



Phòng Chống Dịch Bệnh  
Sứ Mệnh Chúng Tôi

TRUNG TÂM KIỂM SOÁT BỆNH TẬT  
TỈNH KHÁNH HÒA  
KHOA XÉT NGHIỆM – CHẨN ĐOÁN HÌNH  
ẢNH & THĂM DÒ CHỨC NĂNG

Mã số: QTKT – 04

Phiên bản: 2.0

Ngày hiệu lực: 31.10.2022

QUI TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỊNH TÍNH SARS COV 2 BẰNG KỸ  
THUẬT REALTIME PCR (SINI PHẪM WHO)

Người biên soạn	Người soát xét	Người phê duyệt
		 <b>P. GIÁM ĐỐC</b>
<b>Đặng Tấn Vinh</b>	<b>Trương Thị Lan Anh</b>	<b>Nguyễn Đức Tình</b>
Ngày 20 tháng 10 năm 2022	Ngày 20 tháng 10 năm 2022	Ngày 25 tháng 10 năm 2022

*Tình trạng xem xét, sửa đổi*

Phiên bản số	Vị trí sửa đổi	Nội dung sửa đổi	Ngày xem xét/sửa đổi	Người xem xét/sửa đổi
2.0	Trang 1	Thay đổi người phê duyệt	20.10.2022	Trương Thị Lan Anh
	Trang 3	Phương pháp lấy mẫu tuân thủ Quyết định số 3638/QĐ-BYT ngày 30/07/2021 về việc ban hành Hướng dẫn tạm thời giám sát và phòng, chống COVID-19	20.10.2022	Trương Thị Lan Anh
	Trang 3	Bộ kit chiết tách (không kèm theo kit): sử dụng máy tách chiết tự động	20.10.2022	Trương Thị Lan Anh
	Trang 7	Bảng chu kỳ nhiệt	20.10.2022	Trương Thị Lan Anh



**QUI TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỊNH TÍNH SARS COV 2 BẰNG  
KỸ THUẬT REALTIME PCR(SINH PHẨM WHO)**

Mã số: QTKT - 04

**1. Mục đích:**

– Hướng dẫn thực hiện xét nghiệm phát hiện ARN chủng mới của vi rút Corona COVID-19 bằng kỹ thuật Real time RT-PCR theo bộ sinh phẩm SuperScript<sup>TM</sup>III RT/Platinum Taq Mix.

– Áp dụng tại Khoa Xét nghiệm- Chẩn đoán hình ảnh – Thăm dò chức năng.

**2. Trách nhiệm:**

– Lãnh đạo Khoa có trách nhiệm xem xét và phê duyệt quy trình.

– Nhân viên quản lý chất lượng và phụ trách bộ phận chịu trách nhiệm kiểm soát chất lượng, giám sát sự tuân thủ và cập nhật quy trình.

– Nhân viên xét nghiệm tuân thủ thực hiện theo quy trình.

**3. Định nghĩa - từ viết tắt:**

– RNA: Ribonucleic Acid

– RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction): Phản ứng phiên mã ngược-khuếch đại chuỗi.

– dNTP (Deoxyribonucleotide triphosphate): gồm dATP, dCTP, dGTP, dTTP

– ATSH: An toàn sinh học

– XN-CĐHA-TDCN: Xét nghiệm- Chẩn đoán hình ảnh – Thăm dò chức năng

– NC (Negative Control): Chứng âm phản ứng

– Mo (Mock): Chứng âm chiết tách, là mẫu chiết tách từ môi trường vận chuyển sạch/ hoặc từ nước tinh sạch. Chứng âm chiết tách được chiết tách cùng lúc với mẫu bệnh phẩm.

– PC (Positive Control): Chứng dương

**4. Nguyên lý:**

Quy trình xét nghiệm này dựa trên nguyên lý kỹ thuật real time RT-PCR (Taq Man), sử dụng các cặp mồi và đầu dò (probe) đặc hiệu để phát hiện đoạn vật liệu di truyền RNA của vi rút. Bộ mồi, và probe sử dụng trong quy trình này, nhằm phát hiện chủng mới của vi rút Corona (Covid-19), trên hai vùng gene RdRP và E gene .



# QUI TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỊNH TÍNH SARS COV 2 BẰNG KỸ THUẬT REALTIME PCR(SINH PHẨM WHO)

Mã số: QTKT - 04

## 5. An toàn:

– Mặc trang phục bảo hộ cá nhân (trang phục phòng chống dịch kín đầu đến chân) khi thao tác với mẫu bệnh phẩm ở giai đoạn tách mẫu. Thực hiện tách mẫu trong tủ ATSH cấp 2B hoặc cấp 3.

– Tuân thủ theo các quy định và hướng dẫn về an toàn trong phòng xét nghiệm đã được nêu trong Sổ tay ATSH

– Mang găng tay và mặc áo khoác khi tiến hành thao tác.

– Sử dụng các thiết bị (tủ ATSH, máy PCR, ly tâm,...) theo đúng hướng dẫn.

– Lau chùi pipet man, giá tích lạnh và bề mặt làm việc sau khi làm việc bằng cồn và khử nhiễm tủ ATSH bằng đèn cực tím trước và sau khi làm việc trong 15 phút.

– Dọn và xử lý dụng cụ đã sử dụng, nhiễm bẩn theo đúng quy định.

– Rửa tay khi kết thúc công việc và trước khi ra khỏi khu vực xét nghiệm.

## 6. Các bước thực hiện:

### 6.1. Chuẩn bị:

#### 6.1.1. Mẫu xét nghiệm và mẫu chứng

– Mẫu xét nghiệm:

Là mẫu dịch ngoáy hầu họng của bệnh nhân nghi nhiễm COVID-19. Phương pháp lấy mẫu tuân thủ Quyết định số 3638/QĐ-BYT ngày 30/07/2021 về việc ban hành Hướng dẫn tạm thời giám sát và phòng, chống COVID-19.

– Mẫu chứng:

+ Chứng âm chiết tách (Mo): là mẫu chiết tách từ nước tinh sạch (dùng làm chứng âm cho bước chiết tách).

+ Chứng âm (NC) và chứng dương (PC) kèm theo bộ kit

#### 6.1.2. Hoá chất-sinh phẩm

- Bộ kit chiết tách (không kèm theo kit): sử dụng máy tách chiết tự động
- Bộ SuperScrip<sup>TM</sup>III RT/Platinum Taq Mix.
- Bộ môi TIMOL



### **6.1.3. Trang thiết bị-dụng cụ**

- Tủ ATSH cấp 2.
- Máy real tim PCR được bảo trì, bảo dưỡng định kỳ.
- Máy ly tâm thường dành cho tube 0.2 ml.
- Máy ly tâm có tốc độ tối đa 14 000 vòng/phút.
- Máy trộn vortex.
- Các loại pipet man đã được hiệu chuẩn từ 10; 20; 100; 200 và 1000 $\mu$ l.
- Các loại đầu tip có lọc từ 10; 30; 100; 200 và 1000  $\mu$ l.
- Giá tích lạnh, găng tay không bột.

### **6.1.4. Điều kiện bảo quản và sử dụng**

#### **• Hóa chất-sinh phẩm**

- Tất cả sinh phẩm, hóa chất được bảo quản và sử dụng theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất.
- Sinh phẩm phản ứng real time RT-PCR được giữ ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **• Trang thiết bị và dụng cụ**

- Trang thiết bị được bảo quản và vận hành trong điều kiện nhiệt độ  $\leq 30^{\circ}\text{C}$  và độ ẩm  $< 80\%$ ; được bảo dưỡng và hiệu chuẩn theo quy định.
- Các tủ bảo quản sinh phẩm, hóa chất được theo dõi và ghi nhiệt độ hằng ngày.
- Dụng cụ tiêu hao được bảo quản trong kho, luôn thông thoáng. Khi sử dụng sẽ được xuất kho và bảo quản tại các khu vực xét nghiệm.

### **6.2. Kiểm soát chất lượng:**

Mẫu chứng luôn được sử dụng trong mỗi lần chạy phản ứng. Kết quả mẫu chứng phải đạt như sau:

- NC, Mo: không có tín hiệu huỳnh quang.
- PC: có tín hiệu huỳnh quang đường khuếch log và linear, với giá trị Ct được thu nhận trước chu kỳ thứ 38 của phản ứng.

### **6.3. Tiến hành xét nghiệm:**

Phiên bản: 1.0	Trang: 4/9
Ngày hiệu lực: 12.8.2020	

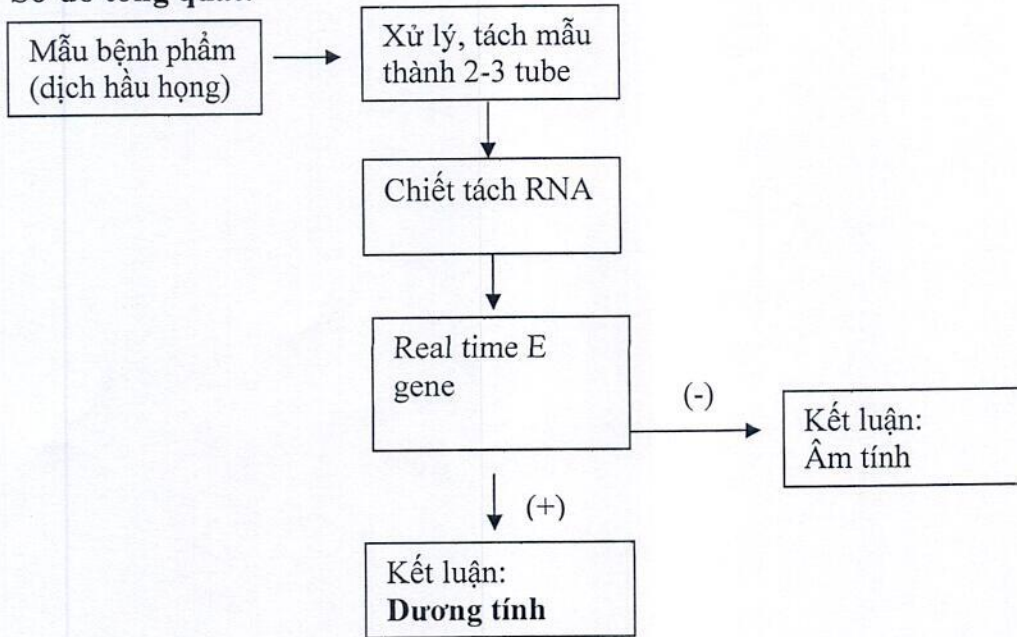




**QUI TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỊNH TÍNH SARS COV 2 BẰNG  
KỸ THUẬT REALTIME PCR(SINH PHẨM WHO)**

Mã số: QTKT - 04

**Sơ đồ tổng quát:**



Bước	Mô tả
1	<b>Tách chiết RNA (thực hiện trong tủ ATSH cấp II, phòng chiết tách axit nucleic):</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Thực hiện chiết tách RNA từ mẫu bệnh phẩm theo Quy trình hướng dẫn sử dụng máy tách chiết tự động.</li> <li>- Thực hiện chiết tách mẫu cùng với một chứng mock (chiết tách từ nước tinh sạch) để kiểm soát quá trình chiết tách.</li> <li>- Bảo quản mẫu RNA ở 4°C, trong vòng 1 tuần nếu sử dụng ngay; nếu không bảo quản ở nhiệt độ -70°C đến -80°C; thời hạn bảo quản 1 năm.</li> </ul>
2	<b>Thực hiện phản ứng real time RT-PCR</b>
2.1	<b>Pha dung dịch phản ứng:</b>
	Thao tác được thực hiện tại tủ thao tác PCR phòng chuẩn bị dd phản ứng.

Phiên bản: 1.0

Trang: 5/9

Ngày hiệu lực: 12.8.2020



**QUI TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỊNH TÍNH SARS COV 2 BẰNG  
KỸ THUẬT REALTIME PCR(SINH PHẨM WHO)**

Mã số: QTKT - 04

- Rã đông các hóa chất, sinh phẩm cần sử dụng, trộn nhẹ bằng vortex, ly tâm ngắn và xếp các hoá chất, sinh phẩm lên hộp tích lạnh.
- Ghi sơ đồ mẫu ứng với vị trí mẫu trên tấm plate
- Xác định số lượng phản ứng (n) và tính toán theo bảng sau:

TT	Thành phần	1 phản ứng	n: phản ứng
1	H <sub>2</sub> O	6.1 uL	6.1 x n
2	2x reaction	12.5 uL	12.5 x n
3	MgSO <sub>4</sub>	0.4 uL	0.4 x n
3	Prime/Probe mix	0.5 uL	0.5 x n
4	Enzyme mix	0.5 uL	0.5 x n
	Tổng	<b>20 uL</b>	
	RNA template	<b>5 uL</b>	

- Ghi sơ đồ mẫu và thành phần dung dịch phản ứng vào biểu mẫu
- Pha hỗn hợp phản ứng theo bảng đã tính toán trên.
- Trộn nhẹ dung dịch phản ứng bằng vortex, ly tâm nhanh.
- Chia dung dịch phản ứng vào tube theo sơ đồ mẫu.
- Ghi nhật ký sử dụng tủ an toàn sinh học.
- Chuyển tube dung dịch phản ứng qua phòng chiết tách để nạp mẫu

**2.2 Cho mẫu vào dung dịch phản ứng real time RT-PCR (thực hiện trong tủ ATSH cấp II, phòng chiết tách axit nucleic):**

- Cho 5 ul mẫu RNA vào giếng mẫu phản ứng theo sơ đồ, trộn đều mẫu với dung dịch phản ứng bằng cách hút trộn 3-4 lần.
- Cho 5 ul nước âm (kít) vào giếng chứng âm chứng âm theo sơ đồ, trộn đều.
- Cho 5 ul chứng dương (kít) vào các giếng chứng dương theo sơ đồ, trộn đều.
- Ghi nhật ký sử dụng tủ an toàn sinh học.
- Chuyển tube dung dịch phản ứng qua phòng máy PCR.

**2.3 Cài đặt và chạy mẫu trên máy Realtime PCR.**  
(thực hiện tại phòng máy PCR)

Phiên bản: 1.0

Trang: 6/9

Ngày hiệu lực: 12.8.2020



**QUI TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỊNH TÍNH SARS COV 2 BẰNG  
KỸ THUẬT REALTIME PCR(SINH PHẨM WHO)**

Mã số: QTKT - 04

- Ly tâm ngắn tube để kéo tất cả các dung dịch bám trên thành giếng xuống.
- Khởi động máy và cài đặt máy theo hướng dẫn sử dụng máy của nhà sản xuất.
- Đặt tên mẫu và bố trí sơ đồ mẫu.
- Cài đặt target gồm: E: FAM,
- Cài chương trình theo chu trình nhiệt:

Bước		Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút:giây)	Số chu kỳ
Phiên mã ngược (RT)		55°C	10:00	1
Bắt hoạt RT/hoạt hóa Taq		95°C	10:00	1
PCR	Biến tính	95°C	00:15	} 40
	Gắn môi, probe và kéo dài	60°C	00:45*	
	*: Thu tín hiệu huỳnh quang			
Giữ ở nhiệt độ		4°C	∞	

- Nhấn nút start để bắt đầu chạy máy.
- Kết thúc chương trình chạy, mở nắp, lấy tube ra,
- In kết quả và tắt máy.
- Ghi nhật ký sử dụng thiết bị Ghi nhật ký sử dụng thiết bị.

**3 Xử lý dụng cụ, chất thải sau xét nghiệm**

Xử lý dụng cụ và chất thải sau khi xét nghiệm theo hướng dẫn trong Sổ tay an toàn sinh học.

**6.4. Biện luận kết quả:**

- Mẫu dương tính khi có đường khuếch đại dạng log và linear, máy hiển thị giá trị ct (<40).
- Mẫu âm tính khi không có đường khuếch đại, máy không hiển thị giá trị ct mà hiển thị: non detectable.

Phiên bản: 1.0

Trang: 7/9

Ngày hiệu lực: 12.8.2020

# QUI TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỊNH TÍNH SARS COV 2 BẰNG KỸ THUẬT REALTIME PCR(SINH PHẨM WHO)

Mã số: QTKT - 04

- Mẫu nghi ngờ khi có đường khuếch đại rất muộn, không rõ ràng (giá trị ct>40). Đối với những mẫu này cần lặp lại xét nghiệm.

## 6.4.1. Đánh giá mẫu chứng:

Yêu cầu đối với các chứng:

- Chứng dương: Dương tính (có đường khuếch đại log, linear, ct <40) ở gene E .
- Chứng âm và chứng mock: Âm tính (không có đường khuếch đại, ct: non detectable).

## 6.4.2. Đánh giá mẫu xét nghiệm:

E gene	Kết luận
(-)	Âm tính SARS-CoV-2
(-)/(+)	Chiết tách lại mẫu
(+)	Dương tính SARS-CoV-2

## 6.5. Báo cáo kết quả

- In kết quả xét nghiệm ra bằng giấy.
- Ghi kết quả xét nghiệm vào Phiếu ghi chép xét nghiệm
- Phụ trách bộ phận xem xét kết quả xét nghiệm, đề nghị làm lại nếu kết quả không phù hợp. Ký tên xem xét vào phiếu xét nghiệm.
- Trả kết quả theo Quy trình báo cáo và trả kết quả xét nghiệm.
- Lưu hồ sơ

## 6.6. Xử lý mẫu sau xét nghiệm

- Lưu mẫu:
  - + Mẫu RNA dương: giữ ở nhiệt độ từ -70<sup>0</sup>C đến -80<sup>0</sup>C trong thời gian 6 tháng.
  - + Mẫu bệnh phẩm ban đầu (đối với mẫu dương): được giữ ở nhiệt độ từ -70<sup>0</sup>C đến -80<sup>0</sup>C trong thời gian 6 tháng.
  - + Đối với mẫu âm: thực hiện xử lý như rác thải lây nhiễm sau khi có kết quả.

Phiên bản: 1.0

Trang: 8/9

Ngày hiệu lực: 12.8.2020



**QUI TRÌNH XÉT NGHIỆM ĐỊNH TÍNH SARS COV 2 BẰNG  
KỸ THUẬT REALTIME PCR(SINH PHẨM WHO)**

Mã số: QTKT - 04

**7. Lưu ý bổ sung**

- Khi thực hiện kỹ thuật Real time RT-PCR, các bước: tách chiết RNA, chuẩn bị Master Mix, chạy PCR nên tiến hành ở các phòng, khu vực riêng biệt và duy trì luồng công việc một chiều để tránh nhiễm chéo.
- Các primer/probe phải giữ ở nhiệt độ đúng theo hướng dẫn của nhà sản xuất và trong điều kiện tối, chia nhỏ primer/probe để sử dụng, hạn chế rã đông primer và probe nhiều lần.
- Chọn đúng chương trình chạy máy (chu kỳ nhiệt) và cài đúng dye của primer/probe để tạo đúng sản phẩm PCR cần khuếch đại.
- Tránh tạo bọt khí khi phân phối dd phản ứng và mẫu vào giếng của plate.

**8. Tài liệu tham khảo:**

1. WHO. **Laboratory testing of human suspected cases of novel coronavirus (nCoV) infection.** WHO/2019-nCoV/laboratory/2020.1
2. Bộ Y tế, Quyết định 3638/QĐ-BYT ngày 30 tháng 7 năm 2021 ban hành Hướng dẫn tạm thời giám sát và phòng, chống bệnh COVID-19.

