đơn (một kênh), cơ



Pipettor đơn, điện tử

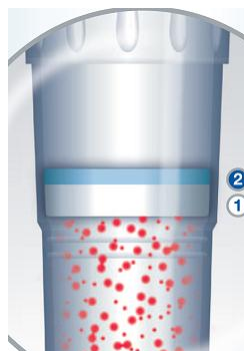


Pipettor cơ,
nhiều kênh



Pipettor tự động, nhiều kênh
(*automated pipettors; i-pipettors*)





Tại sao cần dùng filter pipette tips ?

07/12/2019

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

23



07/12/2019

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

24

Một số lưu ý về hóa chất XN SHPT

- Đa số cần bảo quản ở nhiệt độ âm
- Khi thao tác luôn cần lưu giữ trên đá lạnh
- Cần được phân chiết ra thành những thể tích vừa đủ dùng để tránh rã đông/tái đông và nhiễm giữa mẫu-hóa chất.
- Nước cất sử dụng là dạng DNase-free hoặc RNase-free
- Nồng độ cần được tuân thủ theo từng phản ứng.

Trong một số PXN nghiên cứu và cả XN cho bệnh nhân

– Đa số là thuốc thử tự pha chế chạy trên thiết bị PCR nghiên cứu

1. Thuốc thử tự pha chế
2. Thiếu các thử nghiệm lâm sàng
3. Thông tin chưa được kiểm chứng và công nhận

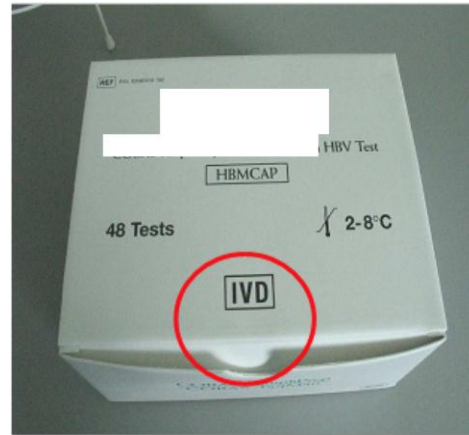
=

RUO
Research Use Only

Nếu muốn áp dụng XN dịch vụ cho người bệnh,

Hóa chất cần đạt chuẩn IVD

IVD
In-Vitro Diagnostic



Làm việc với RNA

- RNA bị hủy nhanh chóng bởi RNase (hiện diện khắp nơi)
- Khi tách chiết RNA cần loại bỏ hết protein và DNA
- Cần sử dụng DNase
- Dụng cụ, nước cất dùng pha buffer, hóa chất phải được xử lý với DEPC (DEPC-treated)
- DEPC là một chất sinh ung (có thể gây ức chế enzyme) → phải được loại trừ sau đó

MẪU BỆNH PHẨM CỦA XN SHPT

- Mẫu bệnh phẩm dùng cho XN CĐPT gồm những loại nào?
- Cần lưu ý gì với mẫu bệnh phẩm XN CĐPT (so với các XN thông thường khác) ?
- Mẫu bệnh phẩm này đến từ nguồn nào? (do đơn vị/bộ phận nào cung cấp)
- Vai trò của đơn vị/bộ phận cung cấp mẫu bệnh phẩm cho CĐPT?

Mẫu bệnh phẩm dùng cho XN CDPT gồm những loại nào?

- Máu: huyết tương, bạch cầu
- Tủy
- Phết
- Dịch: vết loét, dịch cơ quan
- Mô: phẫu thuật, sinh thiết
- Cell block

Loại bệnh phẩm	DNA của chủ thể nào?	Dùng CDPT trong nhóm bệnh nào?	Lượng DNA đích thu được sau tách chiết ?
Huyết tương			
Bạch cầu			
Tủy			
Phết			
Dịch vết loét			
Mô phẫu thuật			
Mô sinh thiết			
Cell block			

Cần lưu ý gì với mẫu bệnh phẩm XN CĐPT (so với các XN thông thường khác) ?

○ Vấn đề về kỹ thuật trích mẫu

- Tán huyết
- Mẫu bị đông
- Chất chống đông không chính xác, không đủ
- Trích mẫu sai vị trí
- Trích mẫu không đủ
-

→ hậu quả: (1) không thực hiện được KT
(2) KQ âm tính giả khó phát hiện

○ Vấn đề **bảo quản số lượng** của vật chất di truyền quan tâm

- *Tùy theo loại mẫu bệnh phẩm*
- *KT tách chiết*
- *Tay nghề KTV*
- *Kiểm tra sau tách chiết*

○ Vấn đề **bảo quản chất lượng** của vật chất di truyền quan tâm

- DNA, RNA và protein bị hủy, tổn thương trong quá trình tách chiết
- Dung dịch sau tách chiết còn lẫn một số yếu tố gây ức chế kỹ thuật về sau

→ Có thể kiểm tra bằng đo độ tinh khiết sau tách chiết hoặc khuếch đại gen nội chuẩn (internal control)

Mẫu bệnh phẩm do đơn vị/bộ phận nào cung cấp ? (Ai đảm nhận công tác trích mẫu?)

Loại bệnh phẩm	Bộ phận trích mẫu
Huyết tương	KTV lấy máu
Bạch cầu	KTV lấy máu
Tủy	Bác sỹ
Phết	Bác sỹ
Dịch vết loét	Bác sỹ
Mô phẫu thuật	Bác sỹ
Mô sinh thiết	Bác sỹ
Cell block	Bác sỹ

Vai trò của bộ phận cung cấp mẫu bệnh phẩm cho CĐPT?

- Đại diện cho bộ phận khám chữa bệnh
- Chẩn đoán sơ bộ bệnh (lựa chọn BN) → cung cấp nguồn bệnh phẩm cho CĐPT
- **Quyết định sai số của giai đoạn trước XN**

Đảm bảo chất lượng khâu tách chiết

- Đảm bảo chất lượng mẫu bệnh phẩm
- Thiết bị, hóa chất đảm bảo chất lượng và phù hợp.
- KTV được đào tạo
- Tuân thủ đúng QT kỹ thuật
- Đối với XN chẩn đoán các tác nhân VSV:
 - Có thể áp dụng một số kỹ thuật cấy hoặc tăng sinh để đảm bảo có và làm tăng số lượng VSV trong mẫu đem tách chiết
 - Nên sử dụng bộ kit tách chiết đặc hiệu cho VSV

KTCL của khâu tách chiết

- KT độ tinh khiết của dd sau tách chiết bằng máy đo (tỷ lệ A260/A280 trong khoảng 1.7 – 2.0)
- KT nồng độ DNA hoặc RNA trong dd sau tách chiết bằng máy đo nồng độ
- KT sự toàn vẹn của DNA, RNA trong dd sau tách chiết bằng pp điện di.
- KT sự hiện diện của DNA, RNA quan tâm trong dd sau tách chiết ? → khó (đặc biệt quan trọng với các XN SHPT chẩn đoán tác nhân VSV)

VẤN ĐỀ LỰA CHỌN KỸ THUẬT XN SHPT

Xây dựng QT kỹ thuật
Triển khai áp dụng thường quy

Xây dựng quy trình kỹ thuật ¹

○ Bộ phận/đơn vị chịu trách nhiệm:

- Trường đại học, viện nghiên cứu
- Cơ sở khám chữa bệnh
- Bộ phận kỹ thuật của các công ty thiết bị, hóa chất

Xây dựng quy trình kỹ thuật ²

○ Các bước xây dựng quy trình kỹ thuật:

- Xác định cơ sở lý thuyết: về bệnh, cơ chế bệnh ở mức độ phân tử, các cơ chế điều trị ở cấp độ phân tử...
- Xác định đích phân tử quan tâm: gen (DNA), mRNA hoặc protein: vị trí, cấu trúc, chức năng, đột biến phân bố ra sao...
- Xác định loại kỹ thuật tối ưu sử dụng để phát hiện đích phân tử quan tâm
- Trang bị cơ sở vật chất và nhân lực
- Áp dụng thử nghiệm trên cỡ mẫu nhỏ, đánh giá hiệu quả và tối ưu hóa quy trình

Xây dựng quy trình kỹ thuật ³

○ Xác định loại kỹ thuật tối ưu sử dụng để phát hiện đích phân tử quan tâm:

- Tùy theo đặc tính của đích phân tử quan tâm
- Tùy theo loại bệnh phẩm
- "Tối ưu" không phải là hoàn hảo: phải phù hợp với
 - khả năng kinh tế của đơn vị,
 - mục đích làm XN (nghiên cứu hay áp dụng hàng loạt trên LS),
 - khả năng chi trả của BN,
 - hiện trạng cơ sở vật chất và nhân lực của đơn vị

TS.BS.Nguyễn -Minh Hà

07/12/2019

43

Xây dựng quy trình kỹ thuật ⁴

○ Các lưu ý khi xây dựng quy trình KT:

- Vấn đề nội kiểm và ngoại kiểm
- Cân nhắc giá trị LS của XN
- Cân nhắc vấn đề kết hợp giữa các đơn vị hoặc chuyển giao công nghệ.

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

07/12/2019

44

Triển khai áp dụng XN CĐPT ¹

○ Bộ phận/đơn vị chịu trách nhiệm:

- Trường đại học, viện nghiên cứu, cơ sở khám chữa bệnh
- KTV, bác sỹ XN, bác sỹ LS.

Triển khai áp dụng XN CĐPT ²

○ Các bước triển khai áp dụng:

- Áp dụng quy trình kỹ thuật để xác định đích phân tử.
- *Phân tích được những giới hạn của chẩn đoán phân tử: nhận xét được độ nhạy/độ đặc hiệu của KT/test; nguy cơ của KQ âm tính/dương tính giả; sự thiếu đồng nhất trong KQ giữa các PXN... (Bác sỹ XN, Bác sỹ LS)*
- *Đánh giá được ý nghĩa lâm sàng của kết quả XN bằng KT SHPT: ý nghĩa của KQ âm tính/dương tính; giá trị áp dụng trong chẩn đoán/theo dõi điều trị/phòng ngừa; tần số lặp lại XN... (Bác sỹ LS)*

VAI TRÒ CỦA CÁC MẪU CHỨNG TRONG KT PCR

Nguyên nhân gây sai lệch KQ PCR

ÂM TÍNH GIẢ

- Không có vật chất di truyền quan tâm trong mẫu bệnh phẩm
- Vật chất di truyền bị thất thoát trong quá trình tách chiết
- Phản ứng khuếch đại bị ức chế
- Hóa chất, thiết bị, dụng cụ không đạt chuẩn

DƯƠNG TÍNH GIẢ

- Nhiễm chéo do thao tác của người chuẩn bị mẫu, do vấn đề về ATSH PXN.
- Ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại trong hóa chất, thiết bị, môi trường ...

Kiểm tra sai lệch KQ PCR

Chứng
DƯƠNG

Chứng
ÂM

Chứng
NƯỚC

Chứng
NỘI TÀI



PCR mix



giống kích thước
và trình tự

Chứng
DƯƠNG

luôn dương

Mẫu BP từ chủ thể **chắc chắn**
có chứa đoạn acid nucle quan
tâm

Vai trò:

- Chứng minh sự hoạt động của PCR mix đang sử dụng.
- Chứng minh độ đặc hiệu của cặp mồi
- Không kiểm tra được quá trình tách chiết có đạt chuẩn hay không



**luôn âm với
DNA đích**

Mẫu BP từ chủ thể **chắc chắn**
KHÔNG có chứa đoạn acid
nucle quan tâm

Chứng ÂM

Vai trò:

- Chứng minh độ đặc hiệu của cặp mồi
- Không kiểm tra được quá trình tách chiết có đạt chuẩn hay không

Chứng NƯỚC

Lưu ý: chứng âm khác với **chứng nước**

Nước cất DNase-free + PCR mix

Chứng minh PCR mix không bị ngoại nhiễm hoặc không bị nhiễm chéo

→ Hóa chất và thiết bị không bị ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại

Là DNA được chạy
song song với DNA đích

(Không phải là một mẫu riêng)

Có kích thước và trình tự
khác DNA đích



Chứng NỘI TẠ

Thường được thêm vào
chung với mẫu chứng âm,
luôn cho kết quả (+)

Có thể sử dụng chung hoặc
khác mồi với mẫu DNA đích

**Vai trò:**

- Kiểm tra được khâu tách chiết tốt hay không
- Kiểm tra được có tồn lưu chất ức chế khuếch đại trong dung dịch sau tách chiết không
- Kiểm tra được sự hoạt động của hệ thống khuếch đại

TRẢ LỜI VÀ BIỆN LUẬN KẾT QUẢ XN SHPT

Lưu ý

- Tuân theo các qui định chung về trả KQ XN
- Kết quả cần được kiểm tra giám sát và đánh giá bởi ít nhất hai cán bộ có chuyên môn về XN SHPT, trong đó tốt nhất nên có một người có hiểu biết về thực hành LS.
- Cần có đủ hai bước: (1) Xác nhận phân tích; (2) Xác nhận lâm sàng
- Không được kết luận vượt quá giá trị của kỹ thuật đang sử dụng, gây hiểu sai hoặc nhầm lẫn cho việc xác nhận lâm sàng.
- Cần ghi chú giải thích rõ các thuật ngữ chuyên ngành có góp phần vào việc xác nhận lâm sàng KQ XN SHPT của cán bộ LS.

Hai bước xác nhận kết quả

Xác nhận phân tích (Analytical validation)

- Có mục tiêu là xác định được có sự hiện diện hay không và nguyên nhân hoặc nguồn gốc (nếu có) cho những sai sót kỹ thuật có thể xảy ra khi phân tích mẫu bệnh phẩm.
- Cần cân nhắc nhiều yếu tố để cung cấp KL chính xác và nhiều thông tin nhất cho việc xác nhận LS.
- **Phải có đủ các chứng mới tự tin nhận định KQ của mẫu**

Xác nhận lâm sàng (Clinical validation)

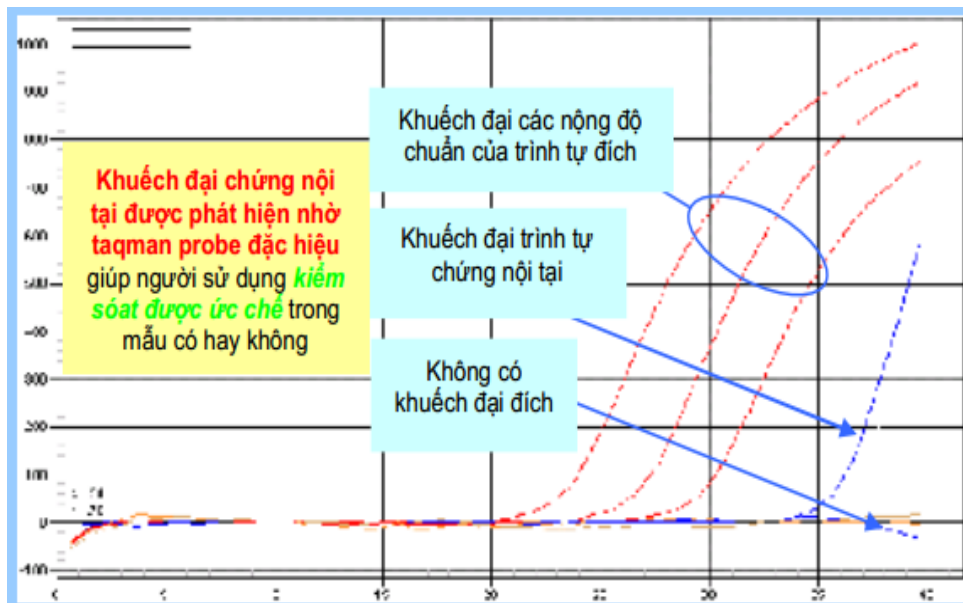
- Có mục tiêu là xác định nguồn gốc cho những biến thiên sinh học có thể xảy ra khi phân tích mẫu bệnh phẩm.
- **Biện luận KQ phải gắn liền với bối cảnh LS của người bệnh**
- Đây là nhiệm vụ của cán bộ LS, dựa trên các dữ liệu được cung cấp hoặc trao đổi với cán bộ XN.
- Một XN có thể thực hiện về mặt phân tích kỹ thuật nhưng không có lợi ích về mặt LS thì không nên ứng dụng trong thực hành LS.

Phải có đủ các chứng mới tự tin nhận định kết quả của mẫu
(Xác nhận phân tích – Analytical validation)

Chứng dương	Chứng âm	Chứng nội tại	Chứng nước	Mẫu	Kết luận
+	-	+	-	+	Dương tính
+	-	+	-	-	Âm tính
+	+	+	+	Không đọc KQ	Ngoại nhiễm
-	-	-	-	Không đọc KQ	PU PCR bị ức chế
+	-	-	-	Không đọc KQ	Thất thoát acid nucleic trong khâu tách chiết

Một KQ XN bằng real-time PCR cần chứng minh và thể hiện được trên phiếu trả lời KQ:

- Các mẫu chứng tương tự như PCR định tính.
- Mẫu thử được chạy chung với các mẫu chuẩn được pha loãng (**đường chuẩn**) → có công bố **ngưỡng phát hiện** của hệ thống.
- Thao tác định lượng chuẩn mực được thể hiện qua hiệu quả PCR và **hệ số tương quan** trên biểu đồ chuẩn đạt thông số lý tưởng
- Nếu mẫu kết luận âm tính hay dưới ngưỡng phải có đường biểu diễn khuếch đại của chứng nội tại.



Ví dụ trong XN nhiễm, dựa vào KQ XN chỉ có thể:

- KQ (+) nghĩa là **có tác nhân đang quan tâm trong mẫu bệnh phẩm**. Không có nghĩa là BN bị bệnh (vì không có hoặc không đề cập đến ngưỡng phân biệt thể infected vs thể carrier) hoặc mức độ bệnh ra sao.
- Đối với multiplex PCR, KQ (+) với tác nhân nào cũng chỉ có nghĩa có tác nhân đó trong mẫu bệnh phẩm, không thể kết luận đó là tác nhân gây bệnh.
- Đối với real-time PCR định lượng: KQ dưới ngưỡng phát hiện phải kết luận là số lượng copies tác nhân trong mẫu bệnh phẩm không có hoặc là thấp hơn so với ngưỡng phát hiện của hệ thống.
- KQ (-) nghĩa là **không có tác nhân đang quan tâm trong mẫu bệnh phẩm**. Không có nghĩa là BN không bị bệnh.



RESULTS RECIPIENT
 ASIA GENOMICS
 Attn: Dr. Soomil Yoon
 65A Temple Street
 Singapore, Singapore 058610
 Phone: +65 6336 2050
 Fax: +65 6220 3718
 NPI: 1063616605
 Report Date: 05/22/2015

FEMALE

Ethnicity: Southeast Asian
 Sample Type: EDTA Blood
 Date of Collection: 05/11/2015
 Date Received: 05/13/2015
 Date Tested: 05/21/2015
 Barcode: 11200003207133

Inherited Cancer Screen

NEGATIVE

ABOUT THIS TEST

The Counsyl Inherited Cancer Screen helps you learn about your risk of developing various cancers.

PANEL DETAILS

BRCA1 and BRCA2 (2 genes tested)
 VUS excluded

RESULTS SUMMARY

NEGATIVE

No known or potential disease-causing mutations were detected. A complete list of all conditions tested can be found on page 4.

NEGATIVE

Inherited Cancer Screen

What does it mean to test negative?

A negative test result significantly reduces, but does not eliminate, the chance that you have a genetic change, or mutation, associated with the hereditary cancer syndrome(s) included in this screen.

What are the cancer risks associated with a negative result?

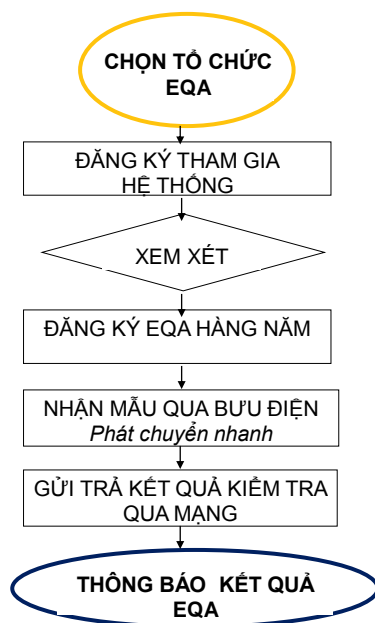
It's important to understand that a negative result does not necessarily mean that you have a decreased risk to develop cancer. Even though you tested negative, various factors can still increase your risk of cancer, including:

- Environmental factors
- Family history
- A mutation in a gene not included in your current screen. (A complete list of the genes included can be found on the following pages)
- A mutation in a gene included in your screen that was not detected with the current test
- A change in a gene included in your screen that requires further research to determine whether it causes an increased risk for cancer or not. These genetic changes are sometimes referred to as "variants of uncertain significance" (VUS). Since most VUS are eventually found to be benign changes that have no impact on your health, they were not included in this report.

07/12/2019

TS.BS.Nguyễn Minh Hà

NGOẠI KIỂM TRA XN SHPT



- Một số tổ chức như: EMQN, UK-NEQAS ...
- Việc tham gia là hoàn toàn tự nguyện
- Kết quả kiểm tra sẽ được gửi trả qua mạng dưới dạng văn bản (.doc / .pdf) theo mẫu có đính kèm các hình ảnh.
- Phần trả lời kết quả phải ghi rõ dùng kỹ thuật gì, trên máy nào, với hướng dẫn nào (guideline)
- XN SHPT rất đa dạng + phí EQA cao → chọn lọc cho một số XN quan trọng.
- Thực hiện EQA cho XN chẩn đoán SHPT tại Việt Nam rất cần thiết → là vị trọng tài quan trọng để xác định sự tin cậy và bảo đảm chất lượng của KQ XN.

Nhiễm chéo, ngoại nhiễm sản phẩm khuếch đại

Là gì?	Mẫu âm/thuốc thử bị nhiễm acid nucleic đích từ các mẫu dương
Xảy ra khi nào?	-Khi mở nắp các tube chứa acid nucleic đích. -Khi thao tác VSV nuôi cấy tác nhân đích trong PXN chẩn đoán đúng tác nhân đó.
Nguyên nhân?	-Không sử dụng các vật tư đã diệt acid nucleic -Sử dụng chung vật tư thao tác giữa các mẫu
Cách nhận diện?	-Sử dụng các mẫu chứng (control) -Phản hồi về sự không phù hợp giữa kết quả và tình trạng của vật chủ lấy mẫu từ người gửi mẫu
Cách ngăn ngừa?	-Tôn trọng quy tắc thiết kế, bố trí PXN -Tuân thủ các quy trình và thao tác vô trùng -Sử dụng đúng dụng cụ -Sử dụng PCR master mix có pha thêm dUTP và enzym UNG