

QUY TRÌNH N.520(TT21) ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG NHÂN VÀ KHÁNG THỂ KHÁNG CHUỖI KÉP (ANA & DsDNA)

KHÁNG THỂ KHÁNG NHÂN (ANA)

I. NGUYÊN LÝ

Xét nghiệm dựa trên phản ứng miễn dịch gắn enzyme gián tiếp theo các bước sau: Các kháng thể có mặt trong mẫu dương tính gắn với kháng nguyên phủ trên bề mặt của hai giếng phản ứng, hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Sau khi ủ, bước rửa đầu tiên sẽ loại bỏ các phân tử không gắn và gắn không đặc hiệu. Tiếp đó, chất cộng hợp enzyme được bổ sung sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên - kháng thể đã được cố định. Sau khi ủ, bước rửa thứ hai sẽ loại bỏ chất cộng hợp không gắn. Cơ chất enzyme tiếp tục được thêm vào giếng, quá trình thủy phân và tạo màu diễn ra trong thời gian ủ. Cường độ màu xanh dương tạo ra tỉ lệ thuận với nồng độ của phức hợp kháng nguyên-kháng thể và có thể đo bằng phương pháp quang học ở bước sóng 650 nm.

II. CHUẨN BỊ

1. Cán bộ thực hiện:

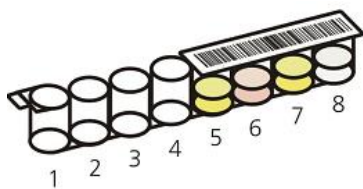
01 Bác sĩ hoặc 01 cán bộ đại học và 01 kỹ thuật viên chuyên ngành Hóa sinh.

2. Phương tiện, hóa chất:

Phương tiện xét nghiệm: máy xét nghiệm miễn dịch Alegria- hãng ORGENTEC/ Germany.

Hóa chất xét nghiệm gồm bộ xét nghiệm phát hiện ANA. Bộ xét nghiệm phát hiện ANA như sau:

Thanh thử Alegria gồm 8 giếng chứa các thành phần sau:



Giếng 1+ 2	Giếng trống (để pha loãng mẫu)
Giếng 3+ 4	Phủ kháng nguyên (giếng phản ứng)
Giếng 5	Mẫu chứng, màu vàng, chứa kháng thể đặc hiệu, PBS, BSA (Albumin huyết thanh bò), chất tẩy, chất bảo quản natri azide 0,09% và ProClin 300 0,05%.
Giếng 6	Chất cộng hợp enzyme, màu đỏ nhạt, chứa kháng thể kháng IgG người gắn HRP; PBS, BSA, chất tẩy, chất bảo quản ProClin 300 0,05%.

Giếng 7 Dung dịch pha loãng mẫu, màu vàng, chứa PBS, BSA, chất tẩy, chất bảo quản natri azide 0,09% và ProClin 300 0,05%.

Giếng 8 Cơ chất TMB, trong suốt, chứa 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin

Các kháng nguyên SS-A (52 và 60 kDa), SS-B, RNP-70, Sm, RNP/Sm, Scl-70, centromere B và Jo-1 (đã được tinh sạch) phủ sẵn trong các vi giếng

Mã hóa sản phẩm: ANAScreen

- Ngoài ra còn dung dịch hệ thống như:

+ Wash (1x20mL): Dung dịch rửa, chứa TRIS, detergent, chất bảo quản natri azide 0,09% (50x)

+ System fluid (1x2,5mL): Dung dịch hệ thống chứa acid (1000x).

- Bộ xét nghiệm cần được bảo quản trong bóng tối ở điều kiện 2-8°C. Không để hóa chất tiếp xúc với nhiệt, mặt trời hoặc ánh sáng mạnh trong suốt quá trình bảo quản và sử dụng.

Dụng cụ khác: + Máy Vortex; Pipet 10 µL;

+ Ống đông thể tích 1000 mL và 2500 mL

+ Nước cất hoặc nước khử ion

3. Người bệnh: Người bệnh được giải thích và tư vấn trước khi thực hiện XN, tốt nhất là nhịn ăn sáng và lấy máu vào buổi sáng.

4. Phiếu xét nghiệm: có đầy đủ thông tin về bệnh nhân bao gồm họ tên, tuổi, khoa phòng, chẩn đoán, tình trạng mẫu, tên BS chỉ định, ngày giờ chỉ định, ngày giờ lấy mẫu, các loại thuốc đã sử dụng (nếu có)...

III. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

1. Lấy mẫu bệnh phẩm và xử lý mẫu:

Bệnh phẩm phải được lấy đúng kỹ thuật vào ống xét nghiệm tiêu chuẩn. Sử dụng ống không chống đông (ống serum) hoặc sử dụng ống có chất chống đông Li-Heparine, EDTA.

- Bệnh phẩm được nhận từ các khoa lâm sàng và bộ phận lấy mẫu phòng khám. Nhân viên nhận mẫu lấy thông tin bệnh nhân từ phần mềm quản lý Bệnh viện, in và dán barcode vào ống bệnh phẩm, sau đó cho ly tâm 4000 vòng trong 5 phút trước khi tiến hành kỹ thuật.

- Bảo quản bệnh phẩm Huyết thanh và huyết tương: Mẫu ổn định trong ở 2-8°C trong vòng 5 ngày hoặc -20°C trong vòng 6 tháng. Chỉ đông lạnh một lần

Bảo quản chất chuẩn, QC sau khi hoàn nguyên ở nhiệt độ -20°C, khi tiến hành chạy phải để ở nhiệt độ phòng (20- 25°C) cho đến khi rã đông hoàn toàn và lắc đều trước khi tiến hành xét nghiệm.

2. Tiến hành kỹ thuật

Máy xét nghiệm, hóa chất đã được chuẩn trước khi thực hiện phân tích. Việc chuẩn xét nghiệm Anti-ANA ổn định trong vòng 28 ngày và cần thực hiện hiệu chuẩn mỗi khi thay đổi lô hóa chất. Kiểm tra chất lượng nằm trong giới hạn cho phép. Thông thường chạy nội kiểm (QC) 2 mức mỗi ngày: mức bình thường và không bình thường. Đối chiếu với luật về kiểm tra chất lượng nếu đạt thì tiến hành phân tích mẫu .

Định kỳ: Chuẩn lại và chạy 2 mức QC sau khi thay lô thuốc thử mới hoặc sau khi bảo dưỡng, sửa chữa máy do sự cố, thay thế trang thiết bị phân tích quan trọng. Ghi lại kết quả vào bảng theo dõi kết quả chuẩn máy xét nghiệm.

Đưa bệnh phẩm vào phân tích theo protocol của máy. Khi có kết quả thì phân tích và đối chiếu với phiếu xét nghiệm, trả, lưu kết quả vào hệ thống mạng, in phiếu kết quả xét nghiệm và trả kết quả cho người bệnh đúng thời gian quy định.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Giá trị tham chiếu:

Bình thường: Âm tính: Index < 1,0

Nghi ngờ: Index 1,0 – 1,2

Dương tính: Index > 1,2

Các phạm vi tham chiếu giới hạn bệnh lý và giới hạn bình thường ở trên đối với kháng thể có trong các mẫu bệnh phẩm chỉ có giá trị khuyến cáo. Mỗi phòng xét nghiệm nên tự thiết lập các phạm vi riêng dựa theo ISO 15189 hoặc các hướng dẫn khác được áp dụng trong phòng thí nghiệm.

3. Ý nghĩa lâm sàng

- Các bệnh về mô liên kết (CTD) là một nhóm các bệnh tự miễn, đặc trưng bởi sự xuất hiện các kháng thể kháng nhân (ANA) trong máu của bệnh nhân. ANA là một lớp tự kháng thể đặc hiệu, có khả năng gắn và phá hủy cấu trúc nhất định bên trong nhân các tế bào. Các kháng thể này liên quan tới cơ chế bệnh sinh, đồng thời đóng vai trò cơ sở trong chẩn đoán và điều trị CTD. ANA được phân thành 2 nhóm chính:

- Tự kháng thể kháng DNA và histone.

- Tự kháng thể kháng các kháng nguyên có khả năng chiết xuất từ nhân (ENA): Sm, ribonucleoproteins (RNP), SSA/Ro, SSB/La, Scl-70, Jo-1 và PM1.

- Tự kháng thể kháng DNA và histone bao gồm các kháng thể kháng DNA sợi đơn và DNA sợi đôi (ssDNA và dsDNA). Sự gia tăng đáng kể nồng độ kháng thể kháng dsDNA có giá trị xác nhận trong chẩn đoán Lupus ban đỏ hệ thống (SLE). Kháng thể kháng histone là chỉ điểm cho lupus do thuốc. Các kháng thể kháng dsDNA, histone, protein có trọng lượng phân tử 70kD của phức hợp U1-snRNP (RNP70) và Sm có liên quan mật thiết tới bệnh SLE.

- Xét nghiệm được dùng cho mục đích hỗ trợ chẩn đoán. Chẩn đoán lâm sàng xác định không nên chỉ dựa vào kết quả của một xét nghiệm đơn lẻ, mà nên được quyết định bởi bác sĩ sau khi có tất cả các kết quả thăm khám lâm sàng và xét nghiệm liên quan đến toàn bộ tình trạng của bệnh nhân. Ngoài ra, phác đồ điều trị nên được áp dụng riêng cho từng bệnh nhân cụ thể.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Không quan sát thấy hiện tượng nhiễu khi sử dụng mẫu huyết thanh hoặc huyết tương vỡ hồng cầu (hemoglobin ở nồng độ lên tới 1000 mg/dL) hoặc mẫu nhiễm mỡ (triglyceride ở nồng độ lên tới 3 g/dL) hoặc chứa bilirubin ở nồng độ lên tới 40 mg/dL. Đồng thời, cũng không quan sát thấy hiện tượng nhiễu khi sử dụng các mẫu bệnh phẩm chứa chất chống đông máu (Citrate, EDTA, Heparine). Tuy nhiên, vì lo ngại do thực tiễn, khuyến cáo tránh sử dụng các mẫu vỡ hồng cầu hoặc tăng lipid

ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG CHUỖI KÉP (DsDNA)

I. NGUYÊN LÝ

Xét nghiệm dựa trên phản ứng miễn dịch gắn enzyme gián tiếp theo các bước sau: Các kháng thể có mặt trong mẫu dương tính gắn với kháng nguyên phủ trên bề mặt của hai giếng phản ứng, hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Sau khi ủ, bước rửa đầu tiên sẽ loại bỏ các phân tử không gắn và gắn không đặc hiệu. Tiếp đó, chất cộng hợp enzyme được bổ sung sẽ gắn với phức hợp kháng nguyên - kháng thể đã được cố định. Sau khi ủ, bước rửa thứ hai sẽ loại bỏ chất cộng hợp không gắn. Cơ chất enzyme tiếp tục được thêm vào giếng, quá trình thủy phân và tạo màu diễn ra trong thời gian ủ. Cường độ màu xanh dương tạo ra tỉ lệ thuận với nồng độ của phức hợp kháng nguyên- kháng thể và có thể đo bằng phương pháp quang học ở bước sóng 650 nm trên hệ thống xét nghiệm miễn dịch ELISA (Enzymelinked immunosorbant assay)

II. CHUẨN BỊ

1. Cán bộ thực hiện:

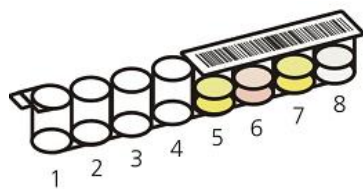
bác sĩ hoặc 01 cán bộ đại học và 01 kỹ thuật viên chuyên ngành Hóa sinh.

2. Phương tiện, hóa chất:

Phương tiện xét nghiệm: máy xét nghiệm miễn dịch Alegria- hãng ORGENTEC/ Germany.

Thuốc thử sẵn sàng sử dụng:

Bộ xét nghiệm phát hiện dsDNA như sau:



Thanh thử Alegria gồm 8 giếng chứa các thành phần sau:

Giếng 1 + Giếng trống và không phủ (để pha loãng mẫu)
2

Giếng 3 + Được phủ kháng nguyên (giếng phản ứng)
4

Giếng 5 Mẫu chứng, màu vàng, chứa kháng thể đặc hiệu, PBS, BSA, chất tẩy, chất bảo quản natri azide 0,09% và ProClin 300 0,05%.

Giếng 6 Chất cộng hợp enzyme, màu đỏ nhạt, chứa kháng thể kháng IgG người gắn HRP; PBS, BSA, chất tẩy, chất bảo quản ProClin 300 0,05%.

Giếng 7 Dung dịch pha loãng mẫu, màu vàng, chứa PBS, BSA, chất tẩy, chất bảo quản natri azide 0,09% và ProClin 300 0,05%.

Giếng 8 Cơ chất TMB, trong suốt, chứa 3,3', 5,5' - Tetramethylbenzidin

DNA sợi kép tái tổ hợp (dsDNA, người) phủ sẵn trong các vi giếng

Mã sản phẩm trên mã vạch:
dsDNA Screen

- Ngoài ra còn dung dịch hệ thống như:

+ Wash (1x20mL): Dung dịch rửa, chứa TRIS, detergent, chất bảo quản natri azide 0,09% (50x)

+ System fluid (1x2,5mL): Dung dịch hệ thống chứa acid (1000x).

- Bộ xét nghiệm cần được bảo quản trong bóng tối ở điều kiện 2-8°C. Không để hóa chất tiếp xúc với nhiệt, mặt trời hoặc ánh sáng mạnh trong suốt quá trình bảo quản và sử dụng. Bảo quản thanh thử Alegria (đậy kín và khô ráo) trong túi có khóa được cung cấp. Dung dịch Wash Buffer và System Fluid sau khi pha loãng ổn định trong tối thiểu 30 ngày khi được bảo quản ở 2-8°C.

Dụng cụ khác: + Máy Vortex; Pipet 10 µL;

+ Ống đong thể tích 1000 mL và 2500 mL

+ Nước cất hoặc nước khử ion

3. Người bệnh: Người bệnh được giải thích và tư vấn trước khi thực hiện XN, tốt nhất là nhịn ăn sáng và lấy máu vào buổi sáng.

4. Phiếu xét nghiệm: có đầy đủ thông tin về bệnh nhân bao gồm họ tên, tuổi, khoa phòng, chẩn đoán, tình trạng mẫu, tên BS chỉ định, ngày giờ chỉ định, ngày giờ lấy mẫu, các loại thuốc đã sử dụng (nếu có)...

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Lấy mẫu bệnh phẩm và xử lý mẫu:

Bệnh phẩm phải được lấy đúng kỹ thuật vào ống xét nghiệm tiêu chuẩn. Sử dụng ống không chống đông (ống serum) hoặc sử dụng ống có chất chống đông Li-Heparine, EDTA.

- Bệnh phẩm được nhận từ các khoa lâm sàng và bộ phận lấy mẫu phòng khám. Nhân viên nhận mẫu lấy thông tin bệnh nhân từ phần mềm quản lý Bệnh viện, in và dán barcode vào ống bệnh phẩm, sau đó cho ly tâm 4000 vòng trong 5 phút trước khi tiến hành kỹ thuật.

Bảo quản bệnh phẩm Huyết thanh và huyết tương: Mẫu ổn định trong 8 giờ ở 15-25°C, 1 ngày ở 2-8°C, 28 ngày ở -20°C. Chỉ đông lạnh một lần

Bảo quản chất chuẩn, QC sau khi hoàn nguyên ở nhiệt độ -20°C, khi tiến hành chạy phải để ở nhiệt độ phòng (20- 25°C) cho đến khi rã đông hoàn toàn và lắc đều trước khi tiến hành xét nghiệm.

2. Tiến hành kỹ thuật

Máy xét nghiệm, hóa chất đã được chuẩn trước khi thực hiện phân tích. Việc chuẩn xét nghiệm Anti- dsDNA ổn định trong vòng 28 ngày và cần thực hiện hiệu chuẩn mỗi khi thay đổi lô hóa chất. Kiểm tra chất lượng nằm trong giới hạn cho phép. Thông thường chạy nội kiểm (QC) 2 mức mỗi ngày: mức bình thường và không bình thường. Đối chiếu với luật về kiểm tra chất lượng nếu đạt thì tiến hành phân tích mẫu .

Định kỳ: Chuẩn lại và chạy 2 mức QC sau khi thay lô thuốc thử mới hoặc sau khi bảo dưỡng, sửa chữa máy do sự cố, thay thế trang thiết bị phân tích quan trọng. Ghi lại kết quả vào bảng theo dõi kết quả chuẩn máy xét nghiệm.

Đưa bệnh phẩm vào phân tích theo protocol của máy. Khi có kết quả thì phân tích và đối chiếu với phiếu xét nghiệm, trả, lưu kết quả vào hệ thống mạng, in phiếu kết quả xét nghiệm và trả kết quả cho người bệnh đúng thời gian quy định.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Giá trị tham chiếu: Bình thường Anti- dsDNA < 25 U/mL

2. Ý nghĩa lâm sàng:

Bệnh tự miễn là do có sự hình thành các kháng thể tự miễn kháng lại các thành phần mô cơ quan bao gồm nhân tế bào, bào tương, màng tế bào... gây tổn thương các cơ quan theo các cơ chế khác nhau. Bệnh tự miễn chia làm 2 nhóm chính: bệnh tự miễn đặc hiệu cơ quan và bệnh tự miễn hệ thống. Sự lưu hành các kháng thể tự miễn trong bệnh lý tự miễn là rất đa dạng và phức tạp về cả cấu trúc, nguồn gốc, vai trò trong sinh bệnh học của bệnh tự miễn. Các kháng thể tự miễn hay gặp: ANA, dsDNA, ssDNA, Scl-70, Ro/SSA, La/SSB, ANCA, kháng thể kháng phospholipid... Việc tìm hiểu về sự lưu hành và vai trò của các kháng thể tự miễn trong cơ chế bệnh sinh bệnh tự miễn từ đó tìm hiểu giá trị chẩn đoán và tiên lượng của các kháng thể này là

rất quan trọng trong thực hành lâm sàng và nghiên cứu trong chuyên ngành dị ứng và miễn dịch lâm sàng.

Các tự kháng thể kháng dsDNA có tính đặc hiệu và được dùng trong chẩn đoán bệnh lupus ban đỏ hệ thống (SLE), nồng độ các tự kháng thể tăng lên trong quá trình tiến triển của bệnh. Các hướng dẫn ACR trong sàng lọc, điều trị và quản lý viêm thận do lupus được công bố gần đây khuyến cáo sử dụng xét nghiệm kháng thể kháng dsDNA để theo dõi viêm thận do lupus, định kỳ hàng tháng đối với những bệnh nhân mang thai bị viêm tiểu cầu thận mới điều trị, định kỳ 3 tháng đối với những bệnh nhân viêm thận tiến triển mới điều trị hoặc bệnh nhân mang thai đã từng có tiền sử viêm thận, và định kỳ sáu tháng đối với những bệnh nhân từng/chưa từng bị viêm thận tiến triển trước đó, hoặc đang viêm thận.

Những bệnh nhân mắc bệnh SLE không có kháng thể kháng dsDNA thường sản sinh kháng thể kháng ssDNA. Cũng tương tự, kháng thể kháng Sm đặc hiệu cao cho SLE nhưng chỉ xuất hiện trong 10% - 30% các trường hợp bệnh SLE.

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Không quan sát thấy hiện tượng nhiễu khi sử dụng mẫu huyết thanh hoặc huyết tương vỡ hồng cầu (hemoglobin ở nồng độ lên tới 1000 mg/dL) hoặc mẫu nhiễm mỡ (triglyceride ở nồng độ lên tới 3 g/dL) hoặc chứa bilirubin ở nồng độ lên tới 40 mg/dL. Đồng thời, cũng không quan sát thấy hiện tượng nhiễu khi sử dụng các mẫu bệnh phẩm chứa chất chống đông máu (Citrate, EDTA, Heparine). Tuy nhiên, vì lý do thực tiễn, khuyến cáo tránh sử dụng các mẫu vỡ hồng cầu hoặc tăng lipid