UBND THÀNH PHỐ HÀ NỘI
TRƯỜNG CAO ĐẲNG Y TẾ HÀ NỘI

GIÁO TRÌNH

(Ban hành kèm theo Quyết định số: 1107 /QĐ-CĐYTN ngày 22 tháng 11 năm 2021 của Trường Cao đẳng Y tế Hà Nội)

MÔ ĐUN: KÝ SINH TRÙNG NÂNG CAO
NGÀNH: KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM Y HỌC
TRÌNH ĐỘ: CAO ĐẲNG

Hà Nội, năm 2021

TUYÊN BỐ BẢN QUYỀN

Tài liệu này thuộc loại sách giáo trình nên các nguồn thông tin có thể được phép dùng nguyên bản hoặc trích dùng cho các mục đích về đào tạo và tham khảo.

Mọi mục đích khác mang tính lệch lạc hoặc sử dụng với mục đích kinh doanh thiếu lành mạnh sẽ bị nghiêm cấm.

LỜI GIỚI THIỆU

Giáo trình **Ký sinh trùng nâng cao** được biên soạn cho sinh viên ngành cao đẳng xét nghiệm y học với mục đích cung cấp cho sinh viên một số kiến thức mở rộng về ký sinh trùng gây bệnh.

Giáo trình được chia thàh hai phần:

Phần lý thuyết: Cung cấp những kiến thức nâng cao về đặc điểm và các phương pháp chẩn đoán ký sinh trùng gây bệnh

Phần thực hành: Mô tả một số kỹ thuật xét nghiệm ký sinh trùng nâng cao được sử dụng trong chẩn đoán bệnh do ký sinh trùng.

Các tác giả là những người có kinh nghiệm lâm sàng lâu năm cũng như kinh nghiệm giảng dạy về môn Ký sinh trùng y học, hy vọng rằng cuốn sách này sẽ cung cấp những thông tin có giá trị cho sinh viên nhằm giúp sinh viên có kiến thức về thực tiễn khả năng gây bệnh của ký sinh trùng, lựa chọn được những kỹ thuật chẩn đoán xét nghiệp phù hợp với từng loại ký sinh trùng, giúp cho việc phòng, chữa bệnh đạt hiệu quả.

Các tác giả đã biên soạn cuốn giáo trình này với tinh thần trách nhiệm cao, song cũng không tránh khỏi những thiếu sót. Chúng tôi rất mong nhận được sự góp ý của các bạn đồng nghiệp và độc giả để cuốn giáo trình được hoàn thiện hơn.

Xin trân trọng cảm ơn!

.....ngày.....tháng.....

CÁC TÁC GIẢ

THAM GIA BIÊN SOẠN

1. Chủ biên ThS. Nguyễn Thị Hồng Ngọc

2. ThS. Hà Thị Nguyệt Minh

3. TS. Bùi Huy Tùng

MỤC LỤC

TUYÊN BỐ BẢN QUYỀN 2
LỜI GIỚI THIỆU.....3
THAM GIA BIÊN SOẠN.....4
GIÁO TRÌNH MÔ ĐUN KÝ SINH TRÙNG NÂNG CAO.....6
PHẦN LÝ THUYẾT.....8
BÀI 1: KỸ THUẬT MIỄN DỊCH VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ 8
TRONG CHẨN ĐOÁN KÝ SINH TRÙNG 8
BÀI 2. KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT KHÁNG THUỐC.....25
BÀI 3. MỘT SỐ KỸ THUẬT NHUỘM VÀ NUÔI CẤY CHẨN ĐOÁN VI NẤM...40
PHẦN THỰC HÀNH 49
BÀI 4: KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN BẢO QUẢN TRỨNG GIUN SÁN.....49
BÀI 5: KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN BỌ GẬY VÀ MUỖI *ANOPHELES*.....59
BÀI 6: KỸ THUẬT ĐỊNH DANH BỌ GẬY VÀ MUỖI *ANOPHELES*.....69
BÀI 7. KỸ THUẬT ĐÁNH GIÁ MẬT ĐỘ KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT 76
BÀI 8. KỸ THUẬT NUÔI CẤY CHẨN ĐOÁN VI NẤM.....84
HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG GIÁO TRÌNH 96
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....97

GIÁO TRÌNH MÔ ĐUN KÝ SINH TRÙNG NÂNG CAO

Tên mô đun: Ký sinh trùng nâng cao

Mã mô đun: XN 15B

Vị trí, tính chất, ý nghĩa và vai trò của mô đun:

- Vị trí: là mô đun số 31 trong chương trình đào tạo kỹ thuật viên xét nghiệm trình độ cao đẳng.

- Tính chất: mô đun Ký sinh trùng nâng cao là mô tự chọn trong khối kiến thức chuyên ngành trong chương trình đào tạo kỹ thuật viên xét nghiệm y học trình độ cao đẳng.

- Ý nghĩa và vai trò của mô đun: mô đun cung cấp những kiến thức nâng cao về các phương pháp chẩn đoán bệnh do một số ký sinh trùng gây ra phục vụ cho công tác điều trị bệnh và phòng bệnh trong cộng đồng.

Mục tiêu mô đun

* Kiến thức

- Trình bày được nguyên lý của một số kỹ thuật miễn dịch và sinh học phân tử trong chẩn đoán ký sinh trùng.
- Trình được các khái niện về ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc và các phương pháp chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc.
- Trình bày được một số phương pháp nhuộm và nuôi cấy trong chẩn đoán vi nấm gây bệnh và hình thể một số vi nấm hoại sinh.

*** Về kỹ năng:**

- Làm được tiêu bản để lưu trữ và định danh một số loại ký sinh trùng
- Thực hiện được một số kỹ thuật đánh giá mật độ ký sinh trùng sốt rét
- Thực hiện và nhận định kết quả một số kỹ thuật nuôi cấy vi nấm.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm:**

- Nghiêm túc, cẩn thận, sáng tạo vận dụng kiến thức đã học được về đặc điểm sinh học, chu kỳ phát triển, tác hại, các biện phòng bệnh do các loài ký sinh trùng gây ra để giải quyết các vấn đề trong học tập.
- Chứng minh được năng lực làm việc độc lập và phối hợp nhóm để giải quyết các vấn đề học tập. Thận trong, tỉ mỉ, nghiêm túc phối hợp, hướng dẫn, giám sát và đánh giá chất lượng công việc sau khi hoàn thành và kết quả thực hiện của các thành viên trong nhóm.
- Tuân thủ đúng các quy định về y đức, các quy chế chuyên môn, các quy định của pháp luật liên quan đến lĩnh vực xét nghiệm y học và các quy trình kỹ thuật của ngành y tế để đảm bảo an toàn cho người và thiết bị trong quá trình học tập.

Nội dung và phương pháp đánh giá mô đun:

1. Nội dung của mô đun

STT	Tên bài	Số giờ			
		Tổng	Lý thuyết	Thực hành	Kiểm tra
1	Kỹ thuật miễn dịch và sinh học phân tử trong chẩn đoán ký sinh trùng	5	5		
2	Ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc	5	5		
3	Một số kỹ thuật nhuộm và nuôi cấy chẩn đoán vi nấm	4	4		
	Kiểm tra	1			1
4	Kỹ thuật làm tiêu bản bảo quản trứng giun sán	5		5	
5	Kỹ thuật làm tiêu bản bọ gậy và muỗi Anopheles	5		5	
6	Kỹ thuật định danh bọ gậy và muỗi Anopheles	5		5	
7	Kỹ thuật đánh giá mật độ ký sinh trùng sốt rét	10		10	
8	Kỹ thuật nuôi cấy chẩn đoán vi nấm	4		4	
	Kiểm tra				1
Tổng		**45**	**14**	**29**	**2**

2. Phương pháp đánh giá mô đun

- Các kiến thức và kỹ năng trên sẽ được đánh giá qua các bài kiểm tra định kỳ và bài thi kết thúc môn học. Sinh viên đủ điều kiện dự thi nếu không nghỉ quá 20% giờ học lý thuyết, tham gia đầy đủ giờ học thực hành và điểm trung bình chung các điểm kiểm tra đạt ≥ 5,0 (theo thang điểm 10).
- Sinh viên được đánh giá đạt mô đun nếu Điểm tổng kết môn học đạt ≥ 4,0 (theo thang điểm 10).

Nội dung	Hệ số 1	Hệ số 2	Thi
Hình thức	Tự luận/ Trắc nghiệm	Thực hành	Thực hành
Số lượng	1	1	1

PHẦN LÝ THUYẾT

BÀI 1: KỸ THUẬT MIỄN DỊCH VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ TRONG CHẨN ĐOÁN KÝ SINH TRÙNG

MỤC TIÊU

*** Kiến thức:**

1. Trình bày được nguyên nguyên lý và các kỹ thuật miễn dịch học trong chẩn đoán ký sinh trùng.

2. Trình bày được nguyên lý và các kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán ky sinh trùng.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm:**

3. Nghiêm túc, cẩn thận, sáng tạo trong việc vận dụng kiến thức được học để giải quyết vấn đề trong học tập.

4. Chứng minh được khả năng làm việc độc lập, làm việc nhóm để giải quyết vấn đề trong quá trình học tập

NỘI DUNG

- Ký sinh trùng sau khi xâm nhập vào cơ thể bệnh nhân có khả năng kích thích cơ thể sản xuất ra kháng thể đặc hiệu. Vì vậy, các nguyên lý chung về miễn dịch học đều có thể áp dụng được đối với các bệnh ký sinh trùng.

- Kỹ thuật miễn dịch được sử dụng trong các trường hợp mà phương pháp trực tiếp không thể làm được như:

+ Giai đoạn mới nhiễm: KST còn non, chưa đẻ trứng (sán lá gan, sán máng).

+ Trong giai đoạn mãn tính, KST đóng kén như Toxoplasma.

+ Mật độ ký sinh thấp như Trypanosoma.

+ KST nằm trong nội tạng sâu như bệnh amíp ở gan, gạo heo (lợn) ở cơ, não.

+ Ngõ cụt ký sinh như hội chứng ấu trùng di chuyển, KST ở dạng ấu trùng, không bao giờ tiến đến giai đoạn trưởng thành và không bao giờ hoàn tất chu trình phát triển như Toxocara sp.

- Trong nhiều trường hợp, huyết thanh miễn dịch học tỏ ra thực tế hơn, nhất là trong các trường hợp mà cần lấy bệnh phẩm bằng kỹ thuật xâm lấn.

1. Kỹ thuật miễn dịch trong chẩn đoán ký sinh trùng

1.1. Nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch học

Phương pháp miễn dịch học áp dụng trong chẩn đoán bệnh KST bao gồm nhiều kỹ thuật như kết tủa, điện di, gắn bổ thể, ngưng kết, miễn dịch huỳnh quang, miễn dịch phóng xạ, miễn dịch men.

Trước đây, kỹ thuật miễn dịch chỉ dựa vào kháng nguyên để phát hiện và đo lượng kháng thể luân lưu trong máu và các dịch sinh học. ðộ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm này tùy thuộc chủ yếu vào chất lượng của kháng nguyên, nếu kháng nguyên thô thì cho nhiều phản ứng chéo, dương giả, kết quả dương tính không cho biết được bệnh đang mắc hay đã qua, vì kháng thể giảm rất chậm, từ vài tháng đến cả năm. Vì vậy, việc biện luận kết quả gặp nhiều khó khăn và cần thận trọng.

Vài năm gần đây, chúng ta có những bộ thử nghiệm phát hiện kháng nguyên để chẩn đoán một số bệnh đơn bào như bệnh do *Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Cryptosporidium parvum, Trichomonas vaginalis* và bệnh giun chỉ *Wuchereria,* sán máng *Schistosoma sp.*

So với nhóm trên, các kỹ thuật phát hiện kháng nguyên có giá trị chẩn đoán, kết quả dương tính xác định bệnh đang có.

1.2. Phản ứng miễn dịch huỳnh quang

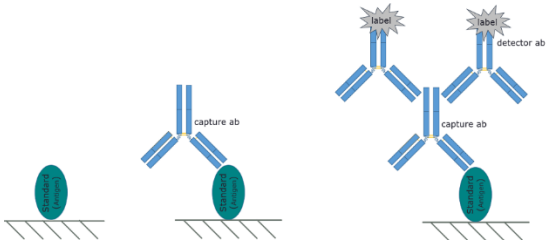
- Nguyên lý: Những thuốc nhuộm huỳnh quang như Fluorescein, Rhodamin có thể kết hợp với kháng thể mà không phá hủy tính chất đặc hiệu của kháng thể. Kháng thể liên hợp ấy có khả năng kết hợp với kháng nguyên và phức hợp kháng nguyên - kháng thể có thể quan sát ở kính hiển vi huỳnh quang.

- Phương pháp trực tiếp: Kháng thể được liên hợp với thuốc nhuộm huỳnh quang rồi cho tác dụng với kháng nguyên. Ví dụ trong chẩn đoán vi khuẩn tả sau 6 - 8 giờ nuôi cấy ở nước pepton kiềm, làm một phiến phết rồi nhuộm với kháng huyết thanh liên hợp với Fluorescein. Quan sát ở kính hiển vi huỳnh quang, ta phát hiện thấy khuẩn tả phát huỳnh quang xanh lục nếu mầu phân dương tính.

- Phương pháp gián tiếp: Kháng thể được cho tác dụng trực tiếp với kháng nguyên rồi cho kết hợp với kháng globulin người liên hợp với Fluorescein. Trước hết cho kháng nguyên cố định lên tiêu bản rồi cho tác dụng với huyết thanh bệnh nhân, rửa để loại bỏ kháng thể thừa sau đó nhỏ một giọt globulin người gắn Fluorescein rồi quan sát ở kính hiển vi huỳnh quang. Phương pháp này được sử dụng để chẩn đoán bệnh giang mai (phản ứng FTA - Abs), bệnh tự miễn... Phương pháp gián tiếp có nhiều ưu điểm như: Sự phát huỳnh quang mạnh hơn, tiết kiệm được thời gian nếu nhiều huyết thanh được thử nghiệm cùng một lúc.

1.3. Phản ứng miễn dịch enzym (ELISA)

ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay) là một phương pháp sinh hoá sử dụng chủ yếu trong miễn dịch học để phát hiện sự hiện diện của một kháng thể hoặc kháng nguyên trong một mẫu.



Hình 1: Nguyên lý ELISA

Nguyên lý của kỹ thuật ELISA là dựa vào tính đặc hiệu kháng nguyên - kháng thể và được thực hiện bằng những bước cơ bản sau: Kháng nguyên - antigen (KN) hoặc Kháng thể - antibody (KT) đã biết được gắn trên một giá thể rắn, sau đó cho mẫu có chứa kháng thể - antibody (KT) hoặc kháng nguyên (KN) cần tìm vào giếng. Bổ sung thêm kháng thể có gắn với ezyme. Bước cuối cùng thêm cơ chất (substance), enzyme sẽ biến đổi cơ chất này và tạo tín hiệu màu có thể xác định được bằng máy đo huỳnh quang.

1.3.1. ELISA trực tiếp (direct ELISA)

Phương pháp này thường sử dụng trong ELISA định tính, ít dùng trong định lượng. Phương pháp này có ưu điểm là chỉ cần một lần ủ do đó tiết kiệm thời gian và tối thiểu được việc kiểm soát các điều kiện trong quá trình thực hiện (thay đổi nhiệt độ và buffer cho mỗi lần ủ, tính thời gian…). Tuy nhiên, nhược điểm của nó là nhuộm màu nền (background staining) cao do sự liên kết không đặc hiệu của kháng thể với bề mặt rắn và các protein cố định trên bề mặt rắn. Việc đánh dấu từng loại kháng thể sử dụng cho mỗi kháng nguyên cũng khá tốn kém, nhất là khi phải chẩn đoán một số lượng lớn các loại kháng nguyên khác nhau.

1.3.2. ELISA gián tiếp (indirect ELISA)

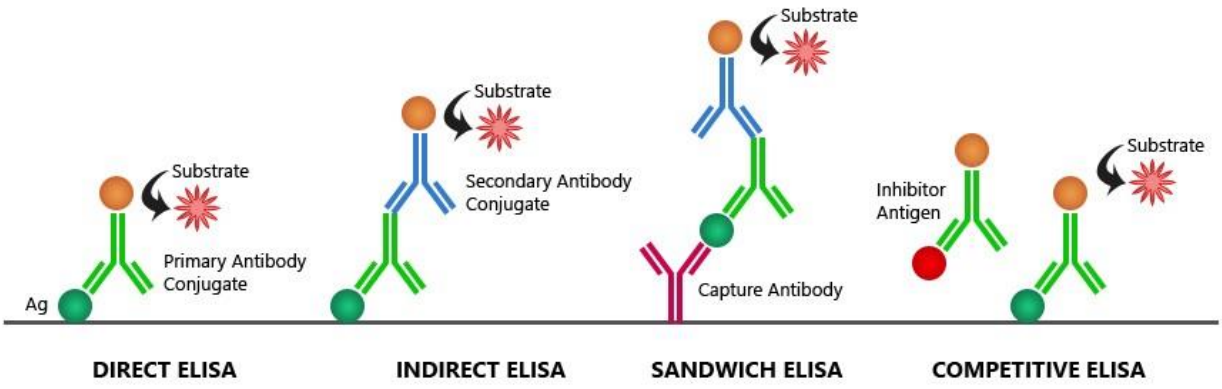
Ưu điểm của phương pháp này là độ nhạy cao chỉ cần tạo một loại kháng kháng thể mang enzyme để nhận biết cho nhiều kháng nguyên khác nhau. Tuy nhiên nhược điểm của nó là tăng số bước thực hiện do đó làm tăng việc kiểm soát các điều kiện, quá trình thực hiện xét nghiệm và kéo dài thời gian chẩn đoán.

1.3.3. ELISA sandwich

Phương pháp này có khá nhiều ưu điểm vượt trội, thứ nhất là độ nhạy cao giảm được nhuộm màu nền và các phản ứng không đặc hiệu do đã loại bỏ được hầu hết các thành phần tạp, phản ứng được thực hiện dễ dàng hơn.

1.3.4. ELISA cạnh tranh (competitive ELISA)

ELISA cạnh tranh là phương pháp ELISA rất hiệu quả cho định lượng các yếu tố hiện diện trong mẫu với lượng nhỏ. ELISA cạnh tranh sử dụng một lượng kháng nguyên cùng loại với kháng nguyên mà ta muốn định lượng trong mẫu (kháng nguyên cạnh tranh) cho phản ứng miễn dịch với cùng một loại kháng thể đặc hiệu cố định trên mặt rắn, sau đó đo lượng kháng nguyên cạnh tranh này thông qua hoạt tính enzyme được liên kết với nó. Kháng nguyên cạnh tranh càng hiện diện nhiều cho biết loại kháng nguyên đó trong mẫu càng ít và ngược lại.



Hình 2: Các phương pháp kỹ thuật ELISA

1.4. Phản ứng miễn dịch phóng xạ (RIA)

Nguyên lý: Dùng đồng vị phóng xạ như Thymidin H3 Cacbon 14, I125... đánh dấu kháng nguyên hoặc kháng thể để theo dõi phản ứng kết hợp kháng nguyên kháng thể.

Có thể xác định vị trí của kháng nguyên (hoặc kháng thể) đã đánh dấu đồng vị phóng xạ bằng cách cho nhũ tương ảnh lên trên tiêu bản tổ chức học, sau đó phát hiện bằng các phương pháp chụp ảnh thông thường. Để phát hiện và đo lường đồng vị phóng xạ trong môi trường lỏng, ví dụ các đồng vị phát xạ beta (như thymidin H3, Cacbon C14), cần dùng một dung dịch nhấp nháy và đo trong máy đếm tự động. Phương pháp đồng vị phóng xạ không những có thể khu trú vị trí kết hợp một cách chính xác mà còn làm tăng độ nhạy cảm phản ứng lên hàng nghìn lần.

1.5. Kỹ thuật sắc ký miễn dịch

Nguyên lý: Phức hợp kháng kháng thể gắn chất màu được phân bố đều trên bản giấy sắc ký. Kháng nguyên đặc thù của vi sinh vật được gắn cố định tại "vạch phản ứng". Khi nhỏ huyết thanh cần xác định kháng thể lên bản sắc ký, kháng thể đặc hiệu (nếu có) trong huyết thanh sẽ kết hợp với kháng kháng thể gắn màu, phức hợp miễn dịch kháng thể - kháng kháng thể gắn màu này di chuyển trên giấy sắc ký sẽ bị giữ lại tại "vạch phản ứng" do kháng thể kết hợp với kháng nguyên vi sinh vật, kết quả "vạch phản ứng" hiện màu. Nếu trong huyết thanh không có kháng thể đặc hiệu, ở "vạch phản ứng" kháng nguyên không thể giữ được kháng kháng thể gắn màu, vì vậy không hiện màu.

2. Kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán ký sinh trùng

2.1. Nguyên lý của kỹ thuật sinh học phân tử

Các xét nghiệm dựa vào kính hiển vi và huyết thanh có nhiều giới hạn làm các nhà ký sinh trùng học hướng đến phương pháp khuếch đại gene được thực hiện bằng kỹ thuật PCR. Bên cạnh PCR truyền thống, bao gồm cả Nested và Multiplexed PCR, chúng ta đã thấy việc thực hiện Real-Time PCR (RT-PCR) để phát hiện một vài trường hợp nhiễm ký sinh trùng. Kỹ thuật mới hơn như kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt cấu trúc vòm và xét nghiệm dựa vào Luminex cũng đã nổi lên như là các hướng tiếp cận mới để chẩn đoán các bệnh ký sinh trùng.

Các phương pháp tiếp cận sinh học phân tử dựa trên acidnucleic biểu hiện độ đặc hiệu và độ nhạy tuyệt vời hơn các xét nghiệm chẩn đoán hiện có. Chúng cho phép phát hiện các mẫu nhiễm ký sinh trùng với mật độ rất thấp bao gồm các bệnh nhân không có triệu chứng. Ngoài ra, Multiplexed PCR cho phép phát hiện nhiều trình tự trong cùng một tube phản ứng cung cấp sự hữu ích trong chẩn đoán nhiễm một vài ký sinh trùng cùng lúc.

2.2. Real – Time PCR (RT-PCR)

RT-PCR không giống như PCR thông thường, cho phép định lượng nồng độ khuôn mẫu ban đầu thông qua việc dùng hóa chất phát huỳnh quang khác nhau, như Sybergreen, Taqman probes, huỳnh quang cộng hưởng truyền năng lượng (fluorescence resonance energy transfer) (FRET), và các mồi Scorpion. Nồng độ đo được thông qua việc so sánh với cuvet (curves) chuẩn. Điều này loại bỏ sự cần thiết trước mắt phải điện di trên gel, do đó giảm một cách đáng kể nguy cơ nhiễm và dương tính giả. Khi Multiplexed, RT-PCR cho phép xét nghiệm với độ chính xác cao (high-throughput) các trình tự khác nhau trong một tube phản ứng. Việc dùng Multiplexed

RT-PCR, Shokoples và cộng sự có thể xác định bốn loài Plasmodium gây bệnh trên người (falciparum, vivax, malariae, and ovale) trong một tube phản ứng duy nhất thậm chí trong những mẫu mật độ ký sinh trùng rất thấp. Chạy Multiplex không chỉ giảm giá thành mỗi xét nghiệm mà còn cho phép thời gian xoay vòng nhanh, xét nghiệm chỉ mất 3 giờ để hoàn tất. Nó là một thuận lợi rõ ràng vượt qua kính hiển vi cái mà cần nguồn nhân lực và tốn thời gian xoay vòng chậm đặc biệt là nó mang đến độ chính xác cao (during high-throughput settings). Tương tự, Multiplexed RT-PCR đã chứng tỏ sự hữu dụng trong việc phân biệt các chủng sốt rét nhạy thuốc. Điều này quan trọng cho việc kê đơn thuốc sốt rét phù hợp.Trong ví dụ khác, Diez và cộng sự thì có thể phát hiện sự hiện diện của việc nhiễm T. cruzi trong trường hợp ghép tim bằng phương pháp PCR. Điều này cho phép điều trị trực tiếp bệnh nhân trước khi bệnh Chagas có thể tái hoạt. Những ví dụ này chứng tỏ rằng chẩn đoán hiệu quả và sớm có thể ảnh hưởng trực tiếp chăm sóc bệnh nhân và phương pháp tiếp cận dựa trên nền PCR có tiềm năng hỗ trợ việc đưa ra những lựa chọn đúng đắn để điều trị.

Mặc dù phương pháp dựa trên DNA thể hiện độ đặc hiệu và độ nhạy nổi trội, tiến tới thực hiện phương pháp này hằng ngày tại phòng thí nghiệm thì vẫn còn hạn chế áp dụng cho các vùng dịch tễ ở nông thôn. Thêm vào đó, như đã thấy với nhiều xét nghiệm huyết thanh thì phương pháp PCR cũng chưa ổn lắm bởi việc thiếu chuẩn cũng như việc tách chiết DNA, lựa chọn bộ primer, và chu trình khuếch đại khác nhau là tất cả các nhân tố mà có thể dẫn đến các biến đổi trong kết quả. Song thêm một bước tách chiết DNA tự động sẽ chắc chắn cải thiện xét nghiệm PCR để dùng trong chẩn đoán bệnh ký sinh trùng.

2.3. Khuếch đại đẳng nhiệt cấu trúc vòm (LAMP)

Khuếch đại đẳng nhiệt cấu trúc vòm (LAMP) là một phương pháp khuếch đại duy nhất với độ đặc hiệu và độ nhạy cực kỳ cao có thể để phân biệt trình tự khác nhau một nu. Nó đặc trưng bởi việc dùng 6 primer khác nhau được thiết kế chuyên biệt để nhận biết 8 vùng khác nhau trên gene mục tiêu, việc khuếch đại chỉ xảy ra nếu tất cả primer gắn kết vào khuôn và tạo thành sản phẩm. Trong quá khứ, LAMP đã là một ứng dụng thành công để phát hiện nhanh cả các virus mang DNA và RNA như virus West Nile và SARS. Gần đây, các nhà ký sinh trùng học đã quen với phương pháp LAMP để phát hiện một vài bệnh ký sinh trùng bao gồm các ký sinh trùng ở người Entamoeba, Trypanosoma , Taenia,Plasmodium, và Cryptosporidium, ký sinh trùng trên động vật Theilera và Babesia, và thậm chí xác định các vecto muỗi mang ký sinh

trùng Plasmodium và Dirofilaria immitis. Hầu hết các nghiên cứu đã chỉ ra ánh hào quang với nhiều thuận lợi của phương pháp này hơn kỹ thuật PCR thông thường.

Không giống phản ứng PCR thường quy, LAMP được thực hiện tại điều kiện đẳng nhiệt (thường trong khoảng 60–65°C). Tính năng nổi bật này không chỉ mang lại lượng sản phẩm cao hơn, mà còn không cần phải mua thiết bị luân nhiệt và rút ngắn được thời gian phản ứng bằng cách loại bỏ thời gian luân nhiệt. Cộng thêm, phản ứng có thể thực hiện không cần tách chiết DNA từ mẫu bệnh phẩm được thu thập như trong trường hợp của RIME, a nonautonomous retroelement (một yếu tố phía sau không tự chủ) tìm thấy trong Trypanosoma brucei rhodesiense và T. b. gambiense. Trong 35 phút, dùng thiết bị ủ nhiệt Water bath đơn giản, RIME LAMP có thể phát hiện 2 loài T. b. gambiense và T. b. rhodesiense trực tiếp từ mẫu máu, huyết thanh, và mẫu CSF. Quan trọng hơn, nghiên cứu này chỉ ra khả năng tái sản xuất (reproducibility) trong lĩnh vực này. Thêm vào các thuận lợi ở trên, phản ứng LAMP còndễ dàng thực hiện (set up), và kết quả dễđược đánh giá. Mẫu cần xét nghiệm được trộn với primers, chất nền, một DNA polymerase có khả năng dịch chuyển trên chuỗi trong một tube ly tâm. Trong suốt quá trình phản ứng một lượng lớn ion pyrophosphate được hình thành, dẫn đến việc hình thành kết tủa trắng. Độ đục này tương đương với lượng DNA được tổng hợp do đó có thể đánh giá một phản ứng bằng cách đo độ đục, hay đơn giản nhìn bằng mắt thường.

Với tất cả các lý do này, hứa hẹn trong tương lai sẽ áp dụng LAMP như một công cụ chẩn đoán nhiễm ký sinh trùng ở các vùng lưu hành nông thôn. Hơn nữa, khi nhiều nhóm ứng dụng LAMP trong lĩnh vực ký sinh trùng, chúng ta sẽ thấy sự xuất hiện của các xét nghiệm biến thể của LAMP đáp ứng nhu cầu phát hiện chính xác. Ví dụ, trong một nghiên cứu gần đây trên bò Babesia, một xét nghiêm Multiplex-LAMP (mLAMP) đã phát hiện đồng thời B. bovis và B. bigemina từ DNA tách chiết trong mẫu máu được thấm trên giấy thấm. Tương tự, Han và cộng sự đã thực hiện một xét nghiệm LAMP dựa trên gene 18S rRNA để phát hiện bốn loài Plasmodium (falciparum, vivax, malariae, and ovale). LAMP có độ nhạy tương đương và độ đặc hiệu tuyệt vời hơn nested PCR, việc mang lại kết quả tương đương nhưng tại một thời gian xoay vòng nhanh hơn. Kết quả của họ phù hợp với nhiều nghiên cứu khác chứng tỏ tính nhanh chóng, độ đặc hiệu và độ nhạy được cải thiện bằng cách dùng xét nghiệm LAMP.

2.4. Kỹ thuật Luminex x MAP

Kỹ thuật Luminex là đo dòng chảy tế bào trên nền hạt cho phép phát hiện nhiều mục tiêu khác nhau cùng lúc (http://www.luminexcorp.com/). Các vi hạt hình cầu có thể đồng gắn kết vào kháng nguyên, kháng thể, hay các oligonucleotides đóng vai trò như vật liệu dò (probes) trong xét nghiệm. Trên 100 vi hạt hình cầu thì sẵn sàng cho việc phát tín hiệu huỳnh quang riêng biệt khi bị kích thích bởi tia laser do đó cho phép xác định các mục tiêu khác nhau. Phỏng theo nghiên cứu về ký sinh trùng, xét nghiệm Luminex có thể xác định nhiều đối tượng hoặc genotypes khác nhau của sinh vật tham gia sử dụng cùng một phản ứng với thể tích rất nhỏ. Hướng tiếp cận này sẽ mang lại sự hữu ích trong nghiên cứu đa dạng kháng nguyên và các alleles kháng thuốc và để chẩn đoán bệnh ký sinh trùng.

Luminex được ứng dụng để nghiên cứu Cryptosporidium. Hai loài C. hominis và C. parvum không thể phân biệt được khi dùng các xét nghiệm kháng nguyên và huyết thanh. Chỉ phương pháp dựa trên sinh học phân tử đã thành công bằng cách khai thác sự khác nhau ở nu đơn lẻ trong vùng microsatellite-2 (ML-2) của 2 loài. Sử dụng trình tự DNA là công cụ chẩn đoán đáng được lựa chọn nhưng nó tốn kém, đòi hỏi nguồn nhân lực và tốn thời gian. Trong một nghiên cứu gần đây, Bandyopadhyay và cộng sự thành công trong việc phát hiện và phân biệt C. hominis và C. parvum trong 143 mẫu DNA tách chiết dùng kỹ thuật Luminex bằng cách dùng oligonucleotide probes cụ thể đối với vùng ML-2 của mỗi loài. Thời gian xoay vòng là 5 giờ để làm xét nghiệm này không chỉ nhanh hơn mà còn ít tốn kém hơn dùng PCR thông thườngsau đó phải giải trình tự. Nó mang đến độ chính xác 100% và nhạy hơn một xét nghiệm kháng thể huỳnh quang trực tiếp (DFA), một phương pháp thường quy dùng xác định các loài Cryptosporidium và Giardia. Chú ý rằng DFA không thể phân biệt C. hominis và C. parvum.

Tương tự các nghiên cứu khác, kỹ thuật Luminex có thể phát hiện mức độ ký sinh trùng trong tất cả các loại máu đối với bốn loài Plasmodium ở người (falciparum, vivax, malariae, and ovale) cùng một lúc. Nghiên cứu này chứng tỏ rằng kỹ thuật Luminex có thể cải thiện tốc độ, độ chính xác, và sự đáng tin cậy của các phương pháp PCR khác. Ví dụ, không cần phải điện di trên gel để phân biệt sự hiện diện của các sản phẩm LDR nhằm phát hiện 4 loài Plasmodium ở người.Thứ hai, tất cả các mẫu được xử lý cùng lúc và liên tụcthông qua một định dạng đĩa 96 giếng từ việc tách chiết DNA tất cả thông qua việc phân tích dữ liệu. Quá trình này được tự động và do đó có thể đạt được sự đồng nhất. Cuối cùng, sự chính xác cao (the high-throughput

capability) của hệ thống Luminex cho thấy một sự thuận lợi rõ ràng hơn hẳn việc sử dụng kính hiển vi đòi hỏi nhiều lao động cho những nghiên cứu lớn.

2.5. PCR đa mồi (Multiplex – PCR)

Multiplex real-time PCR là kỹ thuật nhân bản một hoặc nhiều trình tự DNA trong cùng một phản ứng PCR, nhiều trình tự sẽ được nhân bản sử dụng nhiều cặp mồi và các thành phần master mix. Phương pháp này được xem là một phương pháp cải tiến của PCR thông thường, có độ nhạy cao, thời gian thực hiện ngắn và phát hiện được nhiều tác nhân gây bệnh chỉ trong một phản ứng.

Về cơ bản, kỹ thuật multiplex Real-time PCR điển hình không khác biệt so với kỹ thuật đơn Real-time PCR.

Multiplex real-time PCR có nhiều ứng dụng rộng rãi, có thế xác định sự có mặt cùng lúc nhiều tác nhân khác nhau như virus, vi khuẩn và các tác nhân xâm nhiễm khác. Đồng thời, kỹ thuật này cũng được dùng để xác định các thành phần có trong một hỗn hợp mẫu hoặc cũng có thể dùng để xác định sự có mặt của nhiều gen đơn lẻ trong hệ gen.

2.6. Ứng dụng của các kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán ký sinh trùng

Trong lĩnh vực bệnh lý do ký sinh trùng, sinh học phân tử góp phần không nhỏ vào công tác phát hiện, chẩn đoán, giám định, phân loại nhiều loại ký sinh trùng, đặc biệt là giun sán và sốt rét. Mặc dù kiểu hình trong phân loại là rất thông dụng và đã có những thành tựu hết sức quan trọng, nhưng đôi khi rất khó phân biệt loài và dưới loài một cách chính xác (McCarthya, Moore, 2000). Nên khi đó vai trò của sinh học phân tử hay nói đúng hợn là các công cụ phân tử rất hữu ích và xác định rạch ròi chính xác.

Các phương pháp chẩn đoán truyền thống áp dụng trong lâm sàng và dịch tễ học như xét nghiệm tìm trứng/ấu trùng hay các sản phẩm của ký sinh trùng hoặc các kỹ thuật miễn dịch học đều có những sai số nhất định, tuỳ từng loài ký sinh trùng, đặc biệt khi các dạng ký sinh trùng cùng tồn tại ở một nơi như ở hệ tiêu hóa, chất thải ở hệ hô hấp hay máu của hệ tuần hoàn. Phương pháp sinh học phân tử nhân bản DNA và phân tích đặc tính sản phẩm thu được, đặc biệt là phân tích biến đổi gen/hệ gen được ứng dụng trong chẩn đoán phân loại và lập phả hệ sinh vật, đã bước đầu chứng minh cho kết quả chính xác hơn nhiều so với phương pháp truyền thống (Elnifro et al., 2000; De Lellis et al., 2008; Mori và Notomi, 2009). Các số liệu chính xác của các phương pháp sinh học phân tử đã cho phép ứng dụng những hướng mới và rất có thể

sẽ làm thay đổi một phần hệ thống phân loại và chẩn đoán phân biệt loài hiện có (Galluzzi et al., 2007; Littlewood, 2008).

Trong hai thập kỹ qua, công nghệ ứng dụng kỹ thuật mới đã có những định hướng phát triển vượt bậc. Một trong những thành tựu lớn của nhân loại là sự phát triển phương pháp nhân bản DNA bằng kỹ thuật đa mồi (multiplexing methodology), đặc biệt những phương pháp nhân bản DNA sử dụng nhiều mồi cùng một lúc phát hiện đa khuôn đó là kỹ thuật multiplex-PCR (multiplex polymerase chain reaction) tạo sản phẩm DNA mạch thẳng (Powledge, 2004; Ishmael, Stellato, 2008) và kỹ thuật LAMP (loop-mediated isothermal amplification) đa mồi nhân bản DNA phát hiện đơn khuôn, tạo sản phẩm DNA cấu trúc vòm (Gill, Ghaemi, 2008; Parida et al., 2008; Mori, Notomi, 2009). Nếu sử dụng RNA làm khuôn, sau khi chuyển đổi sang DNA bằng phản ứng sao chép ngược (reverse transcription), cả PCR và LAMP cũng đều có thể thực hiện quá trình tổng hợp chuỗi nucleotide cho sản phẩm DNA. Do vậy, bên cạnh PCR sử dụng khuôn DNA, còn có RT-PCR sử dụng khuôn RNA; và bên cạnh LAMP sử dụng khuôn DNA, còn có RT-LAMP sử dụng khuôn RNA (Goto et al., 2007; Parida et al., 2008).

Cả hai phương pháp PCR/RT-PCR và LAMP/RT-LAMP đều sử dụng cùng lúc nhiều mồi (từ 2 mồi trở lên); sử dụng DNA hay RNA làm khuôn cung cấp vùng gen đích; sử dụng các dẫn chất deoxy-nucleotide triphosphate (dNTP) làm nguyên liệu kiến tạo; sử dụng một loại DNA polymerase làm enzyme để xúc tác tổng hợp chuỗi nucleotide; sử dụng các thành phần làm phụ trợ cho phản ứng hoạt động trong đó có i-on Mg++ có vai trò quan trọng; và xác nhận kết quả bằng cách đánh giá sự hiển thị của sản phẩm DNA trong điều kiện thích hợp. PCR được ứng dụng cho giám định, chẩn đoán, phân loại, di truyền quần thể, phả hệ và tiến hoá sinh vật, trong đó có ký sinh trùng (Chandler và Colitz, 2006; Littlewood, 2008) và trở thành một công cụ không thể thiếu được trong công tác giám định, phát hiên sinh vật (kể cả ký sinh trùng) gây bệnh bằng kỹ thuật cao. Dễ làm, có tính nhạy và đặc hiệu rất cao, đồng thời chỉ cần một lượng rất ít khuôn DNA của đối tượng sinh vật bất kể giai đoạn sinh trưởng nào, PCR đã có thể cho sản phẩm với độ chính xác cao về loại sinh vật cần nghiên cứu. Với lợi thế như vậy, PCR đã thực sự được ứng dụng rộng rãi trong mọi lĩnh vực, trước hết là chẩn đoán phân tử xác định và phân biệt các loài gây bệnh (Ishmael và Stellato, 2008).

PCR đa mồi (multiplex-PCR) trong chẩn đoán phân tử xác định và phân biệt ký sinh trùng.

Đối với ký sinh trùng, cho đến nay đã có hàng chục phương pháp và kit chẩn đoán multiplex-PCR sử dụng phát hiện nhiều loài gây bệnh. Khi ký sinh trùng cùng tồn tại ở một vị trí, một vùng trong cơ quan của cơ thể (ví dụ: cùng ở trong máu, cùng ở trong đường ruột/khoang ruột, cùng ở trong phổi/dịch phổi, hoặc metacercariae cùng ở trong một vật chủ trung gian), thì việc cùng lúc phát hiện và phân biệt được nhiều loài gây bệnh mang lại tính kinh tế và lợi ích cao hơn nhiều so với thực hiện đơn lẻ (Edwards, Gibbs, 1994; De Lellis et al., 2008). Multiplex-PCR đã được xây dựng để ứng dụng chẩn đoán phân biệt các loài sán lá/sán dây, bao gồm sán lá gan nhỏ Clonorchis sinensis and Opisthorchis viverrini (Le et al., 2006); sán lá gan lớn F. hepatica từ ốc vật chủ trung gian (Magalhães et al., 2004; 2008); sán lá phổi Paragonimus spp (Sugiyama et al., 2006; Le et al., 2006); sán dây Taenia saginata, Taenia solium, Taenia saginata asiatica và ấu trùng sán lợn (González et al., 2000; 2004; Yamasaki et al., 2004; Trachsel et al., 2007); sán chó Echinococcus multilocularis (Davidson et al., 2009). Multiplex-PCR cũng được sử dụng phát hiện và phân biệt các loại giun tròn (nematode) trong đó có Trichinella và nematode đường ruột (Zarlenga et al., 1999; 2001a,b); phân biệt Ancylostoma duodenale, Necator americanus, Oesophagostomum bifurcum (Verweij et al., 2007) hoặc các loài Oesophagostomum spp ở lợn (Lin et al., 2008); phát hiện và phân biệt Brugia malayi và Wuchereria bancrofti với nhau (Mishra et al., 2007) và với ký sinh trùng sốt rét (Rao et al., 2009);

Multiplex-PCR tỏ ra sử dụng rất hữu hiệu chẩn đoán phân biệt nhiều nhóm ký sinh trùng đơn bào (protozoa), chủ yếu tập trung vào nhóm ký sinh trùng đơn bào đường ruột như Cryptosporidium và Giardia (Patel et al., 1999; Gile et al., 2002; Guy et al., 2003); Cyclospora và Eimeria (Orlandi et al., 2003; Fernandez et al., 2003); đặc biệt là ký sinh trùng đơn bào máu, chủ yếu tập trung ký sinh trùng sốt rét Plasmodium spp, trước hết là phân biệt 4 loài gây bệnh, chủ yếu ở người, đó là Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale, theo từng nhóm hoặc cả 4 loại từ máu (Padley et al., 2003; Patsoula et al., 2003; Rougemont et al., 2004; Veiga et al., 2006; Rao et al., 2009); hoặc từ vector là muỗi Anopheles (Lardeux et al., 2008). Một loại ký sinh trùng khác thường có trong máu là Leishmania spp cũng được chẩn đoán phân biệt bằng multiplex-PCR từ máu, dưới da hay từ nguồn truyền lây vector là loài muỗi

cát Lutzomyia (Harris et al., 1999; Jorquera et al., 2005; Rodríguez-González et al., 2007; de Pita-Pereira et al., 2008) hayký sinh trùng đường máu lê dạng trùng Babesia caballi và Babesia equi ở động vật (Alhassan et al., 2005) hoặc các loài đơn bào máu khác cũng được phát hiện bằng multiplex-PCR trong đó có Toxoplasma gondii (Ajzenberg et al., 2005; Nowakowska et al., 2006).

Multiplex-PCR còn được ứng dụng chẩn đoán lỵ amíp do khả năng phát hiện nhanh, chính xác phân biệt các loài gây bệnh với nhiều loài khác có hình thái tương tự, trước hết là Entamoeba histolytica và Entamoeba dispar từ phân người bệnh (Evangelopoulos et al., 2000; Haque et al., 2007; Khairnar, Parija, 2007). Về vùng gen đích chọn lựa sử dụng chẩn đoán, nhiều tác giả khai thác hệ gen nhân tế bào trong đó hướng tới đối tượng gen 18S rRNA phân biệt cầu trùng Eimeriavới Cyclospora(Orlandi et al., 2003), giám định và phân biệt các loài Cryptosporidium (Patel et al., 1999), phát hiện các loài ký sinh trùng sốt rét Plasmodium (Rougemont et al., 2004); hay đối tượng là gen pfcrt, pfmdr1, pfdhfr ở ký sinh trùng sốt rét (Veiga et al., 2006) và nhiều vùng gen hay vùng giao gen khác. Nhiều công trìnhkhai thác đích là hệ gen ty thể (mitochondrial genome), ví dụ chẩn đoán phân biệt sán dây Taenia spp (Trachsel et al., 2007; Yamasaki et al., 2004; 2006); sán lá gan nhỏ Clonorchis sinensis và Opisthorchis viverrini (Le et al., 2006); sán lá gan lớn Fasciola hepatica (Magalhães et al., 2004; 2008); phân biệt định loài động vật trong thức ăn thực phẩm (Ono et al., 2007).

Hướng sử dụng hệ gen ty thể trong nghiên cứu chẩn đoán loài kể cả ứng dụng multiplex-PCR được coi là có cơ sở vững vàng trong điều kiện hiện nay. Do có kích thước nhỏ, tồn tại nhiều bản sao trong một tế bào (vài trăm/tế bào), cấu trúc là vòng DNA khép kín nên rất bền vững, cấu trúc đơn gen liên tục thuận lợi cho PCR hoạt động, một tế bào cho nguồn khuôn DNA gấp hàng trăm lần so với hệ gen nhân nên phản ứng PCR có độ nhạy cao hơn (Le et al., 2002; Hu, Gasser, 2006). Điều này có ý nghĩa khi sử dụng tế bào trứng giun sán làm nguồn khuôn cho multiplex-PCR, vì chỉ cần 1 tế bào trứng đã cho hàng trăm phân tử DNA hệ gen ty thể. Nhiều công trình đã thiết kế multiplex-PCR chỉ sử dụng trứng giun/sán cung cấp nguồn khuôn DNA để tận dụng tính đơn giản thu mẫu (chỉ cần phân người bệnh, đối với nhiều ký sinh trùng phủ tạng và đường ruột; hay đờm chất dịch hô hấp, đối với sán lá phổi) (Trachsel et al., 2007; Davidson et al., 2008).

Gen/hệ gen ty thể của nhiều loài ký sinh trùng đã lần lượt được giải mã và đăng ký trong Ngân hàng gen thế giới, tạo cơ sở dữ liệu để có thể truy cập ứng dụng trong việc thiết kế mồi đặc hiệu từng loài cho multiplex-PCR và so sánh phân biệt trong chẩn đoán, giám định và phân loại (Le et al., 2002; Hu, Gasser, 2006). Có hàng ngàn hệ gen ty thể đã được giải trình tự và phân tích hoàn toàn, hàng trăm hệ gen ty thể khác đang từng phần được giải quyết, bao gồm tất cả mọi loài quan trọng từ bậc thấp đến bậc cao, từ động vật đơn bào đến động vật đa bào, cung cấp một hệ thống dữ liệu quan trọng cho các quá trình nghiên cứu gen, protein, tiến hoá, lịch sử tiến hoá, di truyền quần thể, quan hệ về loài, giống và nhiều lĩnh vực nghiên cứu quan trọng khác, trong đó có sử dụng dữ liệu để thiết kế mồi cho multiplex PCR. Ngoài ra còn có thể sử dụng các gen đích của hệ gen nhân trong chiến lược thiết kế phương pháp PCR đa gen/đa mồi để chẩn đoán phân biệt.

Nghiên cứu về sinh học phân tử giám định thành phần loài và chẩn đoán phân biệt các loài giun/sán ở Việt Nam bằng kỹ thuật PCR sử dụng chỉ thị di truyền hệ gen ty thể đã được một số tác giả thực hiện có hiệu quả, đặc biệt trong 10 năm gần đây. Có hàng trăm công trình sử dụng PCR đa mồi trong chẩn đoán phân biệt ký sinh trùng được đăng tải phản ánh định hướng nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật cao đối với lĩnh vực ký sinh trùng, mà chúng tôi không có ý định nêu hết trong bài tổng quan này, chỉ điểm qua một số kết quả do nhóm chúng tôi thực hiện được. Trước hết, đó là nghiên cứu xác định loài sán dây châu Á Taenia asiatica đầu tiên ở Việt Nam (Lê Thanh Hòa và cs, 2002; Nguyễn Văn Đề, Lê Thanh Hoà, 2006). Sau đó các loài sán khác lần lượt đã được thẩm định thành phần loài như: sán lá gan nhỏ C. sinensis, sán lá ruột Fasciolopsis buski, sán lá gan lớn Fasciola gigantica, sán lá phổiParagonimus heterotremus, P. vietnamensis, P. proliferus (Le và cs, 2006; Doanh và cs, 2007; 2008; 2009); sán dây T. saginata, T. solium ký sinh trên người, ấu trùng sán dây lợn trên lợn và trên người cũng đã được thẩm định bằng sinh học phân tử hệ gen ty thể (Lê Thanh Hoà và cs, 2002; Nguyễn Văn Đề, Lê Thanh Hoà, 2006) và lần lượt một số chuỗi gen đã đăng ký trong Ngân hàng Gen thế giới. Những kết quả bước đầu này đã góp phần giải quyết một số vấn đề trong xác định thành phần loài giun sán tại Việt Nam và đã làm cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu kit multiplex PCR để chẩn đoán xác định bệnh giun sán. Đồng thời đó cũng là cơ sở dữ liệu quý báu cho khoa học trong nghiên cứu đa dạng sinh học và đóng góp vào hoạch định chiến lược phòng chống giun sán có hiệu quả ở Việt Nam.

Cho đến nay, nghiên cứu sinh học phân tử trong chẩn đoán ký sinh trùng mới thực hiện ở góc độ đơn loài, kit PCR đơn gen, mà chưa có những định hướng tổng thể sàng lọc, xây dựng kit đa gen (multiplex-PCR) cho một nhóm cùng loài, hay cho một hỗn hợp các loài cùng tồn tại trên người ở những vị trí phân bố cần chẩn đoán (Lê Thanh Hoà, 2007). Tuỳ theo khu trú hỗn hợp của các loài ký sinh trùng gây bệnh, chúng tôi mong muốn chọn lọc phân nhóm loài đối tượng, hoặc/và phân vùng khu trú (ruột, lấy mẫu phân; phổi, lấy mẫu đờm, dịch tiết phổi), xây dựng kit song gen (duplex-PCR), đa gen (multiplex-PCR) để chẩn đoán sàng lọc và giám định và đó cũng chính là những định hướng xuyên suốt trong chiến lược xây dựng phương thức và kit chẩn đoán bằng sinh học phân tử ở nước ta. Do vậy, việc nghiên cứu chẩn đoán phân tử là hết sức bức thiết, đặc biệt là nghiên cứu kit PCR đa gen/đa mồi (multiplex-PCR) đối với ký sinh trùng mà chúng tôi đang xây dựng sẽ giúp cho việc chẩn đoán hoàn toàn chính xác và góp phần to lớn trong phòng chống bệnh có hiệu quả trong phạm vi cả nước (Lê Thanh Hòa, 2009).

Gần đây, một phương pháp nhân bản DNA mới đã được phát triển và giới thiệu ứng dụng, gọi là phương pháp LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) tạo ra sản phẩm là DNA mạch vòm, nhìn thấy được bằng mắt thường để đánh giá kết quả (Notomi et al., 2000; Mori, Notomi, 2009). Trong vòng 10 năm qua kể từ khi được giới thiệu, LAMP đã thu hút sự quan tâm của các nhà nghiên cứu và xét nghiệm ở các cơ sở đối với tác nhân gây bệnh, do tính chính xác, đơn giản, hiệu suất, giá thành thấp và dễ thực hiện đánh giá. LAMP được phát triển thành bộ sinh phẩm (kit) thương mại phổ biến rộng rãi trên toàn thế giới. Đến nay, đã có trên 350 công trình thực hiện LAMP, ứng dụng đối với hầu hết các loài (vi) sinh vật, ký sinh trùng gây bệnh ở người và động vật. Cùng tính đặc hiệu và tính nhạy như PCR, LAMP đã thực sự sử dụng như một phương pháp chẩn đoán tiên tiến với mọi đối tượng và trở nên cạnh tranh đắc lực với PCR, do tính nhanh chóng dễ làm, dễ đánh giá và không tốn kém nguyên vật liệu và bệnh phẩm (Nagamine et al., 2002; Parida, 2008; Mori, Notomi, 2009).

Vậy phương pháp LAMP là gì? LAMP, tạm gọi là tổng hợp DNA-vòm (hay vắn tắt là kỹ thuật/phương pháp DNA-vòm) được phát triển năm 2000, là phương pháp tổng hợp DNA bằng 4 mồi đặc hiệu nhận biết 6 vùng khác biệt trên một gen đích từ một nguồn khuôn duy nhất, tạo nên một dạng sản phẩm DNA có cấu trúc vòm (stem-loop structure), hiển thị dưới dạng hỗn hợp vẩn đục màu trắng, nên dễ dàng phát hiện bằng mắt thường; nếu cho thêm chất huỳnh quang, sản phẩm sẽ phát quang dễ

nhận biết hơn (Notomi et al., 2000; Parida et al., 2008). Dạng vẩn đục màu trắng chính là Magnesium pyrophosphate (Mg2P2O7) một sản phẩm phụ của phản ứng sinh ra trong quá trình tạo DNA mạch vòm rất dễ quan sát đánh giá kết quả (Mori et al., 2001). Phương pháp DNA-vòm không đòi hỏi điều kiện phòng thí nghiệm hiện đại, nhân lực trình độ cao, phản ứng xảy ra đặc hiệu, thực hiện nhanh chóng (Mori, Notomi, 2009), rất thích hợp cho chẩn đoán phân tử virus, vi khuẩn và ký sinh trùng gây bệnh ở các nước đang phát triển vùng nhiệt đới (Dong et al., 2008; Parida, 2008).

Nếu như PCR/RT-PCR, bao gồm cả multiplex-PCR, cho sản phẩm đặc hiệu là DNA mạch thẳng thuận lợi cho các phương pháp sinh học phân tử phân tích đặc tính của gen/hệ gen sau khi tách dòng và giải trình tự (Powledge, 2004; Ishmael, Stellato, 2008); thì LAMP/RT-LAMP cho sản phẩm đặc hiệu là DNA bắt cặp các chuỗi lại với nhau tạo mạch vòm không thuận lợi cho tách dòng và xem xét thành phần gen/hệ gen, nhưng DNA-vòm có lợi thế cực kỳ to lớn là sản phẩm hiển thị ở dạng vẩn đục trắng do sản sinh muối pyrophosphate (Mg2P2O7) hoặc với chất phát quang nhìn thấy bằng mắt thường, phục vụ nhanh chóng cho chẩn đoán (Mori et al., 2001;Goto et al., 2009) (Hình 3). Trong trường hợp LAMP sử dụng làm kit chẩn đoán, người ta thường thiết kế thêm một cặp mồi đặc hiệu bám vào hai đầu biên của vùng gen đích để thực hiện phản ứng PCR/RT-PCR, thu sản phẩm DNA-thẳng, rồi tách dòng, giải trình tự để kiểm nghiệm tính đặc hiệu cho chắc chắn (Parida, 2008). Phương pháp kiểm tra giả nghiệm cũng được thực hiện với các nguồn khuôn khác nhau của (vi) sinh vật cùng giống (genus) để đảm bảo chắc chắn tính chính xác và đặc hiệu của kit chẩn đoán LAMP (Parida, 2008; Parida et al., 2008).

Kể từ khi được giới thiệu từ những năm 2000, càng ngày càng có nhiều nghiên cứu đưa LAMP vào ứng dụng chẩn đoán ở các lĩnh vực khác nhau, trong đó có ký sinh trùng. Đối với ký sinh trùng, nhiều khi chúng cùng tồn tại ở một vị trí nên rất dễ lấy bệnh phẩm, tuy nhiên việc phân biệt trong chẩn đoán và xác nhận sự có mặt của loài gây bệnh là không dễ dàng khi sử dụng phương pháp hình thái học. Việc phát hiện đặc hiệu loài gây bệnh để phân biệt được nhiều loài khác càng nhanh càng tốt có ý nghĩa rất lớn trong chẩn đoán, do vậy, LAMP trở nên một công cụ hữu hiệu xác định nhanh đối tượng trong số đông cùng tồn tại (Criado-Fornelio, 2007; Adams, Hamilton, 2008). Trong 10 năm qua, bên cạnh việc thăm dò phương pháp và xây dựng bộ kit với tiêu chuẩn chẩn đoán sau khi khảo nghiệm, LAMP đã được ứng dụng trong thực tế với nhiều loại ký sinh trùng khcá nhau gây bệnh ở động vật và người.

LAMP đã được xây dựng để ứng dụng chẩn đoán phân biệt các loại ký sinh trùng đơn bào, trước hết đó là các loài Trypanosoma spp gây bệnh ở châu Phi (Kuboki et al., 2003; Adams, Hamilton, 2008; Thekisoe et al., 2009), bao gồm chẩn đoán phân biệt các loài trong phân giống Trypanozoon (Njiru et al., 2009) hoặc chính xác xác định loài Trypanosoma brucei rhodesiense (Njiru et al., 2008). LAMP cũng được thăm dò chẩn đoán ký sinh trùng đường máu ở động vật là Trypanosoma evansi qua kiểm tra trên lợn thực nghiệm (Thekisoe et al., 2005; 2007).

Một số loại ký sinh trùng đường máu khác cũng được ứng dụng LAMP để chẩn đoán trong đó có lê dạng trùng Babesia orientalisgây bệnh ở trâu ở Trung Quốc (He et al., 2009) hay phát hiện loài Babesia gibsoni ở Nhật Bản (Ikadai et al., 2004); hoặc phân biệt các loài trong giống Babesia (Guan et al., 2008) hay các loài piroplasma bao gồm Babesia spp và Theileria spp gây bệnh ở bò (Criado-Fornelio, 2007; Thekisoe et al., 2007; Liu et al., 2008; Salih et al., 2008), đặc biệt là loài Theileria parva gây bệnh ở bò (Thekisoe et al., 2010). Đối với Leishmania donovani, Takagi et al. (2009), phương pháp LAMP chẩn đoán rất nhạy chỉ cần 1 fg khuôn DNA là đủ phát hiện và phân biệt với các loài Leishmania spp (L. infantum, L. major, L. mexicana, L. tropica, L. braziliensis) khác. Phương pháp LAMP cũng phát hiện ký sinh trùng đơn bào đường máu Toxoplasma gondii từ đất; và loài đơn bào gây bệnh sang người này đã được một số nhà nghiên cứu lấy làm đối tượng xây dựng thành kit chẩn đoán trên người (Sotiriadou, Karanis, 2008; Krasteva et al., 2009; Zhang et al., 2009).

Đơn bào gây bệnh người và động vật truyền qua thức ăn nước uống thuộc giống Cryptosporidium và Giardia được đặc biệt quan tâm sử dụng LAMP do tính nhạy của phương pháp này (Bakheit et al., 2009), trước hết là chẩn đoán Cryptosporidium spp và Giardia duodenalis trong nước uống (Inomata et al., 2009; Plutzer, Tomor, 2009; Karanis, 2010) và trong động vật truyền lây (Plutzer, Tomor, 2009), trong phân thải và môi trường (Karanis et al., 2007). Bên cạnh đó lỵ amíp Acanthamoeba (Lek-Uthai et al., 2009) hay Entamoeba histolytica (Liang et al., 2009) cũng là đối tượng của phương pháp chân đoán mới này. Một trong những ứng dụng có hiệu quả trong sử dụng LAMP đó là phát triện phương pháp chẩn đoán phân biệt 4 loài ký sinh trùng sốt rét Plasmodium spp (Han et al., 2007; Aonuma et al., 2008) hoặc đơn lẻ từng loài Plasmodium falciparum (Poon et al., 2005; Yamamura et al., 2009) và Plasmodium vivax (Chen et al., 2010). Đối với giun tròn, chỉ mới có một công trình nghiên cứu xây dựng phương pháp LAMP chẩn đoán giun chỉ Dirofilaria immitis từ vector là muỗi

(Aonuma et al., 2009); và đối với sán dẹt, mới có loài sán máng Schistosoma japonicum (Xu et al., 2010) và các loài sán dây Taenia spp (Nkouawa et al., 2009) làm đối tượng của LAMP. Giun tròn và sán dẹt gây bệnh truyền từ động vật sang người còn có rất nhiều loài nguy hiểm khác cần được xây dựng phương pháp chẩn đoán nhanh bằng LAMP.

*** LƯỢNG GIÁ**

1. Trình bày nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch trong chẩn đoán ký sinh trùng?
2. Trình bày nguyên lý của kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang, miễn dịch enzym, miễn dịch phóng xạ, sắc ký miễn dịch?
3. Trình bày nguyên lý chung của các kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán ký sinh trùng?
4. Trình bày ứng dụng của kỹ thuật sinh học phân tử trong chẩn đoán ký sinh trùng gây bệnh?

BÀI 2. KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT KHÁNG THUỐC

MỤC TIÊU

* Kiến thức

1. Trình bày được đặc điểm, nguyên nhân, sự lan truyền, các phương pháp đánh giá ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc

2. Giải thích được cơ chế kháng thuốc của ký sinh trùng sốt rét .

* Năng lực tự chủ và trách nhiệm

3. Tổng hợp kiến thức đã được học về ký sinh trùng sốt rét, tham khảo thêm các tài liệu liên quan nhằm phát triển năng lực bản thân.

4. Thể hiện khả năng làm việc độc lập và làm việc nhóm, tổng hợp, đánh giá kết quả công việc của các thành viên trong nhóm để hoàn thành các bài tập được giao.

NỘI DUNG

1. Lịch sử và đặc điểm của ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc

Cho đến nay, nói đến kí sinh trùng sốt rét (KSTSR) kháng thuốc là nói đến P.falciparum kháng thuốc sốt rét. Kí sinh trùng sốt rét kháng thuốc đã xảy ra ở mọi vùng sốt rét trên thế giới và là một trong những khó khăn kĩ thuật lớn nhất ảnh hưởng đến các chương trình phòng chống sốt rét toàn cầu. Tuy nhiên tình hình kí sinh trùng sốt rét kháng thuốc có sự biến đổi theo thời gian và không gian do sự phân bố của các loài kí sinh trùng sốt rét và khả năng phòng chống ở mỗi thời điểm, khu vực khác nhau. Tác giả Gilles cho rằng: ở các vùng nhiệt đới tỉ lệ P.falciparum chiếm ưu thế, còn các vùng ôn đới thì P.vivax chiếm ưu thế.

Ở Việt Nam P.falciparum chiếm khoảng 80%. P.vivax chiếm khoảng 15 - 20%. P.malariae chiếm khoảng 1%. Tuy nhiên mỗi vùng tùy theo đặc điểm sinh cảnh, khí hậu và biện pháp PCSR sẽ có tỉ lệ khác nhau. Theo báo cáo của Viện Sốt rét -KST - CT Trung ương (2000), trong giai đoạn hiện nay ở khu vực miền Trung - Tây Nguyên tỉ lệ P.falciparum và tỉ lệ KSTSR/lam xét nghiệm cao nhất cả nước và cũng là nơi tình hình KSTSR kháng thuốc diễn ra phức tạp nhất.

1.1. Lịch sử của ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc

Sự xuất hiện KSTSR kháng thuốc có mối liên quan chặt chẽ với quá trình phát triển thuốc điều trị sốt rét. Tác giả Peters đã tóm tắt lịch sử phát triển thuốc sốt rét cùng với sự xuất hiện KSTSR kháng thuốc và nhận thấy hoặc nhanh hay chậm kí sinh trùng cũng tự thay đổi để thích nghi rồi kháng lại các thuốc tác dụng lên nó.

Lịch sử phát triển thuốc sốt rét với sự xuất hiện KSTSR kháng thuốc (dua theo Peters)

Tên thuốc	Năm sử dụng	Năm xuất hiện kháng thuốc		
		invitro	invivo	Quốc gia
Quinine	1630	1921	1910	Brazil
Chloroquine	1945	1956	1960	Colombia
Amodiaquine	1947	1957	1961	Brazil
Proguanil	1948	1949	1949	Brazil
Pyrimethamine	1951	1951	1952	Gambia
Primaquine	1951	1961	1963	-
Fansidar	1964	1968	1980	Thái Lan
Mefloquin	1972	1977	1982	Thái Lan
Artermisinine	1972	1985	Chưa xác định	-

Tình hình P.falciparum kháng chloroquine trở nên vô cùng nghiêm trọng cả về phạm vi và mức độ, đòi hỏi phải đề ra đối sách chống kháng cho phù hợp với từng quốc gia và khu vực.

Đã có thông báo về P.vivax kháng hoặc giảm hiệu lực điều trị với primaquine ở một số khu vực trên thế giới từ một vài dòng (strains) thể phân liệt trong gan đã có kháng một phần và được nhận định ở Đông Nam Á: 17% ở Thái Lan, 30% ở Papua New Guinea; ở Amazon Basine, Trung Mĩ, Somalia (43% trong quân đội Mĩ). Nhưng đến nay chưa có thông báo chính thức về P.vivax kháng chloroquine, một loại thuốc vẫn được coi là số một trong điều trị P.vivax.

Việt Nam là một trong những nước được ghi nhận có sự kháng thuốc sớm trên thế giới. Năm 1963, P.falciparum kháng chloroquine lần đầu tiên được phát hiện ở Nha Trang. Cho đến nay tình hình P.falciparum kháng chloroquine và hầu hết các thuốc sốt rét khác (trừ artemisinine và các dẫn chất) diễn biến hết sức phức tạp về phạm vi và mức độ ngày một tăng theo thời gian.

1.2. Đặc điểm của ký sinh trùng kháng thuốc sốt rét

- Khi thuốc kháng 1 giai đoạn của ký sinh trùng, thường kháng các giai đoạn khác (như Pyrimethamin).
- Ký sinh trùng kháng Chloroquin có thể:
  + Duy trì suốt vòng đời

+ Truyền sang đời sau

+ Dễ có kháng chéo trong nhóm 4 aminoquinolein.

+ Có khả năng gây cho muỗi tăng nhiễm ký sinh trùng kháng.

- Ký sinh trùng kháng 4 aminoquinolein và Amino-alcool (Chloroquin và Mefloquin): Duy trì trong quá trình lan truyền mặc dù không có áp lực của thuốc.

- Kháng Sulfonamid, Pyrimethamin và Chloroquin: tính kháng di truyền qua chu kỳ hữu tính ở muỗi sang đời sau.

2. Các phương pháp đánh giá ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc

2.1. Kỹ thuật đánh giá mật độ ký sinh trùng sốt rét

Mật độ ký sinh trùng sốt rét là số lượng ký sinh trùng sốt rét đếm được trong một vi trường hoặc một thể tích máu nhất định. Trong nghiên cứu, chẩn đoán, điều trị và đánh giá tính nhạy cảm (nhạy-kháng) trong các thử nghiệm in vivo và in vitro với thuốc sốt rét, vai trò của xác định loài và đếm mật độ ký sinh trùng sốt rét (KST SR) là khâu quan trọng, đồng thời cũng góp phần vào lộ trình phòng chống và loại trừ sốt rét trên thế giới và Việt Nam.. Có 2 phương pháp dùng để tính mật độ KST SR:

- Hệ thống dấu (+).

- Đếm số lượng KST SR trong 1 µl (1ml) máu.

- Kỹ thuật đếm được chính xác, cần lưu ý các điều kiện sau:

+ Lam máu nhuộm đẹp, không có/ít cặn, đạt chuẩn khoảng 10-20 bạch cầu/vi trường ở giọt đặc và khoảng 250 hồng cầu/một vi trường ở giọt mỏng, nơi chỉ có một lớp hồng cầu

+ Chọn vùng đếm: tế bào máu (hồng cầu/bạch cầu) rải đều, KST SR bắt màu

đẹp rõ

+ Nên đếm 2 – 3 lần để lấy số trung bình.

+ Nên sử dụng 2 máy đếm (1 máy đếm số lượng bạch cầu và 1 máy đếm ký sinh trùng sốt rét

+ Đếm tất cả ký sinh trùng có mặt trong vi trường, chuyển sang vi trường tiếp theo, theo hình zíc zắc và lặp lại như vậy đến khi số lượng bạch cầu/hồng cầu đạt quy định thì dừng lại. Cẩn thận không chồng chéo lập lại đường (vi trường) đã đi qua;

2.1.1. Tính mật độ ký sinh trùng sốt rét theo hệ thống dấu cộng

Đánh giá mật độ nhiễm bằng dấu cộng (+) là một cách đếm ký sinh trùng sốt rét trên giọt dày (giọt đặc), ước lượng được số lượng ký sinh trùng sốt rét tương đối trong

1 khoảng giá trị. Kết quả đếm ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản giọt dày xác định như sau:

+: 1-10 KST/100 vi trường

++: 11-100 KST/100 vi trường

+++: 1-10 KST/1 vi trường

++++: trên 10 KST/1 vi trường

2.1.2. Tính số lượng ký sinh trùng sốt rét trong 1µl máu

**** Một số lưu ý khi đếm ký sinh trùng sốt rét trên lam máu***

- Chỉ đếm số lượng KSTSR ở giai đoạn vô tính (trophozoite, schizont) được thực hiện ở tất cả loài *Plasmodium falciparum, Plassmodium vivax, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale và Plasmodium knowlesi* nếu có, trong đó chú trọng loài Plasmodium falciparum thường gây sốt rét ác tính (SRAT), một số loài khác cũng có thể dẫn đến SRAT nhưng hiếm hơn *(P. vivax, P. knowlesi)*

- Đối với thể hữu tính hay thể giao bào (gametocytes) không đếm, trừ trường hợp có yêu cầu trong nghiên cứu kháng thuốc đối với *P. vivax* chẳng hạn, nhưng sự hiện diện của chúng phải ghi vào kết quả xét nghiệm (sổ xét nghiệm hay phiếu ghi kết quả của các nghiên cứu tại thực địa và bệnh viện).

- Trong trường hợp nhiễm phối hợp nhiều loài *Plasmodium* spp. (thường gặp là *P. falciparum và P. vivax*), tất cả KSTSR thể vô tính phải đếm chung với nhau;

- Phần lớn, đếm số lượng KSTSR được thực hiện trên lam giọt dày, vì mật độ KSTSR tập trung cao và ít tốn thời gian soi cho xét nghiệm viên/ kỹ thuật viên. Tuy vậy, giọt mỏng cũng có thể được dùng để đếm số lượng KSTSR trong những trường hợp sau:

+ Không làm giọt dày hoặc có nhưng giọt dày bị hư hỏng, không soi được;

+ Khi số KSTSR > 100 ở mỗi vi trường trên giọt dày tương ứng với > 80.000 KSTSR/µL (vì ở mật độ này trên giọt dày rất khó đếm);

+ Xác định tỷ lệ phần trăm HC nhiễm KSTSR Plasmodium spp.

+ Hoặc do yêu cầu khác hoặc trong nghiên cứu…

**** Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản giọt dày và tính mật độ KST SR/ µL***

- Trước khi đếm phải xét nghiệm ít nhất 100 vi trường ở giọt dày (một số trường hợp cần phải đếm số vi trường lớn hơn 200-300 với mục đích nghiên cứu,

chẳng hạn đánh giá nhiễm trùng trên người không triệu chứng trong cộng đồng) để phát hiện sự hiện diện của KSTSR về các thông số cơ bản về loài, thể KSTSR và đánh giá mật độ KSTSR theo hệ thống dấu cộng và ghi lại kết quả.

- Quy định về số lượng BC phải đếm phụ thuộc vào số lượng KSTSR đếm được và dừng đếm khi đếm được 200 hoặc 500 BC.

+ Nếu đếm thấy số lượng KSTSR ≥ 100 thì đếm đến 200 BC, dừng đếm và ghi kết quả số lượng KSTSR/200 BC;

+ Nếu đếm thấy số lượng KSTSR ≤ 99 thì đếm đến 500 BC, dừng đếm và ghi kết quả số lượng KSTSR/500 BC;

+ Trường hợp được xác định là âm tính (-) khi đếm 0/1000 BC;

+ Đếm tất cả KSTSR và BC ở vi trường cuối cùng, ngay cả khi số lượng BC vượt quá 200, 500 hoặc 1000;

+ Ghi số lượng thực tế KSTSR và BC đếm được;

+ Tổ chức Y tế thế giới đã lấy số bạch cầu = 8000/µL máu làm chuẩn.

$$\text{Số lượng KSTSR/ µL} = \frac{\text{Số lượng KSTSR đếm được x 8000 BC/µL}}{\text{Số lượng BC đếm được}}$$

- Ở cơ sở điều trị có xét nghiệm số lượng BC hãy lấy số lượng BC thực tế đếm được để thay thế cho số lượng bạch cầu trung bình quy ước là 8.000 BC/µL, sẽ cho kết quả số lượng KSTSR/µL chính xác hơn.

**** Xác định tỷ lệ phần trăm hồng cầu (HC) bị nhiễm KSTSR trên lam giọt mỏng***

- Bên cạnh xác định mật độ KSTSR/µL (ở giọt đặc và giọt đàn) việc xác định tỷ lệ phần trăm hồng cầu nhiễm KSTSR trên lam giọt mỏng có ý nghĩa rất lớn, giúp bác sĩ lâm sàng tiên lượng nguy cơ của bệnh.

- Cách tiến hành đếm tương tự đếm KSTSR trên giọt mỏng và dùng công dụng công thức sau:

$$\text{Tỷ lệ \% HC nhiễm KSTSR} = \frac{\text{Số lượng HC nhiễm KSTSR x 100}}{\text{Tổng số HC đếm được (HC nhiễm KST SR + HC lành)}}$$

2.2. Các phương pháp đánh giá ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc

Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã đưa ra định nghĩa kí sinh trùng sốt rét kháng thuốc là khả năng một chủng kí sinh trùng sốt rét vẫn sống hoặc tiếp tục phát triển sau khi người bệnh đã dùng một liều thuốc bằng hoặc cao hơn liều thuốc thông dụng, nhưng vẫn ở trong giới hạn chịu được của bệnh nhân.

Kháng thuốc có thể là tương đối nếu như tăng liều trong giới hạn chịu đựng được của con người, có thể diệt được kí sinh trùng. Kháng thuốc có thể là tuyệt đối nếu như dùng liều thuốc vượt quá khả năng dung nạp của con người vẫn không diệt hết kí sinh trùng.

Định nghĩa này có ưu điểm trong việc áp dụng lâm sàng nhưng tính hữu dụng của nó còn phụ thuộc vào sự thống nhất về liều lượng.

Tuy nhiên khi kết luận một chủng kí sinh trùng sốt rét (KSTSR) kháng thuốc cần loại trừ các khả năng:

+ Do dùng thuốc không đủ liều, không đúng khoảng cách.

+ Do người bệnh không hấp thụ được hết thuốc, có thể do nôn mửa, ỉa lỏng.

+ Do đáp ứng miễn D1ch với sốt rét của bệnh nhân cao hay thấp hoặc chưa có.

+ Do yếu di truyền (đáp ứng tự nhiên của cơ thể: loại acetyl hoá nhanh và chậm).

+ Do độ nhạy cảm nguyên thủy của loại kí sinh trùng với thuốc.

+ Do chất lượng thuốc không bảo đảm.

Cần phân biệt kí sinh trùng kháng thuốc với điều trị thất bại do thuốc. Nghiên cứu hiện tượng kháng thuốc ở vùng sốt rét lưu hành, thường khó đánh giá vì thể trạng bệnh nhân sốt rét lâu năm có khi không cần điều trị cũng tự cắt cơn hoặc không loại trừ được khả năng tái nhiễm của kí sinh trùng sốt rét.

Cho đến nay WHO đã quy định có 2 phương pháp đánh giá kí sinh trùng sốt rét kháng thuốc:

2.2.1. Phương pháp đánh giá bằng kĩ thuật in vivo

Có 2 mốc thời gian theo dõi và đánh giá:

+ Test in vivo theo dõi 28 ngày:

- Bệnh nhân được theo dõi trong vòng 28 ngày (nghiên cứu này chỉ được thực hiện ở vùng không có sốt rét lây truyền tại chỗ hoặc bệnh nhân phải được theo dõi chặt chẽ trong các cơ sở điều trị).

- Lấy lam máu bệnh nhân để đếm kí sinh trùng sốt rét (KSTSR) vào các ngày:

D0: ngày trước khi cho bệnh nhân uống thuốc.

D1: sau một ngày (24 giờ) uống thuốc.

D2: sau 2 ngày (48 giờ) điều trị.

Sau đó đến các ngày: D5, D7, D4, D21 và D28.

- Năm 1967, Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã quy định về mức độ kháng của P.falciparum với các thuốc sốt rét như sau:

Đáp ứng với thuốc	Kí hiệu	Định nghĩa
Nhạy	S	Hết KSTSR trong vòng 7 ngày đầu,kể từ khi dùng thuốc và không tái phát cho tới ngày 28
Kháng độ I	RI_	Hết KSTSR trong vòng 7 ngày đầu, nhưng KSTSR xuất hiện lại từ ngày thứ 8 đến ngày 28
Kháng độ II	RII	Không hết KSTSR trong vòng 7 ngày đầu và chỉ giảm được trên 25% so với lượng KSTSR ban đầu vào ngày thứ 3
Kháng độ III	RIII	Trong vòng 7 ngày đầu KSTSR chỉ giảm ít, hoặc không giảm, thậm chí có thể còn tăng

+ Test in vivo theo dõi 7 ngày:

- Bệnh nhân được theo dõi trong vòng 7 ngày (nghiên cứu có thể thực hiện ở vùng có sốt rét lây truyền tại chỗ hoặc bệnh nhân được theo dõi trong các cơ sở điều trị).

- Lấy lam máu bệnh nhân để đếm KSTSR vào các ngày:

D0: ngày trước khi cho bệnh nhân uống thuốc.

D1: sau một ngày (24 giờ) uống thuốc.

D2: sau 2 ngày (48 giờ) điều trị.

Sau đó đến các ngày: D5 và D7.

- Test in vivo theo dõi 7 ngày (test mở rộng) được WHO, 1967 quy định về mức độ kháng của P.falciparum với các thuốc sốt rét như sau:

Đáp ứng với thuốc	Kí hiệu	Định nghĩa
Nhạy/Kháng độ I	S/RI	Giảm KSTSR trên 75% trong vòng 2 ngày đầu và sạch KSTSR trong vòng 7 ngày
Kháng độ II	RII	Giảm KSTSR dưới 75% trong vòng 2 ngày đầu và không sạch KSTSR trong vòng 7 ngày
Kháng độ III	RIII	Trong vòng 2 ngày đầu KSTSR không giảm, hoặc có thể tăng hơn so với ban đầu

Chú thích: D: day (ngày); S: sensitivity (nhạy); R: resistance (kháng).

2.2.2. Phương pháp đánh giá bằng kĩ thuật in vitro

(WHO standard in vitro technique)

Cho đến nay người ta đã áp dụng 2 kĩ thuật:

+ Macrotest hay còn gọi là Rieckmann macrotest (1968):

Kĩ thuật này dựa trên sự đánh giá thể tư dưỡng (trophozoite) của P.falciparum phát triển thành thể phân liệt (schizonte) bằng cách nuôi cấy kí sinh trùng sốt rét trong ống nghiệm ở môi trường nuôi cấy glucose (5 mg glucose trong 1 ml máu bệnh nhân). Bộ thử macrotest (macrotest kit) gồm có một ống chứng và 9 ống nghiệm có chứa nồng độ thuốc sốt rét khác nhau.

Ví dụ: chloroquine cần có các nồng độ: 0,25 nanomol, 0,50 nanomol, 0,75 nanomol, 1 nanomol, 1,25 nanomol, 1,50 nanomol, 1,75 nanomol, 2 nanomol, 3 nanomol.

Đến nồng độ 1,50 nanomol của chloroquine mà P.falciparum vẫn phát triển được từ thể tư dưỡng (trophozoite) sang thể phân liệt (schizonte) là kháng choloroquine. Ngày nay phương pháp này không được dùng phổ biến vì phải lấy lượng máu quá nhiều trên 1 bệnh nhân (10 - 11 ml máu) và rất khó thực hiện ở trẻ em.

+ Microtest hay còn gọi là Rieckmann microtest (1978):

Sau thành công nuôi cấy P.falciparum liên tục trong hệ thống bình nến (candle jar) của Trager và Jensen (1976). Rieckmann và CS (1978) đã đưa ra phương pháp microtest để đánh giá tính nhạy cảm của P.falciparum.

Phương pháp này so với phương pháp macrotest thuận tiện hơn (thay vì phải lấy 10 - 11 ml máu tĩnh mạch trong macrotest, chỉ cần lấy 0,1 ml máu và tiến hành dễ dàng ở trẻ em). Phương pháp này có nhiều ưu điểm là cho kết quả nhanh sau 24 – 30 giờ, số lượng máu ít, sử dụng tủ ẩm thực địa nên có thể áp dụng kĩ thuật ở các vùng sâu, vùng xa.

Hiện nay, Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã trang bị các bộ thử microtest với các thuốc thử tiêu chuẩn; chloroquine, amodiaquine, quinine, mefloquine, fansidar. Điều này cho phép đánh giá độ nhạy, kháng với thuốc của kí sinh trùng sốt rét ở các địa

phương trên diện rộng và với số lượng mẫu thử lớn.

Từ năm 1987 trở lại đây WHO hướng dẫn các mốc để đánh giá kháng thuốc là

- Chloroquine: ở nồng độ 8 pmol mà KSTSR vẫn phát triển thành schizonte.
- Amodiaquine: ở nồng độ 4 pmol mà KSTSR vẫn phát triển thành schizonte.
- Quinine: ở nồng độ 256 pmol mà KSTSR vẫn phát triển thành schizonte.
- Mefloquine: ở nồng độ 64 pmol mà KSTSR vẫn phát triển thành schizonte. Tuy nhiên phương pháp này đòi hỏi kĩ thuật phức tạp hơn, trang thiết bị đắt tiền, dụng cụ, thao tác phải đảm bảo vô trùng hoàn toàn, cần có môi trường RPMI 1640.

2.2.3. Phân loại đánh giá kết quả điều trị

Ngoài các phương pháp đánh giá kí sinh trùng sốt rét đã trình bày, để xác định khả năng kí sinh trùng sốt rét kháng thuốc có tính chất chỉ điểm, WHO đã đề ra phương pháp đánh giá đáp ứng điều trị có thể áp dụng cho tất cả các cơ sở điều trị bệnh sốt rét. Phương pháp này chỉ cần theo dõi kết quả điều trị bệnh nhân trong thời gian 14 ngày (vì đa số bệnh nhân sốt rét đều sống trong vùng có lây truyền tại chỗ).

Có 3 loại đánh giá đáp ứng điều trị: điều trị thất bại sớm (ETF: Early Treatment Failure), điều trị thất bại muộn (LTF: Late Treatment Failure) và điều trị kết quả (ACR: Adequate Clinical Response).

+ Đáp ứng điều trị được gọi là điều trị thất bại sớm (ETF) nếu bệnh nhân xuất hiện một trong những điểm sau trong 3 ngày đầu tiên của quá trình theo dõi:

- Xuất hiện những dấu hiệu nguy hiểm hoặc sốt rét nặng vào ngày D1, D2, hoặc D3 và có kí sinh trùng sốt rét (KSTSR) trong máu.

- Mật độ KSTSR trong máu ngày D2, cao hơn D0.

- Mật độ KSTSR ngày D3 ≥ 25% mật độ kí sinh trùng sốt rét ngày D0

+ Đáp ứng điều trị được gọi là điều trị thất bại muộn (LTF) nếu bệnh nhân xuất đấy không thấy dấu hiệu nào của ETF: hiện 1 trong những dấu hiệu sau trong thời gian theo dõi từ ngày D4 đến D14, mà trước

- Xuất hiện những dấu hiệu nguy hiểm và sốt rét nặng sau ngày D3, có kí sinh trùng sốt rét trong máu (cùng loại kí sinh trùng sốt rét với ngày D0).

- Bệnh nhân quay lại khám không đúng quy định vì tình trạng lâm sàng xấu đi và có kí sinh trùng sốt rét trong máu.

- Có kí sinh trùng sốt rét trong máu vào bất kì ngày nào quy định xét nghiệm máu D7, hoặc D14 (cùng chủng loại kí sinh trùng sốt rét với D0).

+ Đáp ứng điều trị gọi là điều trị kết quả (ACR) khi bệnh nhân không có dấu hiệu nào của ETF hoặc LTF và sạch KSTSR trong suốt thời gian theo dõi.

2.2.4. Phát hiện gen kháng thuốc của P.falciparum bằng phương pháp sinh học phân tử

- Xác định gen kháng chloroquin: gene Pfmdr1,2 (P. falciparum multydrug) và gene Pftcr (P. falciparum tranporter chloroquin resistance). Gene Pfmdr-1 nằm ở NST số 5 có nhiệm vụ mã hóa cho P-glycoprotein homologne-1 (Pgh-1) có trách nhiệm gây ra kháng chloroquin vf các thuốc chống sốt rét khác. Các nhà khoa học còn tìm thấy có sự đột biến tại codon 86 (aspartic được thay thế bằng tyrocine). Một vài vị trí đột biến kháng thuốc đã tìm thấy ở gen Pfmdr -1 đa hình như: Phe 184, Cys 1034,

Asp1042 and Tyr 1246. Ở Chấu Á Djimde và CS đã phát hiện ở codon 76 thyroxine (T76) được thay thế bởi lysine (K76).

- Xác định gen antifolate: tìm gen đặc hiệu kháng dihydrofolate reductase (DHFR) và dihydropteroate synthase (DHPS). Có 5 điểm đột biến: tại vi trí codon 436 serine được thay thế bởi alanine; tại codon 437 phenylalanine hoặc alanine được thay thế bởi glycine; tại codon 540 lysine được thay thế bởi glutamic; tại codon 581 alanine dược thay thế bởi glycine; tại codon 613 alanine được thay thế bởi serine hoặc threonin.

- Kháng pyrimethamin: tìm đột biến đặc hiệu trên gen DHFR: tại codon16 alanine được thay thế bởi valine; codon 51asparagine thây thế bới isoleusine;codon 59 cystein thay thế bởi arginine; codon 108 serine thay thế bởi asparagine, codon 164 isoleusine thay thế bởi leusine.

- Kháng quinine: tìm gen Pfmdr-1 kết hợp với Pftcr

- Xác định gen kháng mefloquin: tìm gen Pfmdr1 tại các vị trí Ser1034, Asn1042 và Asp1246

- Xác định đột biến kháng artemisinin tại vùng Keich 13 (K13).

2.3. Cơ chế kháng thuốc của kí sinh trùng sốt rét.

Cho đến nay cơ chế kí sinh trùng sốt rét kháng thuốc vẫn còn nhiều giả thuyết và chưa một giả thuyết nào được khẳng định hoàn toàn. Thuốc có nguồn gốc thảo mộc có hiệu lực lâu dài hơn với kí sinh trùng như quinine, artemisinine và dẫn chất. Thuốc có nguồn gốc tổng hợp hoá học bị kháng nhanh hơn như chloroquine, pyrimethamine, sulfonamid...

Trong số các giả thuyết, Beale và Walliker đưa ra 2 cơ chế về kháng thuốc như sau:

2.3.1. Cơ chế kháng không di truyền

Cơ chế kháng không di truyền là khả năng thích nghi sinh lí, sinh hoá của kí sinh trùng sốt rét.

Kiểu kháng thuốc này không bền vững, khi dừng áp lực thuốc thì khả năng kháng thuốc của kí sinh trùng sốt rét cũng mất theo.

2.3.2. Cơ chế kháng di truyền

* Kháng tự nhiên:

- Là kháng xuất hiện trước khi có áp lực thuốc.

- Nguyên nhân do biến dị tự nhiên gen của kí sinh trùng sốt rét, đến khi có áp lực thuốc thì được lựa chọn.

* Kháng thu nhận được (kháng mắc phải):

- Kháng chéo của kí sinh trùng sốt rét với các nhóm thuốc sốt rét là kí sinh trùng không những kháng một loại thuốc mà còn kháng chéo sang một loại thuốc khác (có thể cùng nhóm hoặc khác nhóm). Nguyên nhân do các thuốc sốt rét cùng tác dụng vào một khâu hoặc một chuỗi chuyển hoá của kí sinh trùng sốt rét.

- Kháng di truyền của P.falciparum là đặc tính kháng được di truyền từ bố hoặc mẹ sang thế hệ con. Nguyên nhân do gen của kí sinh trùng sốt rét dưới áp lực thuốc điều trị hoặc trong quá trình sinh sản và phát triển bị đột biến gây ra được di truyền từ một trong hai giao tử của bố hoặc mẹ.

- Hiện nay có nhiều giả thuyết về cơ chế kháng thuốc này như: - Cơ chế dựa vào cơ chế tác dụng của các loại thuốc sốt rét.

+ Cơ chế thiếu hụt nồng độ thuốc trong không bào tiêu hoá.

+ Cơ chế ngăn cản thuốc sốt rét thâm nhập vào trong hồng cầu bị nhiễm kí sinh trùng sốt rét.

+ Cơ chế kháng thuốc của kí sinh trùng sốt rét như kiểu kháng thuốc của tế bào ung thư.

- Tuy nhiên cơ chế dựa vào cơ chế tác dụng của các loại thuốc sốt rét đang được nhiều tác giả chú trọng hơn cả. Cơ chế tác dụng của thuốc sốt rét với kí sinh trùng sốt rét được chia ra như sau:

+ Sự cạnh tranh PABA (para amino benzoic acid) ức chế men tổng hợp DHFA (dihydrofolic acid): sulfon, DDS...

+ Sự ức chế men chuyển hoá acid folic thành folinic: pyrimethamine...

+ Sự tác động vào FP - IX (ferriprotoporphyrine IX) hoặc tập trung vào lysosom của kí sinh trùng (do gradient pH): chloroquine...

+ Sự rối loạn chuyển hoá protein: quinine.

+ Rối loạn tổng hợp protein: artemisinine và dẫn chất.

+ Phong bế ti lạp thể: primaquine.

* Một số cơ chế tác dụng của thuốc sốt rét và cơ chế KSTSR kháng thuốc:

- Nhóm 4 - amino-quinoleine (chloroquine) và aryl amino alcohol (mefloquine):

+ Cơ chế tác dụng: theo giả thuyết Fitch: Kí sinh trùng tiêu hoá hemoglobin và để tạo ra ferriprotoporphyrin (FP IX, còn gọi là hematin). Thông thường chất FP gắn vào một protein của kí sinh trùng (còn gọi là protein gắn hem) để hình thành phức hợp "FP + protein gắn hem" tức hemozoin là một sắc tố sốt rét không độc.

+ Chloroquine cạnh tranh với protein gắn hem, để hình thành phức hợp "FP + chloroquine" có tác dụng hủy màng và diệt kí sinh trùng. FP IX được coi như một thụ thể có ái lực cao và đặc hiệu với chloroquine.

+ Riêng mefloquine có thể gắn với 2 đích: FP và các phospholipid màng (FP + mefloquine và phospholipid + mefloquine) nên có tác dụng hủy màng và diệt kí sinh trùng cao hơn.

- Cơ chế kháng chloroquine:

+ FP kết tụ nhanh hoặc có ái lực rất yếu với chloroquine hoặc "protein gắn hem" của "kí sinh trùng kháng" tăng số lượng và ái lực với FP cho nên phức hợp FP + chloroquine giảm.

+ Bơm proton ngừng hoạt động: pH của kí sinh trùng tăng.

+ Permease và phospholipid của "kí sinh trùng kháng" bị biến đổi, thuốc chloroquin dễ thoát (Warhurst - Ginsburg).

+Gần đây người ta phát hiện P.falciparum đa kháng có gen MDR (multi drug resistant). MDR tăng sự chuyển vận P- glycoprotein quá mức trên màng và làm tăng đào thải chloroquine lên 4 lần (D.A Warrell).

+ Chloroquine tập trung trong lysosom của kí sinh trùng (độ toan cao) theo nguyên lí pH giữa 3 khoảng có gradient: Ngoài hồng cầu (pH: 7,4), trong hồng cầu (pH: 6,6), nguyên sinh chất của kí sinh trùng (pH: 7,6) và lysosom của kí sinh trùng (pH: 5,0). pH được duy trì bởi bơm proton H+. Ngoài ra, phospholipase của kí sinh trùng là tế bào đích của chloroquine, khi men này bị ức chế, các phospholipid của màng sẽ biến đổi và sẽ có tăng thấm qua màng.

- Nhóm kháng folic và kháng folinic:

+ Cơ chế tác dụng:

Kí sinh trùng phát triển nhờ vào quá trình tổng hợp acid folic.

Kháng folic (Antifolic): kí sinh trùng phân bào cần có DNA. Tiền chất của DNA là purin và pyrimidin được tổng hợp nhờ THFA (tetrahydrofolic acid) là D2ng hoạt hoá của DHFA (dihydrofolic acid). Muốn có acid này kí sinh trùng phải sử dụng PABA (para amino benzoic acid). Thuốc sốt rét nhóm sulfon, sulfamid có cấu trúc gần gũi với PABA nên cạnh tranh với PABA và dành nhau men tổng hợp acid dihydrofolic (dihydropteroate synthetase) làm ức chế men này và hậu quả là không tổng hợp được DHFA.

Kháng folinic (antifolinic): pyrimethamine và proguanil ức chế men khử acid dihydrofolic (dihydrofolat reductase), do đó không tạo đủ acid tetrahydrofolic (THFA).

+ Cơ chế kháng các thuốc sulfon, sulfamid và proguanil, pyrimethamine: Kí sinh trùng tăng sản xuất dihydropteroate synthetase.

Tạo dihydropteroate synthetase biến chất có ái lực yếu với sulfon, sulfamid... DHFA gắn với pyrimethamine yếu hơn 400 - 800 lần so với chủng nhạy. Lượng DHFA ở chủng kháng cao hơn chủng nhạy 30 - 80 lần.

+ Cơ chế kí sinh trùng kháng antifolic và antifolinic có thể do chromosom hoặc do plasmid, 2 nhóm thuốc này bị kháng rất nhanh.

- Nhóm alcoloid quinina (quinine...):

+ Cơ chế tác dụng:

Gây căng phồng những màng bao quanh kí sinh trùng và nhân.

Làm kết tụ những hạt hemozoin thành những đám, nhờ phân chia trong cả bào tương (tương tự mefloquine).

Tạo phức hợp quinine - ferriprotoporphyrin - IX (như mefloquine, chloroquine).

+ Cơ chế kháng: Cho tới nay người ta chưa thấy được sự thay đổi cấu trúc và thay đổi hoá sinh nên chưa cắt nghĩa được rõ cơ chế kí sinh trùng kháng với quinine, có thể cũng như ở chloroquine nhưng lại khó giải thích vì sao quinine có tác dụng với một số chủng kí sinh trùng đã kháng chloroquine.

- Nhóm secquiterpens lactone (artemisinine, artesunate...):

+ Cơ chế tác dụng:

Do cầu nối endo - peroxyd bị khử.

Thuốc chuyển hoá nhanh, giải phóng oxy tự do từ cầu nối peroxyd, các gốc tự do mới sinh sẽ diệt kí sinh trùng.

Artemisinine ức chế tổng hợp protein rất sớm, gây vón kết nhân, màng kí sinh trùng, tỉ lạp thể, lysosom, màng nhân... của kí sinh trùng phù nề, tổn thương.

+ Cơ chế kháng: chưa xác định.

- Nhóm 8 - amino quinoleine (primaquine...):

+ Cơ chế tác dụng:

Do làm thay đổi hình thái dạng ti lạp thể (mitochondrielike) ở thể tư dưỡng trong hồng cầu của P.berghei.

Cơ chế tác dụng có liên quan tới sự vận chuyển electron và với sự oxy hoá - khử của ubiquinon của kí sinh trùng.

Người ta chưa thật rõ primaquine tác động trực tiếp hay qua trung gian của những chất chuyển hoá (như 6 - OH - primaquine, 5 - OH - primaquine, dihydroxy - primaquine...).

+ Cơ chế kháng:

Sự kháng của kí sinh trùng với primaquine (và dẫn chất 8 - aminoquinoleine) khi dùng để diệt giao bào chưa được chứng minh.

Người ta nhận thấy kí sinh trùng kháng thuốc và sống sót thường có số lớn t lạp thể nhiều hơn kí sinh trùng bình thường. Sự tăng sinh các tỉ lạp thể tạm coi là một trong những cơ chế kí sinh trùng kháng primaquine.

2.4. Nguyên nhân kháng thuốc của kí sinh trùng sốt rét

Có những quần thể hoặc cá thể kí sinh trùng sốt rét ngẫu nhiên ít hoặc không nhạy Ví dụ: chủng P.falciparum ở Philippin có sự nhạy cảm thấp tự nhiên với amodiaquine. Chủng P.falciparum ở Italia, ở Đông Nam Á nhạy cảm thấp với quinine (Peters W., 1974, 1978; Bruce - Chwatt R.H., 1981).

Kháng thuốc là kết quả của đột biến và sự chọn lọc tự nhiên của kí sinh trùng sốt rét trên cơ sở di truyền.

Ngoài ra còn có những yếu tố quan trọng làm cho kí sinh trùng kháng thuốc:

+ Dùng thuốc sốt rét thấp hơn liều công hiệu.

+ Điều trị sốt rét hàng loạt, rộng rãi, không có sự kiểm tra quản lí, đặc biệt với những người chưa có miễn D1ch và có mật độ kí sinh trùng sốt rét cao.

2.5. Sự lan truyền của chủng kí sinh trùng sốt rét kháng thuốc.

Phụ thuộc vào các yếu tố:

Ở những vùng sốt rét lưu hành nặng, người dân đã có đáp ứng miễn dịch sốt rét cao, nên tăng tác dụng của thuốc sốt rét, phần kháng thuốc bị che lấp đi.

Do sự di chuyển của bệnh nhân sốt rét và người lành mang kí sinh trùng sốt rét từ vùng này sang vùng khác sẽ làm cho hiện tượng kháng thuốc lan rộng.

Do sự có mặt của loài muỗi sốt rét tiếp nhận và truyền được các chủng kháng: như muỗi An.dirus là muỗi đốt người ở ngoài nhà nên những vùng mà người dân sống du canh, du cư, những người đào vàng, đá quý là đối tượng thích hợp để muỗi này gây bệnh và làm lan truyền mạnh chủng P.falciparum kháng thuốc vì những đối tượng này rất ít trường hợp được điều trị chu đáo

2.6. Nguyên tắc điều trị bệnh nhân sốt rét do P.falciparum kháng thuốc

Phải dùng phác đồ chống kháng. Tùy theo mức độ kháng (Ry, Ru, Rm). Căn cứ vào loại thuốc bệnh nhân đã dùng lần trước.

Dựa vào thể trạng bệnh nhân chọn phác đồ thuốc thích hợp trên cơ sở dược động học của thuốc. Có thuốc dự bị khi có kháng thuốc, có thể thay đổi thuốc dùng từng thời kì, giữa các vùng và dành thuốc tốt cho sốt rét nặng và sốt rét ác tính.

Khi áp dụng phác đồ gồm hai đợt thuốc, cần phải xét nghiệm máu kiểm tra kí sinh trùng sốt rét vào những ngày cuối của đợt một. Nếu còn thấy kí sinh trùng sốt rét, phải kéo dài ngày dùng thuốc, không dùng đợt hai nữa.

Trong quá trình điều trị sốt rét dai dẳng do kí sinh trùng sốt rét kháng thuốc, cần thường xuyên theo dõi toàn diện tình trạng của bệnh nhân, để kịp thời phát hiện và xử trí những triệu chứng nặng đe dọa ác tính.

Tăng cường kiểm tra kí sinh trùng sốt rét ở mọi bệnh nhân điều trị, thực hiện điều trị tiệt căn, dủ liều, đúng phác đồ. Không áp dụng điều trị phỏng chừng (presumptive) với những liều thấp hơn liều thông thường quy định.

LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày lịch sử và đặc điểm của ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc?
2. Trình bày phương pháp đánh giá mật độ và số lượng ký sinh trùng sốt rét?
3. Trình bày các phương pháp đánh giá ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc?
4. Trình bày nguyên nhân, cơ chế và sự lan truyền ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc?

BÀI 3. MỘT SỐ KỸ THUẬT NHUỘM VÀ NUÔI CẤY CHẨN ĐOÁN VI NẤM

MỤC TIÊU

*** Kiến thức**

1. Trình bày được nguyên tắc, các bước tiến hành của một số kỹ thuật nhuộm và nuôi cấy vi nấm.

2. Mô tả được đặc khuẩn lạc và hình thể một số vi nấm hoại sinh.

*** Kỹ năng**

3. Nhận định được kết quả nhuộm và nuôi cấy vi nấm trên một số hình ảnh mẫu.

4. Xác định được hình ảnh một số vi nấm hoại sinh trên hình ảnh mẫu.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm**

5. Tổng hợp kiến thức đã được học về vi nấn gây bệnh, tham khảo thêm các tài liệu liên quan nhằm phát triển năng lực bản thân.

6. Thể hiện khả năng làm việc độc lập và làm việc nhóm, tổng hợp, đánh giá kết quả công việc của các thành viên trong nhóm để hoàn thành các bài tập được giao.

NỘI DUNG

1. Hình thể một số vi nấm hoại sinh

1.1. Alternaria

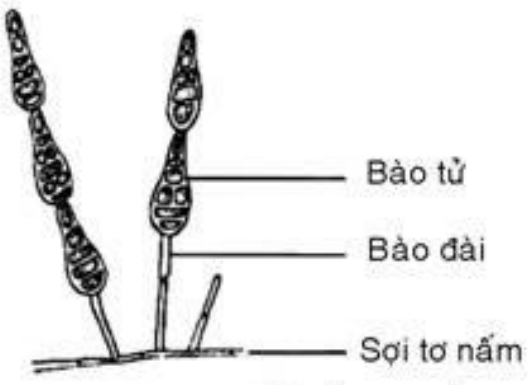
- Khuẩn lạc: phẳng, mượt và có màu xanh ô liu đến đen. Có kích thước từ vài mm đến vài cm đường kính. Khi thuộc địa trưởng thành, nó có thể phát triển một vòng đồng tâm sẫm màu xung quanh mép.

- Hình thể quan sát dưới kính hiển vi

  + Sợi tơ nấm phân vách, màu nâu đen

  + Bào đài không phân nhanh

  + Bào tử màu đen, có nhiều vách ngăn



Hình 3.1. Hình thể cấu tạo nấm *Alternaria*

1.2. Cephalosporium

- Khuẩn lạc: Mọc nhanh, mặt khóm hơi nhăn, có lông tơ. Màu trắng xám hoặc hồng. Không có sắc tố

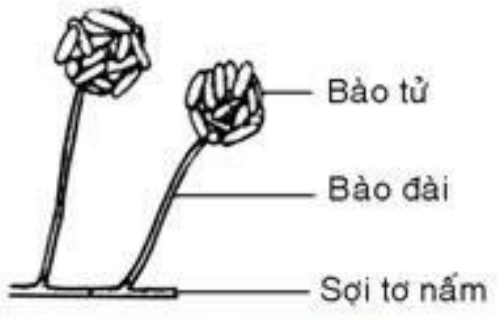
- Hình thể quan sát dưới kính hiển vi

+ Sợi tơ nấm phân vách

+ Bào đài phân nhánh hoặc không phân nhánh

+ Bào tử hình bầu dục, dài, đôi khi phân vách 2-3 tế bào

+ Bào tử thường đứng thành chùm đầu bào đài



Hình 3.2. Hình thể nấm *Cephalosporium sp*

1.3. Aspergilus fumigatus

- Khuẩn lạc: Mọc nhanh. Mặt khóm phẳng như nhung, bột. Màu xám xanh đến xanh lá cây sẫm. Có sắc tố phía sau đen.

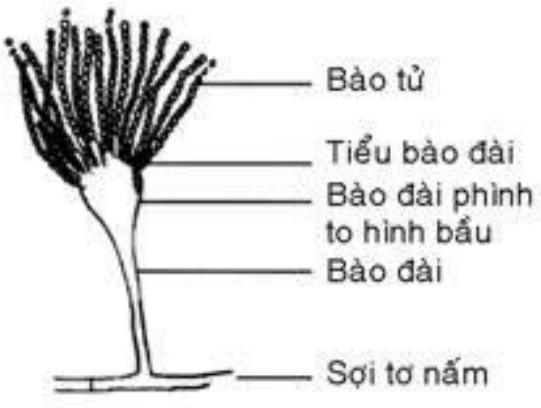
- Hình thể quan sát dưới kính hiển vi:

+ Sợi tơ nấm phân vách, phân nhánh

+ Bào đài dài, đầuu bào đài phình to thành bầu

+ Phủ đầy 1 hay 2 hàng tiểu bào đài

+ Từ tiểu bào đài sinh ra các bào tử xếp thành chuỗi dài



Hình 3.3. Hình thể nấm *A.fumigatus*

1.4. Aspergilus niger

- Khuẩn lạc: Mọc nhanh. Mặt khóm phẳng như len. Màu trắng đến vàng, khi già có màu nâu sẫm hoặc đen

- Hình thể quan sát dưới kính hiển vi:

+ Sợi tơ nấm phân vách, phân nhánh

+ Bào đài dài, đầu bào đài phình to thành bầu

+ Phủ đầy 1 hay 2 hàng tiểu bào đài

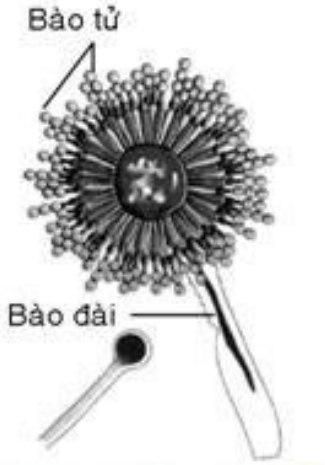
+ Từ tiểu bào đài sinh ra các bào tử xếp thành chuỗi dài

Hình 3.4. Hình thể nấm *Aspergillus niger*

1.5. Aspergilus flavus

- Khuẩn lạc: Mọc nhanh. Mặt khóm lúc đầu có màu vàng sau đổi sang màu xanh lá cây

- Hình thể quan sát dưới kính hiển vi:



Hình 3.5. Hình thể nấm *A.flavus*

+ Sợi tơ nấm phân vách, phân nhánh.

+ Bào đài dài, đầu bào đài phình to thành bầu.

+ Phủ đầy 1 hay 2 hàng tiểu bào đài.

+ Từ tiểu bào đài sinh ra các bào tử xếp thành chuỗi.

1.6. Penicillium sp

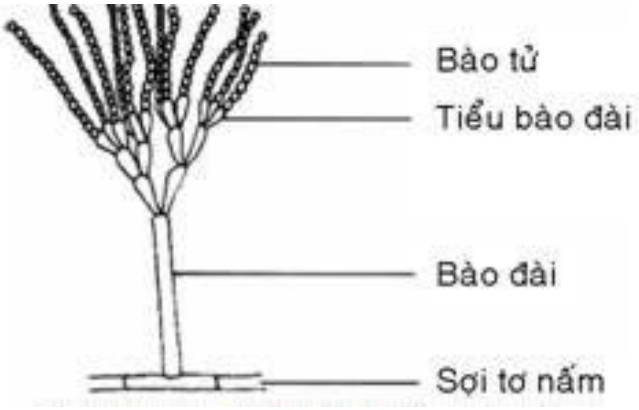
- Khuẩn lạc: Mọc nhanh. Mặt khóm phẳng như bột. Màu trắng xanh đến xanh da trời hoặc có các màu khác.

- Hình thể quan sát dưới kính hiển vi:

+ Sợi tơ nấm phân vách, phân nhánh.

+ Bào đài phân nhánh, tiểu bào đài xếp như hình bàn tay hay chồi.

+ Từ tiểu bào đài sinh ra bào tử tròn xếp thành chuỗi.



Hình 3.6. Hình thể nấm *Penicillium sp*

2. Một số kỹ thuật nhuộm vi nấm

2.1. Kỹ thuật nhuộm mực tàu

- Nguyên lý: Thường dùng để khảo sát vi nấm có nang, nhất là vi nấm Cryptococcus neoformans, mực tàu không thấm vào nang tạo một khoảng trống, trắng chung quanh tế bào vi nấm.

- Dụng cụ:

+ Kính hiển vi

+ Tủ an toàn sinh học cấp 2

+ Mực tàu

+ Lam kính

+ Lá kính

+ Bút viết kính

+ Đèn cồn

+ Que lấy bệnh phẩm

+ Khay nhuộm

+ Bệnh phẩm

- Các bước tiến hành:

1. Trên tấm lam kính sạch, khô, nhỏ 1 giọt mực tàu
2. Nhỏ 1 giọt bệnh phẩm, hay lứa cấy lên giọt mực tàu
3. Đốt kim cấy để nguội, trộn mực tàu và bệnh phẩm
4. Đậy lá kính lên giọt mực tàu đã hòa với bệnh phẩm
5. Khảo sát tiêu bản dưới kính hiển vi

- Nhận định kết quả: Nếu trong bệnh phẩm có Cryptococcus neoformans: tế bào nấm tròn hay bầu dục, bên ngoài được bao bởi 1 nang lớn, nang không thấm màu, do đó sáng lên trên nền đen của mực tàu.

- Lưu ý: Nếu nền mục tàu quá đậm có thể làm loãng bớt bằng 1 giọt nước cất

2.2. Kỹ thuật nhuộm PAS (periodic acid schiff)

- Nguyên lý: Dùng một tác nhân oxy hoá là acid periodic để phá vỡ mối liên kết của 2 nguyên tử C trong một số nhóm hoá học (các nhóm glycol 1 - 2, hydro 1. amino - 2, hydroxy - 1, alkylamino - 2 và hydrõyl - 1, ceto - 2) làm xuất hiện các nhóm aldehyt.

Các nhóm aldehyt này nhìn thấy được nhờ phản ứng của thuốc thử Schiff (fuschin basic không màu bởi axit sulfureux) tạo thành chất có màu đỏ.

- Dụng cụ:

+ Lam bệnh phẩm

+ Giá nhuộm

+ Giá gỗ đựng lame

+ Bể nhuộm

+ Pipet

+ Vòi nước

+ Đồng hồ

+ Các bể hóa chất Xylen I, Xylen II, Xylen III, Cồn 100o I, Cồn 100o II, Cồn 90o, Hematoxyline (đã lọc), Lithium, Periodic 1%, thuốc thử Schiff.

+ Keo gắn Baume, Lamen, bút dạ, nhãn lam.

- Các bước tiến hành:

1. Ngâm tiêu bản trong cồn ethylic 95˚ trong 1 phút

2. Ngâm tiêu bản trong PAS trong 5 phút

3. Ngâm tiêu bản trong Basic fuchsin 2 phút

4. Rửa bằng nước thường

5. Lấy tiêu bản ra nhỏ vài giọt Light green

6. Rửa ngay bằng nước thường

7. Ngâm vào cồn ethylic 95˚

8. Ngâm vào xylen

9. Hong khô

10. Phủ lá kính, dán bằng Baumme Canada hay Permount

11. Khảo sát dưới kính hiển vi

- Nhận định kết quả:

+ Vi nấm bắt màu đỏ tím

+ Hiện nay, người ta dùng chất huỳnh quang để phát hiện nấm như thuốc nhuộm Calciflour trắng phát hiện nấm nhanh, kể cả Pneumocystis carinii, xanh Toluidine nhuộm đàm để tìm P.carinii.

- Lưu ý: Ngay sau khi nhỏ Light green rửa ngya tiêu bản bằng nước

2.3. Kỹ thuật kháng acid (phương pháp Kinyoun cải tiến)

- Nguyên lý: là nhuộm tiêu bản bằng carbon fuschin, sau đó tẩy màu và nhuộm nền tiêu bản bằng màu xanh. Nhuộm kháng acid khi muốn tìm Norcardia.

- Dụng cụ:

+ Kính hiển vi

+ Lam kính

+ Giá đựng lam kính

+ Que tăm bông

+ Găng tay

+ Carbon-fuchsin

+ Cồn acid

+ Xanh Malachit 1% hoặc Methylen 1%.

- Các bước tiến hành

1. Phết bệnh phẩm mỏng trên lam kính, cố định bằng cách hơ nóng Phủ Carbon fuchsin, để trong 3 phút

2. Rửa lam kính với nước

3. Tẩy màu bằng cồn acid

4. Phủ xanh Methylen, để trong 1 phút

5. Rửa lam kính với nước

6. Hong khô

7. Quan sát dưới kính hiển vi

- Nhận định kết quả: Nocardia sp bắt màu ñỏ của Carbon fuchsin.
- Lưu ý: Tẩy kỹ màu bằng cồn acid

3. Một số kỹ thuật cấy vi nấm

3.1. Kỹ thuật cấy nấm trên kính

- Nguyên lý: Với phương pháp cấy nấm trên kính: sự liên hệ giữa bào tử, cơ cấu sinh bào tử, nhánh nấm không bị xáo trộn
- Dụng cụ:

a. Môi trường: Thạch Sabouraud hoặc thạch khoai đường: 15-20ml (cho 1 đĩa thạch)

b. Dụng cụ và thuốc thử:

+ Kính hiển vi
+ Hộp petri, đường kính 90mm
+ Que thủy tinh hình chữ U, V
+ Kim cấy
+ Kẹp
+ Lam kính
+ Lá kính (tốt nhất cỡ 18 x 18mm)
+ Nước cất vô trùng
+ Gốc vi nấm cần cấy
+ Phẩm xanh Lacto- phenol
+ Dung dịch sát trùng

- Các bước tiến hành:

1. Đặt lam kính lên que thủy tinh uốn cong hình chữ U hay V.

2. Tất cả cho vào hộp Petri, đem hấp vô trùng.

3. Đổ thạch Sabouraud vào một Petri khác để nguội. Dùng dao vô trùng cắt thạch thành khối 1 x 1mm, đặt thạch lên lam kính.

4. Cấy nấm ở điểm giữa mỗi cạnh của khối thạch.

5. Hơ nhẹ lá kính lên ngọn đèn - đậy lá kính lên khối thạch.

6. Cho vào hộp 1 - 3ml nước cất vô trùng.

7. Đậy nắp hộp Petri, ủ nhiệt độ phòng thí nghiệm.

8. Theo dõi lứa cấy: khi thấy nấm mọc, gỡ lá kính đặt lên tấm lam kính có sẵn 1 giọt LPCB.

9. Dùng kim cấy lấy khối thạch trên lam cấy bỏ vào bình nước sát trùng.

10. Làm thêm một tiêu bản thứ 2: nhỏ 1 giọt LPCB lên nấm nơi miếng thạch vừa được lấy ra. Đậy lá kính lên.

11. Khảo sát tiêu bản dưới kính hiển vi.

- Nhận định kết quả

+ Nấm hoại sinh mọc: 3 - 7 ngày.

+ Nấm gây bệnh mọc: 2 - 3 tuần.

+ Không nên cấy trên kính các loại nấm nguy hiểm. Ví dụ: Histoplasma capsulatum

- Lưu ý:

+ Đảm bảo các kỹ thuật vô khuẩn trong quá trình nuôi cấy.

+ Lưu giữ tiêu bản bằng cách dán kín xung quanh lá kính bằng keo sơn móng tay.

3.2. Phương pháp Dalmau

- Nguyên tắc: Thạch bột bắp (ngô) là môi trường thuận lợi cho sự hình thành bào tử bao dày của các loại nấm men đặc biệt là nấm *Candida* spp.

- Dụng cụ:

+ Kính hiển vi

+ Kim cấy nấm

+ Lá kính

+ Gốc nấm cần định danh

+ Ống nghiệm chứa NaCl 0,85% vô trùng

+ Môi trường: thạch bột bắp.

- Các bước tiến hành:

1. Đổ môi trường ra hộp Petri.

2. Lấy gốc nấm cần cấy hòa tan vào ống nghiệm có chứa NaCl 0,85% vô trùng (có thể lấy nấm từ lứa cấy lỏng).

3. Đốt kim cấy để nguội - lấy nấm.

4. Dùng kim cấy có nấm vạch sâu vào trong thạch 2 đường song song cách nhau khoảng 1cm.

5. Đốt khuyên cấy để nguội, vạch đường chữ Z trên 2 đường cấy.

6. Hơ lá kính trên ngọn đèn để sát trùng rồi phủ lên 2 đường cấy.

7. Ủ nhiệt độ phòng 3 - 5 ngày.

8. Khi thấy nấm mọc trên 2 đường cấy, khảo sát trực tiếp nấm trong hộp cấy dưới kính hiển vi.

- Nhận định kết quả: Quan sát đặc điểm hình thể của nấm dưới kinh hiển vi
- Lưu ý:

+ Đảm bảo các kỹ thuật vô khuẩn trong quá trình cấy nấm.

+ Có thể đổ thạch trên lam kính và cấy giống như cấy trên đĩa petri.

*** LƯỢNG GIÁ**

1. Trình bày hình thể một số vi nấm hoại sinh: Alternaria, Cephalosporium, Aspergilus fumigatus, Aspergilus niger, Aspergilus flavus, Penicillium sp?
2. Trình bày nguyên lý, các bước tiến hành, nhận định kết quả của các kỹ thuật nhuộm vi nấm: kỹ thuật nhuộm mực tàu, nhuộm PAS, kỹ thuật nhuộm kháng acid?
3. Trình bày nguyên tắc, các bước tiến hành và nhận định kết quả của một số kỹ thuật nuôi cấy vi nấm?

PHẦN THỰC HÀNH

BÀI 4: KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN BẢO QUẢN TRỨNG GIUN SÁN

MỤC TIÊU

*** Kỹ năng:**

1. Thực hiện được quy trình làm tiêu bản bảo quán trứng giun, sán vỏ mỏng.
2. Thực hiện được quy trình làm tiêu bản bảo quản trứng giun, sán vỏ dày.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm:**

3. Thể hiện sự cẩn thận, chính xác trong khi thực hành
4. Thực hiện đúng các quy định về an toàn sinh học trong quá trình thực hành.
5. Xây dựng được kỹ năng làm việc độc lập và làm việc nhóm.

NỘI DUNG

1. Chuẩn bị

1.1. Chuẩn bị nhân viên y tế

- Trang phục gọn gàng đúng quy định
- Đội mũ, đeo khẩu trang
- SV chuẩn bị bài trước khi lên lớp

1.2. Chuẩn bị phòng thực hành

- Phòng thực tập ký sinh trùng
- Đầy đủ máy móc trang thiết bị

1.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Mẫu trứng giun sán

1.4. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Kính hiển vi có vật kính X10
- Lam kính, lamen, giá lam, bút kính, pipet, bàn gắn tiêu bản, giá tiêu bản, hộp tiêu bản, đền cồn
- Paraffin, gôm arabic, formalin 10%

2. Tiến hành

- Quy trình làm tiêu bản bảo quản trứng giun, sán vỏ dày.

QUY TRÌNH KỸ THUẬT BẢO QUẢN TRỨNG GIUN SÁN VỎ DÀY

TT	Các bước tiến hành
1	Chuẩn bị nhân viên y tế
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm

3	Ly tâm lấy cặn mẫu trứng giun, sán
4	Trộn cặn ly tâm với dung dịch gắn tiêu bản
5	Chuẩn bị lam kính
6	Nhỏ 1 giọt hỗn hợp cặn trứng giun, sán và dung dịch gắn lên lam kính
7	Đậy lamen lên giọt hỗn hợp cặn trứng giun, sán và dung dịch
8	Phơi khô tiêu bản
9	Bảo quản tiêu bản
10	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
11	Rửa tay
12	Ghi kết quả vào sổ lưu

- Quy trình làm tiêu bản bảo quản trứng giun, sán vỏ mỏng.

QUY TRÌNH KỸ THUẬT BẢO QUẢN TRỨNG GIUN SÁN VỎ MỎNG

TT	Các bước tiến hành
1	Chuẩn bị nhân viên y tế
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm
3	Chuẩn bị lam kính
4	Nhỏ 1 giọt mẫu trứng giun sán lên lam kính
5	Đậy lamen lên giọt trứng giun sán
6	Hơ nóng bàn gắn tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn
7	Nhúng cạnh bàn gắn đã được hơ nóng vào khay gôm gắn
8	Gắn cạnh lamen bằng gôm gắn
9	Phơi khô tiêu bản
10	Bảo quản tiêu bản
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
12	Rửa tay
13	Ghi kết quả vào sổ lưu

3. Các bước cần lưu ý

- Gắn tiêu bản trứng vỏ mỏng: hơ bàn gắn tiêu bản nóng vừa đủ, không được để cháy gôm gắn

- Gắn tiêu bản trứng vỏ dày: trộn đều mẫu trứng giun sán trong hỗn hợp không tạo ra bọt khí

4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại phòng thực hành.
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm.
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật.

Lượng giá

- Theo mục tiêu bằng thang điểm

Các phụ lục

- Quy trình kỹ thuật

QUY TRÌNH KỸ THUẬT BẢO QUẢN TRỨNG GIUN SÁN VỎ DÀY

TT	Các bước tiến hành	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc - Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn - Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng đúng kỹ thuật
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm	Thuận tiện cho quá trình thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Đầy đủ dụng cụ: lam kính, bút kính, pipet nhỏ giọt… - Hóa chất đảm bảo chất lượng: dung dịch gắn tiêu bản + Còn hạn sử dụng + Có nắp đậy kín + Để ở nhiệt độ phòng (25^0C) - Mẫu trứng giun sán: giun đũa, giun tóc, sán dây đã được bảo quản trong các dung dịch bảo quản, lưu giữ và cố định ký sinh trùng.
Tiến hành			
3	Ly tâm lấy cặn mẫu trứng giun,	- Loại bỏ bớt phần dịch lỏng có trong mẫu trứng	- Mẫu trứng giun sán được ly tâm ở tốc độ 1500 vòng/phút x

	sán	giun sán	2 phút - Phần dịch nổi được loại bỏ hết
4	Trộn cặn ly tâm với dung dịch gắn tiêu bản	- Chuẩn bị mẫu trứng giun sán để làm tiêu bản	- Cặn trứng giun sán được trộn với dung dịch gắn với tỷ lệ 1:3 - Hỗn hợp không có bọt khí
5	Chuẩn bị lam kính	- Chuẩn bị lam làm kỹ thuật.	- Lam kính khô sạch, không xước - Thông tin trên lam đúng với mẫu trứng giun, sán đã chuẩn bị
6	Nhỏ 1 giọt hỗn hợp cặn trứng giun, sán và dung dịch gắn lên lam kính	- Lấy bệnh phẩm thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Giọt dung dịch nằm chính giữa lam kính, không có bọt khí
7	Đậy lamen lên giọt hỗn hợp cặn trứng giun, sán và dung dịch	- Dàn mỏng và đều mẫu trứng giun sán	- Lamen nằm ngay ngắn, cân đối chính giữa lam kính - Dung dịch trong lamen tràn đều, không có bọt khí, không tràn ra khỏi lamen
8	Phơi khô tiêu bản	- Hoàn thiện tiêu bản bảo quản và lưu trữ trứng giun sán vỏ dày	- Tiêu bản được xếp lên giá, khay thẳng hàng, giữa các tiêu bản phải có khoảng cách - Phơi đến khi dung dịch trong lamen khô hoàn toàn
9	Bảo quản tiêu bản	- Lưu giữ tiêu bản được lâu dài phục vụ công tác học tập và nghiên cứu	- Tiêu bản được xếp vào hộp/giá tiêu bản có nhãn phân loại - Bảo quản ở nhiệt độ 22-25^{0}C, ở nơi khô thoáng tránh ánh sáng trực tiếp, bụi bẩn.
10	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	- Dụng cụ, hóa chất được bảo quản đúng quy định,	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí với điều kiện về nhiệt độ,

		đảm bảo chất lượng cho lần xét nghệm tiếp theo - Đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế và cho cộng đồng	độ ẩm và ánh sáng phù hợp - Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng - Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định: + Bệnh phẩm để vào nơi quy định + Lam kính, găng ta bỏ vào thùng rác thải y tế
11	Rửa tay	Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng
12	Ghi kết quả vào sổ lưu	Lưu trữ, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác theo quy định: + Loại trứng giun sán + Ngày làm tiêu bản + Số lượng tiêu bản

QUY TRÌNH KỸ THUẬT BẢO QUẢN TRỨNG GIUN SÁN VỎ MỎNG

TT	Các bước tiến hành	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc - Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn - Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng đúng kỹ thuật
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm	Thuận tiện cho quá trình thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Đầy đủ dụng cụ: lam kính, bút kính, pipet nhỏ giọt, bàn gắn tiêu bản - Hóa chất đảm bảo chất lượng: gôm gắn tiêu bản + Còn hạn sử dụng

			+ Có nắp đậy kín + Để ở nhiệt độ phòng (25^0C) - Mẫu trứng giun sán: giun móc/mỏ, giun kim, sán lá đã được bảo quản trong các dung dịch bảo quản, lưu giữ và cố định ký sinh trùng.
Tiến hành			
3	Chuẩn bị lam kính	- Chuẩn bị lam làm kỹ thuật.	- Lam kính khô sạch, không xước - Thông tin trên lam đúng với mẫu trứng giun, sán đã chuẩn bị
4	Nhỏ 1 giọt mẫu trứng giun sán lên lam kính	- Lấy bệnh phẩm thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Giọt dung dịch nằm chính giữa lam kính, không có bọt khí
5	Đậy lamen lên giọt trứng giun sán	- Dàn mỏng và đều mẫu trứng giun sán	- Lamen nằm ngay ngắn, cân đối chính giữa lam kính - Dung dịch trong lamen tràn đều, không có bọt khí, không tràn ra khỏi lamen
6	Hơ nóng bàn gắn tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn	- Làm nóng bàn gắn giúp lấy được gôm gắn tiêu bản	- Chọn cạnh bàn gắn có chiều dài phù hợp với lamen - Cạnh bàn gắn tiêu bản được làm nóng đều
7	Nhúng cạnh bàn gắn đã được hơ nóng vào khay gôm gắn	- Lấy gôm gắn lên bàn gắn	- Cạnh bàn gắn bám đều gôm gắn
8	- Gắn cạnh lamen bằng gôm gắn	- Tạo thành bờ bao quanh lamen, gắn lamen chặt vào lam kính, bảo quản trứng giun sán ở phía	- Gôm gắn từ bàn gắn nhỏ từ từ và đều xuống cạnh lamen - Bờ gôm gắn khoảng 2mm, ½ phủ trên lamen, ½ phủ trên lam

		trong lamen	kính - Bờ gắn đều, mịn, khép kín 4 góc, không nứt vỡ
9	Phơi khô tiêu bản	- Hoàn thiện tiêu bản bảo quản và lưu trữ trứng giun sán	- Tiêu bản được xếp lên giá, khay thẳng hàng, giữa các tiêu bản phải có khoảng cách - Phơi đến khi phần gôm gắn khô hoàn toàn
10	Bảo quản tiêu bản	- Lưu giữ tiêu bản được lâu dài phục vụ công tác học tập và nghiên cứu	- Tiêu bản được xếp vào hộp/giá tiêu bản có nhãn phân loại - Bảo quản ở nhiệt độ 22-25^{0}C, ở nơi khô thoáng tránh ánh sáng trực tiếp, bụi bẩn.
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	- Dụng cụ, hóa chất được bảo quản đúng quy định, đảm bảo chất lượng cho lần xét nghệm tiếp theo - Đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế và cho cộng đồng	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí với điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng phù hợp - Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng - Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định: + Bệnh phẩm để vào nơi quy định + Lam kính, găng ta bỏ vào thùng rác thải y tế
12	Rửa tay	Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng
13	Ghi kết quả vào sổ lưu	Lưu trữ, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác theo quy định: + Loại trứng giun sán + Ngày làm tiêu bản + Số lượng tiêu bản

- Bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT BẢO QUẢN TRỨNG GIUN SÁN VỎ DÀY

TT	Các bước tiến hành	Đạt	Không đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế		
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm		
Tiến hành			
3	Ly tâm lấy cặn mẫu trứng giun, sán		
4	Trộn cặn ly tâm với dung dịch gắn tiêu bản		
5	Chuẩn bị lam kính		
6	Nhỏ 1 giọt hỗn hợp cặn trứng giun, sán và dung dịch gắn lên lam kính		
7	Đậy lamen lên giọt hỗn hợp cặn trứng giun, sán và dung dịch		
8	Phơi khô tiêu bản		
9	Bảo quản tiêu bản		
10	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
11	Rửa tay		
12	Ghi kết quả vào sổ lưu		

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT BẢO QUẢN TRỨNG GIUN SÁN VỎ MỎNG

TT	Các bước tiến hành	Đạt	Không đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế		
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm		
Tiến hành			
3	Chuẩn bị lam kính		
4	Nhỏ 1 giọt mẫu trứng giun sán lên lam kính		
5	Đậy lamen lên giọt trứng giun sán		
6	Hơ nóng bàn gắn tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn		
7	Nhúng cạnh bàn gắn đã được hơ nóng vào khay gôm gắn		
8	Gắn cạnh lamen bằng gôm gắn		

9	Phơi khô tiêu bản		
10	Bảo quản tiêu bản		
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
12	Rửa tay		
13	Ghi kết quả vào sổ lưu		

- Thang điểm

THANG ĐIỂM KỸ THUẬT BẢO QUẢN TRỨNG GIUN SÁN VỎ DÀY

TT	Các bước tiến hành	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
Chuẩn bị					
1	Chuẩn bị nhân viên y tế				
2	Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
Tiến hành					
3	Ly tâm lấy cặn mẫu trứng giun, sán				
4	Trộn cặn ly tâm với dung dịch gắn tiêu bản				
5	Chuẩn bị lam kính				
6	Nhỏ 1 giọt hỗn hợp cặn trứng giun, sán và dung dịch gắn lên lam kính				
7	Đậy lamen lên giọt hỗn hợp cặn trứng giun, sán và dung dịch				
8	Phơi khô tiêu bản				
9	Bảo quản tiêu bản				
10	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
11	Rửa tay				
12	Ghi kết quả vào sổ lưu				
	Tổng				

Tổng điểm: 24

THANG ĐIỂM KỸ THUẬT BẢO QUẢN TRỨNG GIUN SÁN VỎ MỎNG

TT	Các bước tiến hành	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
Chuẩn bị					

1	Chuẩn bị nhân viên y tế				
2	Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
Tiến hành					
3	Chuẩn bị lam kính				
4	Nhỏ 1 giọt mẫu trứng giun sán lên lam kính				
5	Đậy lamen lên giọt trứng giun sán				
6	Hơ nóng bàn gắn tiêu bản trên ngọn lửa đèn cồn				
7	Nhúng cạnh bàn gắn đã được hơ nóng vào khay gôm gắn				
8	Gắn cạnh lamen bằng gôm gắn				
9	Phơi khô tiêu bản				
10	Bảo quản tiêu bản				
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
12	Rửa tay				
13	Ghi kết quả vào sổ lưu				
	Tổng				

Tổng điểm: 26

- Chỉ tiêu thực hành

STT	**Chỉ tiêu**	**Yêu cầu đạt**	**Kết quả thực hiện**	**Xác nhận của người đánh giá**
1	Số lần quan sát GV/SV khác thực hiện kỹ thuật	**3**		
2	Số lần thực hiện có hướng dẫn của GV	**1**		
3	Số lần tự làm	**1**		

BÀI 5: KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN BỌ GẬY VÀ MUỖI *ANOPHELES*

MỤC TIÊU

*** Kỹ năng:**

1. Thực hiện được quy trình làm tiêu bản bọ gậy *Anopheles.*

2. Thực hiện được quy trình làm tiêu bản muỗi *Anopheles.*

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm:**

3. Thận trọng, tỉ mỉ, chính xác, thực hiện đúng các quy định về an toàn phòng xét nghiệm trong khi tiến hành kỹ thuật xét nghiệm.

4. Thể hiện khả năng làm việc độc lập và làm việc nhóm, tổng hợp, đánh giá kết quả công việc của các thành viên trong nhóm để hoàn thành các chỉ tiêu được giao.

NỘI DUNG

1. Chuẩn bị

1.1. Chuẩn bị nhân viên y tế

- Trang phục gọn gàng đúng quy định
- Đội mũ, đeo khẩu trang
- SV chuẩn bị bài trước khi lên lớp

1.2. Chuẩn bị phòng thực hành

- Phòng thực tập ký sinh trùng
- Đầy đủ máy móc trang thiết bị

1.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Mẫu muỗi và bọ gậy

1.4. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Kính hiển vi có vật kính X10, X4, kính lúp
- Lam kính, lamen, giá lam, bút kính, pipet, kim thủy tinh, tuýp thủy tinh làm tiêu bản muỗi, nút lie, bông không thấm nước
- Dung dich gắn tiêu bản, băng phiến bột

2. Tiến hành

- Quy trình làm tiêu bản bọ gậy *Anopheles*

QUY TRÌNH KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN BỌ GẬY *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành
1	Chuẩn bị nhân viên y tế
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm

3	Chuẩn bị lam kính
4	Dùng pipet nhỏ giọt hút bọ gậy đặt lên lam
5	Chỉnh sửa tư thế bọ gậy trên tiêu bản dưới kính hiển vi vật kính X4
6	Thấm hút hết nước thừa quanh bọ gậy
7	Nhỏ 1 giọt keo gắn lên bọ gậy
8	Đặt lamen lên bọ gậy
9	Phơi khô tiêu bản
10	Bảo quản tiêu bản
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
12	Rửa tay
13	Ghi kết quả vào sổ lưu

- Quy trình làm tiêu bản muỗi *Anopheles*

QUY TRÌNH KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN MUỖI *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành
1	Chuẩn bị nhân viên y tế
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm
3	Chuẩn bị ống nghiệm làm tiêu bản
4	Gây mê muỗi bằng ete
5	Cắm kim thủy tinh vào ngực muỗi
6	Chỉnh sửa tư thế muỗi trên tiêu bản dưới kính lúp
7	Cắm tim thủy tinh lên nút lie
8	Đưa tiêu bản muỗi vào tuýp thủy tinh
9	Nhúng phần nút lie vào paraphin đã được làm nóng chảy
10	Bảo quản tiêu bản
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
12	Rửa tay
13	Ghi kết quả vào sổ lưu

3. Các bước cần lưu ý

- Làm tiêu bản bọ gậy: thấm hút nước thừa từ từ xung quanh bọ gậy không làm xô lệch hay đứt gãy các bộ phận định danh

- Làm tiêu bản muỗi: cắm kim thẳng đứng vào ngực giữa ở muỗi, chân cánh muỗi duỗi tự nhiên, không làm đứt gãy bộ phận định danh

4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại phòng thực hành.
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm.
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật.

Lượng giá

- Theo mục tiêu bằng thang điểm

Các phụ lục

- Quy trình kỹ thuật

QUY TRÌNH KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN BỌ GẬY *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc - Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn - Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng đúng kỹ thuật
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm	Thuận tiện cho quá trình thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Đầy đủ dụng cụ: lam kính, bút kính, pipet nhỏ giọt, đĩa petri, kim có đầu nhọn, kính hiển vi, giấy thấm - Hóa chất đảm bảo chất lượng: gôm gắn tiêu bản + Còn hạn sử dụng + Có nắp đậy kín + Để ở nhiệt độ phòng (25^0C) - Bọ gậy muỗi *Anopheles* đã xử lý trong nước nóng 50-60^0
Tiến hành			
3	Chuẩn bị lam kính	- Chuẩn bị lam làm kỹ thuật.	- Lam kính khô sạch, không xước

4	Dùng pipet nhỏ giọt hút bọ gậy đặt lên lam	- Lấy mẫu bọ gậy thực hiện kỹ thuật làm tiêu bản	- Giọt dung dịch nằm chính giữa lam kính, không có bọt khí
5	Chỉnh sửa tư thế bọ gậy trên tiêu bản dưới kính hiển vi vật kính X4	- Chỉnh sửa tư thế bộ gậy ngay ngắn đúng chiều, các bộ phận định danh được bộc lộ rõ ràng	- Chỉnh sửa tư thế bọ gậy bằng kim nhọn - Bộ gậy nằm úp lưng trên lam kính - Các bộ phận định danh được bộ lộc rõ ràng không đứt gẫy hoặc bị che phủ
6	Thấm hút hết nước thừa quanh bọ gậy	- Loại bỏ hết nước quanh bọ gậy, không làm loãng keo gắn	- Nước quanh bộ gậy được thấm hút hết - Các bộ phận định danh nằm ngay ngắn, không bị đứt gãy hay bị che lấp
7	Nhỏ 1 giọt keo gắn lên bọ gậy	- Làm tiêu bản bọ gậy	- Keo gắn phủ đều trên bọ gậy, không có bọt khí
8	Đặt lamen lên bọ gậy	- Dàn mỏng và đều keo gắn quanh bọ gậy	- Lamen nằm ngay ngắn, cân đối chính giữa lam kính - Dung dịch trong lamen tràn đều, không có bọt khí, không tràn ra khỏi lamen
9	Phơi khô tiêu bản	- Hoàn thiện tiêu bản bảo quản và lưu trữ bọ gậy	- Tiêu bản được xếp lên giá, khay thẳng hàng, giữa các tiêu bản phải có khoảng cách - Phơi đến khi phần gôm gắn khô hoàn toàn
10	Bảo quản tiêu bản	- Lưu giữ tiêu bản được lâu dài phục vụ công tác học tập và nghiên cứu	- Tiêu bản được xếp vào hộp/giá tiêu bản có nhãn phân loại - Bảo quản ở nhiệt độ 22-25^{0}C, ở nơi khô thoáng tránh

			ánh sáng trực tiếp, bụi bẩn.
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	- Dụng cụ, hóa chất được bảo quản đúng quy định, đảm bảo chất lượng cho lần xét nghệm tiếp theo - Đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế và cho cộng đồng	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí với điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng phù hợp - Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng - Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định: + Bệnh phẩm để vào nơi quy định + Lam kính, găng ta bỏ vào thùng rác thải y tế
12	Rửa tay	Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng
13	Ghi kết quả vào sổ lưu	Lưu trữ, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác theo quy định: + Địa điểm thu thập + Loài bọ gậy + Ngày làm tiêu bản + Số lượng tiêu bản

QUY TRÌNH KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN MUỖI *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc - Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn - Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng đúng kỹ thuật
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất,	Thuận tiện cho quá trình thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Đầy đủ dụng cụ: kim có đầu nhọn, kính hiển vi, kim thủy

	bệnh phẩm		tinh, túp làm tiêu bản, bông… - Hóa chất đảm bảo chất lượng: băng phiến, paraphin, ete + Còn hạn sử dụng + Có nắp đậy kín + Để ở nhiệt độ phòng (25^0C) - Muỗi *Anopheles* đã thu thập
Tiến hành			
3	Chuẩn bị ống nghiệm làm tiêu bản	- Chuẩn bị tuýp làm kỹ thuật lưu trữ muỗi	- Ống nghiệm khô sạch - Đáy ống ngiệm có nhồi bông cuốn băng phiến, độ dày 1,5-2 cm
4	Gây mê muỗi bằng ete	- Làm muỗi bất động dễ làm tiêu bản	- Muỗi được gây mê bất động hoàn toàn
5	Cắm kim thủy tinh vào ngực muỗi	- Làm tiêu bản muỗi	- Kim được cắm vào chính giữa ngực muỗi, chắc chắn - Chân, cánh muỗi xòe rõ, không bị che khuất, không bị gãy rụng
6	Chỉnh sửa tư thế muỗi trên tiêu bản dưới kính lúp	- Chỉnh sửa tư thế muỗi ngay ngắn đúng chiều, các bộ phận định danh được bộc lộ rõ ràng	- Chỉnh sửa tư thế muỗi bằng kim nhọn - Các bộ phận định danh được bộ lộc rõ ràng không đứt gẫy hoặc bị che phủ
7	Cắm tim thủy tinh lên nút lie	- Gắn tiêu bản muỗi cố định trước khi đưa vào tuýp	- Kim thủy tinh đứng thẳng cân đối giữa nút lie
8	Đưa tiêu bản muỗi vào tuýp thủy tinh	- Làm tiêu bản lưu trữ, bảo quản muỗi	- Tiêu bản muỗi nằm chính giữa tuýp thủy tinh, vị trí ½ ống nghiệm không chạm vào bông ở đáy ống nghiệm - Tiêu bản muỗi không chmaj

			thành ống nghiệm
9	Nhúng phần nút lie vào paraphin đã được làm nóng chảy	- Hoàn thiện tiêu bản bảo quản và lưu trữ muỗi - Tránh ẩm mốc làm hỏng tiêu bản	- Paraphin sau khi khô bám đều trên bề mặt nút lie, một phần bao trùm lên ống ngiệm thủy tinh, kín đều, không nứt vỡ
10	Bảo quản tiêu bản	- Lưu giữ tiêu bản được lâu dài phục vụ công tác học tập và nghiên cứu	- Tiêu bản được xếp vào hộp/giá tiêu bản có nhãn phân loại - Bảo quản ở nhiệt độ 22-25^{0}C, ở nơi khô thoáng tránh ánh sáng trực tiếp, bụi bẩn.
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	- Dụng cụ, hóa chất được bảo quản đúng quy định, đảm bảo chất lượng cho lần xét nghệm tiếp theo - Đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế và cho cộng đồng	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí với điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng phù hợp - Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng - Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định: + Bệnh phẩm để vào nơi quy định + Lam kính, găng ta bỏ vào thùng rác thải y tế
12	Rửa tay	Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng
13	Ghi kết quả vào sổ lưu	Lưu trữ, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác theo quy định: + Địa điểm thu thập + Loài muỗi + Ngày làm tiêu bản + Số lượng tiêu bản

- Bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN BỌ GẬY *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Đạt	Không đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế		
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm		
Tiến hành			
3	Chuẩn bị lam kính		
4	Dùng pipet nhỏ giọt hút bọ gậy đặt lên lam		
5	Chỉnh sửa tư thế bọ gậy trên tiêu bản dưới kính hiển vi vật kính X4		
6	Thấm hút hết nước thừa quanh bọ gậy		
7	Nhỏ 1 giọt keo gắn lên bọ gậy		
8	Đặt lamen lên bọ gậy		
9	Phơi khô tiêu bản		
10	Bảo quản tiêu bản		
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
12	Rửa tay		
13	Ghi kết quả vào sổ lưu		

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN MUỖI *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Đạt	Không đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế		
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm		
Tiến hành			
3	Chuẩn bị ống nghiệm làm tiêu bản		
4	Gây mê muỗi bằng ete		
5	Cắm kim thủy tinh vào ngực muỗi		
6	Chỉnh sửa tư thế muỗi trên tiêu bản dưới kính lúp		
7	Cắm tim thủy tinh lên nút lie		
8	Đưa tiêu bản muỗi vào tuýp thủy tinh		
9	Nhúng phần nút lie vào paraphin đã được làm nóng chảy		

10	Bảo quản tiêu bản		
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
12	Rửa tay		
13	Ghi kết quả vào sổ lưu		

- Thang điểm

THANG ĐIỂM KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN BỌ GẬY *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
Chuẩn bị					
1	Chuẩn bị nhân viên y tế				
2	Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
Tiến hành					
3	Chuẩn bị lam kính				
4	Dùng pipet nhỏ giọt hút bọ gậy đặt lên lam				
5	Chỉnh sửa tư thế bọ gậy trên tiêu bản dưới kính hiển vi vật kính X4				
6	Thấm hút hết nước thừa quanh bọ gậy				
7	Nhỏ 1 giọt keo gắn lên bọ gậy				
8	Đặt lamen lên bọ gậy				
9	Phơi khô tiêu bản				
10	Bảo quản tiêu bản				
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
12	Rửa tay				
13	Ghi kết quả vào sổ lưu				
	Tổng				

Tổng điểm: 26

THANG ĐIỂM KỸ THUẬT LÀM TIÊU BẢN MUỖI *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
Chuẩn bị					
1	Chuẩn bị nhân viên y tế				
2	Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				

Tiến hành					
3	Chuẩn bị ống nghiệm làm tiêu bản				
4	Gây mê muỗi bằng ete				
5	Cắm kim thủy tinh vào ngực muỗi				
6	Chỉnh sửa tư thế muỗi trên tiêu bản dưới kính lúp				
7	Cắm tim thủy tinh lên nút lie				
8	Đưa tiêu bản muỗi vào tuýp thủy tinh				
9	Nhúng phần nút lie vào paraphin đã được làm nóng chảy				
10	Bảo quản tiêu bản				
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
12	Rửa tay				
13	Ghi kết quả vào sổ lưu				
	Tổng				

Tổng điểm: 26

- Chỉ tiêu thực hành

STT	**Chỉ tiêu**	**Yêu cầu đạt**	**Kết quả thực hiện**	**Xác nhận của người đánh giá**
1	Số lần quan sát GV/SV khác thực hiện kỹ thuật	**3**		
2	Số lần thực hiện có hướng dẫn của GV	**1**		
3	Số lần tự làm	**1**		

BÀI 6: KỸ THUẬT ĐỊNH DANH BỌ GẬY VÀ MUỖI *ANOPHELES*

MỤC TIÊU

*** Kỹ năng:**

1. Định danh được bọ gậy *Anopheles.*

2. Định danh được muỗi *Anopheles.*

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm:**

3. Thận trọng, tỉ mỉ, chính xác, thực hiện đúng các quy định về an toàn phòng xét nghiệm trong khi tiến hành kỹ thuật xét nghiệm.

4. Thể hiện khả năng làm việc độc lập và làm việc nhóm, tổng hợp, đánh giá kết quả công việc của các thành viên trong nhóm để hoàn thành các chỉ tiêu được giao.

NỘI DUNG

1. Chuẩn bị

1.1. Chuẩn bị nhân viên y tế

- Trang phục gọn gàng đúng quy định
- Đội mũ, đeo khẩu trang
- SV chuẩn bị bài trước khi lên lớp

1.2. Chuẩn bị phòng thực hành

- Phòng thực tập ký sinh trùng
- Đầy đủ máy móc trang thiết bị

1.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Mẫu muỗi và bọ gậy

1.4. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Kính hiển vi có vật kính X10, X4, kính lúp

2. Tiến hành

- Quy trình định danh muỗi *Anopheles*

QUY TRÌNH ĐỊNH DANH MUỖI *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành
1	Chuẩn bị nhân viên y tế
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm
3	Quan sát tiêu bản muỗi bằng kính lúp
4	Định danh muỗi
4	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải

5	Rửa tay
6	Ghi kết quả vào sổ lưu

- Quy trình định danh bọ gậy *Anopheles*

QUY TRÌNH ĐỊNH DANH BỌ GẬY *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành
1	Chuẩn bị nhân viên y tế
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm
3	Quan sát tiêu bản bọ gậy bằng kính hiển vi
4	Định danh bọ gậy
4	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
5	Rửa tay
6	Ghi kết quả vào sổ lưu

3. Các bước cần lưu ý

+ Xác định đúng các bộ phận cơ thể của muỗi và bọ gậy

+ Xác định đúng các đặc điểm định danh muỗi và bộ gậy

4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại phòng thực hành.
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm.
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật.

Lượng giá

- Theo mục tiêu bằng thang điểm

Các phụ lục

- Quy trình kỹ thuật

QUY TRÌNH ĐỊNH DANH MUỖI *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc - Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn - Đội mũ, đeo khẩu trang, đi

			găng đúng kỹ thuật
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm	Thuận tiện cho quá trình thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Tiêu bản muỗi *Anopheles* - Bảng định danh muỗi *Anopheles,* giấy bút, kính lúp
Tiến hành			
3	Quan sát tiêu bản muỗi bằng kính lúp	- Định danh muỗi	- Nơi quan sát đủ ánh sáng - Quan sát đúng và đủ các đặc điểm định danh muỗi
4	Định danh muỗi	- Định danh muỗi	- Các đặc điểm định danh được đối chiếu đúng với bảng đinh danh - Định danh đúng loài muỗi trên tiêu bản.
4	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	- Dụng cụ, hóa chất được bảo quản đúng quy định, đảm bảo chất lượng cho lần xét nghệm tiếp theo - Đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế và cho cộng đồng	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí với điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng phù hợp - Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng - Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định: + Bệnh phẩm để vào nơi quy định + Lam kính, găng ta bỏ vào thùng rác thải y tế
5	Rửa tay	Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng
6	Ghi kết quả vào sổ lưu	Lưu trữ, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác theo quy định: + Địa điểm thu thập + Loài muỗi + Ngày làm tiêu bản

			+ Số lượng tiêu bản

QUY TRÌNH ĐỊNH DANH BỌ GẬY *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc - Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn - Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng đúng kỹ thuật
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm	Thuận tiện cho quá trình thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Tiêu bản bọ gậy *Anopheles* - Bảng định danh bọ gậyi *Anopheles,* giấy bút, kính hiển vi
Tiến hành			
3	Quan sát tiêu bản bọ gậy bằng kính hiển vi	- Định danh bọ gậy	- Quan sát bọ gậy dưới kính hiển vi vật kinh 4x và 10x - Quan sát đúng và đủ các đặc điểm định bọ gậy
4	Định danh bọ gậy	- Định danh bọ gậy	- Các đặc điểm định danh được đối chiếu đúng với bảng định danh - Định danh đúng loài bọ gậy trên tiêu bản.
4	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	- Dụng cụ, hóa chất được bảo quản đúng quy định, đảm bảo chất lượng cho lần xét nghệm tiếp theo - Đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế và cho cộng đồng	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí với điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng phù hợp - Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng - Thu gom và phân loại rác

			thải đúng quy định: + Bệnh phẩm để vào nơi quy định + Lam kính, găng ta bỏ vào thùng rác thải y tế
5	Rửa tay	Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng
6	Ghi kết quả vào sổ lưu	Lưu trữ, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác theo quy định: + Địa điểm thu thập + Loài bọ gậy + Ngày làm tiêu bản + Số lượng tiêu bản

- Bảng kiểm

BẢNG KIỂM ĐỊNH DANH MUỖI *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Đạt	Không đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế		
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm		
Tiến hành			
3	Quan sát tiêu bản muỗi bằng kính lúp		
4	Định danh muỗi		
4	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
5	Rửa tay		
6	Ghi kết quả vào sổ lưu		

BẢNG KIỂM ĐỊNH DANH BỌ GẬY *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Đạt	Không đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế		
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm		
Tiến hành			
3	Quan sát tiêu bản bọ gậy bằng kính hiển vi		

4	Định danh bọ gậy		
4	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
5	Rửa tay		
6	Ghi kết quả vào sổ lưu		

- Thang điểm

THANG ĐIỂM ĐỊNH DANH MUỖI *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
Chuẩn bị					
1	Chuẩn bị nhân viên y tế				
2	Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
Tiến hành					
3	Quan sát tiêu bản muỗi bằng lúp				2
4	Định danh bọ gậy				4
5	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
6	Rửa tay				
	Tổng				

Tổng điểm: 20

THANG ĐIỂM ĐỊNH DANH BỌ GẬY *ANOPHELES*

TT	Các bước tiến hành	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
Chuẩn bị					
1	Chuẩn bị nhân viên y tế				
2	Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
Tiến hành					
3	Quan sát tiêu bản bọ gậy bằng kính hiển vi				2
4	Định danh bọ gậy				4
5	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
6	Rửa tay				
	Tổng				

Tổng điểm: 20

- Chỉ tiêu thực hành

STT	Chỉ tiêu	Yêu cầu đạt	Kết quả thực hiện	Xác nhận của người đánh giá
1	Số lần quan sát GV/SV khác thực hiện kỹ thuật	**3**		
2	Số lần thực hiện có hướng dẫn của GV	**1**		
3	Số lần tự làm	**5**		

BÀI 7. KỸ THUẬT ĐÁNH GIÁ MẬT ĐỘ KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT

MỤC TIÊU

*** Kỹ năng:**

1. Xác định được mật độ ký sinh trùng sốt rét bằng phương pháp dấu (+) trên tiêu bản mẫu.

2. Xác định được mật độ ký sinh trùng sốt rét trong 1mm^3 máu trên tiêu bản mẫu.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm:**

3. Nghiêm túc, cẩn thận, chính xác trong khi tiến hành kỹ thuật, đảm bảo các quy định về an toàn phòng xét nghiệm.

4. Chứng minh được năng lực làm việc độc lập và phối hợp nhóm để giải quyết các vấn đề học tập.

NỘI DUNG

1. Chuẩn bị

1.1. Chuẩn bị nhân viên y tế

- Trang phục gọn gàng đúng quy định
- Đội mũ, đeo khẩu trang
- SV chuẩn bị bài trước khi lên lớp

1.2. Chuẩn bị phòng thực hành

- Phòng thực tập ký sinh trùng
- Đầy đủ máy móc trang thiết bị

1.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Tiêu bản máu chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét

1.4. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Kính hiển vi có vật kính vật kính dầu
- 2 máy đếm
- Dầu soi kính, cồn tuyệt đối, giấy thấm dầu

2. Tiến hành

- Đánh giá mật độ ký sinh trùng sốt rét bằng phương pháp dấu (+)

QUY TRÌNH ĐÁNH GIÁ MẬT ĐỘ KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT THEO DẤU CỘNG

TT	Các bước tiến hành
1	Chuẩn bị nhân viên y tế
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm

3	Quan sát tiêu bản giọt máu đặc dưới kính hiển vi
4	Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản máu đặc
5	Xác định mật độ ký sinh trùng SR
6	Trả lời kết quả
7	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
8	Rửa tay

- Xác định số lượng ký sinh trùng sốt rét trong 1µL máu

QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT TRONG 1 MICROLIT MÁU

TT	Các bước tiến hành
1	Chuẩn bị nhân viên y tế
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm
3	Quan sát tiêu bản giọt máu đặc dưới kính hiển vi
4	Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản máu đặc
5	Xác định số lượng ký sinh trùng SR
6	Trả lời kết quả
7	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
8	Rửa tay

3. Các bước cần lưu ý

Đếm tất cả ký sinh trùng sốt rét và bạch cầu trong vi trường cuối cùng cả trong trường hợp đã vượt qua số lượng KST và BC cần thiết

4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại phòng thực hành.
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm.
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật.

Lượng giá

- Theo mục tiêu bằng thang điểm

Các phụ lục

- Quy trình kỹ thuật

QUY TRÌNH ĐÁNH GIÁ MẬT ĐỘ KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT THEO DẤU CỘNG

TT	Các bước tiến hành	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc - Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn - Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng đúng kỹ thuật
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm	Thuận tiện cho quá trình thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Đầy đủ dụng cụ: kính hiển vi vật kính dầu, 2 máy đếm, giấy thấm - Hóa chất đảm bảo chất lượng: dầu soi kính, cồn tuyệt đối. + Còn hạn sử dụng + Có nắp đậy kín + Để ở nhiệt độ phòng (25^0C) - Tiêu bản giọt máu đặc chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét
Tiến hành			
3	Quan sát tiêu bản giọt máu đặc dưới kính hiển vi	- Tìm ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản - Lựa chọn vùng đếm ký sinh trùng sốt rét	- Vùng đếm sạch, ít/không có cặn - Bạch cầu rải đều, ký sinh trùng bắt màu rõ
4	Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản máu đặc	- Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét	- KST SR được đếm toàn bộ trên 100 vi trường - Đếm 2-3 lần lấy giá trị trung bình
5	Xác định mật độ	- Xách định mật độ ký sinh	- Mật độ KST SR trên tiêu

	ký sinh trùng SR	trùng SR trên tiêu bản giọt đặc	bản: +: 1-10 KST/100 vi trường ++: 11-100 KST/100 vi trường +++: 1-10 KST/1 vi trường ++++: trên 10 KST/1 vi trường
6	Trả lời kết quả	Trả lời kết quả xét nghiệm xác định mật độ KST SR	- Kết quả xác định mật độ ký sinh trùng: + Loài + Thể + Mật độ theo dấu cộng
7	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	- Dụng cụ, hóa chất được bảo quản đúng quy định, đảm bảo chất lượng cho lần xét nghệm tiếp theo - Đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế và cho cộng đồng	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí với điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng phù hợp - Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng - Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định: + Bệnh phẩm để vào nơi quy định + Lam kính, găng ta bỏ vào thùng rác thải y tế
8	Rửa tay	Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng

QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT TRONG 1 MICROLIT MÁU

TT	Các bước tiến hành	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc - Đảm bảo an toàn cho	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt

		người làm xét nghiệm	ngắn - Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng đúng kỹ thuật
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm	Thuận tiện cho quá trình thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Đầy đủ dụng cụ: kính hiển vi vật kính dầu, 2 máy đếm, giấy thấm - Hóa chất đảm bảo chất lượng: dầu soi kính, cồn tuyệt đối. + Còn hạn sử dụng + Có nắp đậy kín + Để ở nhiệt độ phòng (25^0C) - Tiêu bản giọt máu đặc chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét
Tiến hành			
3	Quan sát tiêu bản giọt máu đặc dưới kính hiển vi	- Tìm ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản - Lựa chọn vùng đếm ký sinh trùng sốt rét	- Vùng đếm sạch, ít/không có cặn - Bạch cầu rải đều, ký sinh trùng bắt màu rõ
4	Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản máu đặc	- Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét	- KST SR được đếm toàn bộ trên vi trường: + Nếu đếm thấy số lượng KSTSR ≥ 100 thì đếm đến 200 BC, dừng đếm và ghi kết quả số lượng KSTSR/200 BC; + Nếu đếm thấy số lượng KSTSR ≤ 99 thì đếm đến 500 BC, dừng đếm và ghi kết quả số lượng KSTSR/500 BC; + Trường hợp được xác định là âm tính (-) khi đếm 0/1000 BC;

			+ Đếm tất cả KSTSR và BC ở vi trường cuối cùng, ngay cả khi số lượng BC vượt quá 200, 500 hoặc 1000; - Đếm 2-3 lần lấy giá trị trung bình
5	Xác định số lượng ký sinh trùng SR	- Xách định số lượng ký sinh trùng SR/1µL	- Số lượng KST SR được tính toán theo công thức
6	Trả lời kết quả	Trả lời kết quả xét nghiệm xác định mật độ KST SR	- Kết quả xác định số lượng ký sinh trùng: + Loài + Số lượng/1µL
7	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	- Dụng cụ, hóa chất được bảo quản đúng quy định, đảm bảo chất lượng cho lần xét nghệm tiếp theo - Đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế và cho cộng đồng	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí với điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng phù hợp - Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng - Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định: + Bệnh phẩm để vào nơi quy định + Lam kính, găng ta bỏ vào thùng rác thải y tế
8	Rửa tay	Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng

- Bảng kiểm

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT ĐÁNH GIÁ MẬT ĐỘ KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT THEO DẤU CỘNG

TT	Các bước tiến hành	Đạt	Không đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế		

2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm		
Tiến hành			
3	Quan sát tiêu bản giọt máu đặc dưới kính hiển vi		
4	Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản máu đặc		
5	Xác định mật độ ký sinh trùng SR		
6	Trả lời kết quả		
7	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
8	Rửa tay		

BẢNG KIỂM KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT TRONG 1 MICROLIT MÁU

TT	Các bước tiến hành	Đạt	Không đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế		
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm		
Tiến hành			
3	Quan sát tiêu bản giọt máu đặc dưới kính hiển vi		
4	Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản máu đặc		
5	Xác định số lượng ký sinh trùng SR		
6	Trả lời kết quả		
7	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
8	Rửa tay		

- Thang điểm

THANG ĐIỂM KỸ THUẬT ĐÁNH GIÁ MẬT ĐỘ KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT THEO DẤU CỘNG

TT	Các bước tiến hành	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
Chuẩn bị					
1	Chuẩn bị nhân viên y tế				
2	Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
Tiến hành					
3	Quan sát tiêu bản giọt máu đặc dưới kính hiển vi				2

4	Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản máu đặc				4
5	Xác định mật độ ký sinh trùng SR				2
6	Trả lời kết quả				
7	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
8	Rửa tay				
	Tổng				

Tổng điểm: 26

THANG ĐIỂM KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH SỐ LƯỢNG KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT TRONG 1 MICROLIT MÁU

TT	**Các bước tiến hành**	**Thang điểm**			**Hệ số**
		0	**1**	**2**	
Chuẩn bị					
1	Chuẩn bị nhân viên y tế				
2	Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
Tiến hành					
3	Quan sát tiêu bản giọt máu đặc dưới kính hiển vi				2
4	Đếm số lượng ký sinh trùng sốt rét trên tiêu bản máu đặc				4
5	Xác định số lượng ký sinh trùng SR				2
6	Trả lời kết quả				
7	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
8	Rửa tay				
	Tổng				

Tổng điểm: 26

- Chỉ tiêu thực hành

STT	**Chỉ tiêu**	**Yêu cầu đạt**	**Kết quả thực hiện**	**Xác nhận của người đánh giá**
1	Số lần quan sát GV/SV khác thực hiện kỹ thuật	**3**		
2	Số lần thực hiện có hướng dẫn của GV	**1**		
3	Số lần tự làm	**2**		

BÀI 8. KỸ THUẬT NUÔI CẤY CHẨN ĐOÁN VI NẤM

MỤC TIÊU

*** Kỹ năng:**

1. Thực hiện được quy trình và nhận định được kết quả của một số kỹ thuật nuôi cấy chẩn đoán vi nấm.

*** Năng lực tự chủ và trách nhiệm:**

2. Nghiêm túc, cẩn thận, chính xác trong khi tiến hành kỹ thuật, đảm bảo các quy định về an toàn phòng xét nghiệm.

3. Chứng minh được năng lực làm việc độc lập và phối hợp nhóm để giải quyết các vấn đề học tập.

NỘI DUNG

1. Chuẩn bị

1.1. Chuẩn bị nhân viên y tế

- Trang phục gọn gàng đúng quy định
- Đội mũ, đeo khẩu trang
- SV chuẩn bị bài trước khi lên lớp

1.2. Chuẩn bị phòng thực hành

- Phòng thực tập ký sinh trùng
- Đầy đủ máy móc trang thiết bị

1.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Mẫu bệnh phẩm nấm

1.4. Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất

- Tủ an toàn sinh học cấp 2, đèn cồn, que cấy/kim cấy nấm, lam kính, lamen, đĩa petri…
- Hóa chất: thạch Sabouraud/ thạch khoai đường, thạch bột bắp, thuốc nhuộm xanh Lacto-phenol…

2. Tiến hành

- Quy trình kỹ thuật cấy nấm trên kính

QUY TRÌNH KỸ THUẬT CẤY NẤM TRÊN KÍNH

TT	Các bước tiến hành
1	Chuẩn bị nhân viên y tế
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm

3	Đặt lam kính lên que thủy tinh chữ U hoặc V đặt trong đãi petri, đã được hấp vô trùng
4	Cắt thạch Sabouraud thành khối 1x1mm, đặt lên lam kính trong đĩa petri
5	Cấy nấm ở điểm giữa mỗi cạnh của khối thạch Sabouraud
6	Hơ nóng nhẹ lamen đặt lên trên khối thạch
7	Cho vào trong đĩa petri 1-3ml nước cất vô khuẩn
8	Đậy nắp đĩa petri , ủ ở nhiệt độ phòng 22-25^{0}C
9	Theo dõi lứa cấy
10	Khi thấy nấm mọc, gỡ lamen đặt lên lam kính có sẵn 1 giọt LPCB (tiêu bản 1)
11	Loại bỏ khối thạch trên lam cấy, giữ lại lam cấy
12	Nhỏ 1 giọt LPCB lên vị trí khối thạch trên lam cấy, đậy lamen (tiêu bản 2)
13	Khảo sát 2 tiêu bản dưới kính hiển vi
14	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
15	Rửa tay
16	Ghi kết quả vào sổ lưu

- Quy trình kỹ thuật cấy nấm Dalmau

QUY TRÌNH KỸ THUẬT CẤY NẤM DALMAU

TT	Các bước tiến hành
1	Chuẩn bị nhân viên y tế
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm
3	Chuẩn bị đĩa môi trường cấy nấm
4	Hòa tan mẫu nấm cần cấy trong nước muối sinh lý vô khuẩn
5	Dùng que cấy lấy huyền dịch nấm vạch sâu vào thạch 2 đường song song
6	Khử trùng que cấy, để nguội, vạch những đường chữ Z trên 2 đường cấy
7	Hơ nóng nhẹ lamen đặt lên 2 đường cấy
8	Đậy nắp đĩa petri , ủ ở nhiệt độ phòng 22-25^{0}C, trong 3-5 ngày
9	Khi thấy nấm mọc, gỡ lamen đặt lên lam kính có sẵn 1 giọt LPCB (tiêu bản 1)
10	Khảo sát 2 tiêu bản dưới kính hiển vi
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải
12	Rửa tay
13	Ghi kết quả vào sổ lưu

3. Các bước cần lưu ý

Không nên cấy trên kính các loại nấm nguy hiểm, ví dụ: *Histoplasma cpsulatum*

4. Tổ chức thực hiện

- Dạy học trực tiếp tại phòng thực hành.
- Giảng viên hướng dẫn thực hành dựa trên quy trình kỹ thuật và bảng kiểm.
- Sinh viên thực hành theo nhóm, lần lượt thực hiện quy trình kỹ thuật.

Lượng giá

- Theo mục tiêu bằng thang điểm

Các phụ lục

- Quy trình kỹ thuật

QUY TRÌNH KỸ THUẬT CẤY NẤM TRÊN KÍNH

TT	Các bước tiến hành	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc - Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn - Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng đúng kỹ thuật
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm	Thuận tiện cho quá trình thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Đầy đủ dụng cụ: kính hiển vi, hộp petri, que cấy nấm, lá kính, lamen, que thủy tinh chữ U hoặc V… - Hóa chất đảm bảo chất lượng: Thạch Sabouraud hoặc thạch khoai đường, thuốc nhuộm xanh lacto-phenol… + Còn hạn sử dụng + Có nắp đậy kín + Để ở nhiệt độ phòng (25^0C)

			- Mẫu nấm cần cấy
Tiến hành			
3	Đặt lam kính lên que thủy tinh chữ U hoặc V đặt trong đãi petri, đã được hấp vô trùng	- Chuẩn bị đĩa petri cấy nấm	- Ghi thông tin mẫu nấm cần cấy đầy đủ trên đĩa cấy nấm - Lam kính, que thủy tinh trong đĩa petri đã được hấp sấy vô khuẩn - Lam kính nằm cân đối trên que thủy tinh
4	Cắt thạch Sabouraud thành khối 1x1mm, đặt lên lam kính trong đĩa petri	- Chuẩn bị môi trường nuôi cấy nấm	- Khối thạch vuông đều, kích thước 1x1mm - Khối thạch đặt chính giữa lam kính trong đĩa petri
5	Cấy nấm ở điểm giữa mỗi cạnh của khối thạch Sabouraud	- Cấy nấm trên thạch	- Nấm được cấy ở chính giữa mỗi cạnh của khối thạch, không làm vỡ thạch - Đảm bảo các kỹ thuật vô trùng
6	Hơ nóng nhẹ lamen đặt lên trên khối thạch	- Tạo môi trường cho nấm dễ dàng phát triển	- Lamen được đặt che phủ hoàn toàn bề mặt khối thạch - Đảm bảo kỹ thuật vô trùng
7	Cho vào trong đĩa petri 1-3ml nước cất vô khuẩn	- Tạo môi trường cho nấm dễ dàng phát triển	- Mực nước phủ kín đáy hộp petri, không chạm đến lam kính - Đảm bảo kỹ thuật vô trùng
8	Đậy nắp đĩa petri , ủ ở nhiệt độ phòng 22-	- Tạo môi trường cho nấm dễ dàng phát triển	- Đĩa cấy nấm được đặt trên mặt phẳng, nắp đĩa

	25^0C		đậy kín đĩa thạch
9	Theo dõi lứa cấy	- Quan sát theo dõi sự phát triển của nấm	- Đĩa cấy được theo dõi hàng ngày
10	Khi thấy nấm mọc, gỡ lamen đặt lên lam kính có sẵn 1 giọt LPCB (tiêu bản 1)	- Làm tiêu bản soi tươi nấm với LPCB	- Gỡ và đặt nhẹ nhàng lamen lên lam kính - Dung dịch LPCB tràn đều trong lamen cấy nấm, không có bọt
11	Loại bỏ khối thạch trên lam cấy, giữ lại lam cấy	- Làm tiêu bản thứ 2 để soi phát hiện nấm	- Khối thạch được bỏ vào dung dịch sát khuẩn - Nấm không bị rơi vãi ra xung quanh
12	Nhỏ 1 giọt LPCB lên vị trí khối thạch trên lam cấy, đậy lamen (tiêu bản 2)	- Làm tiêu bản thứ 2 để soi phát hiện nấm	- Dung dịch LPCB tràn đều trong lamen cấy nấm, không có bọt
13	Khảo sát 2 tiêu bản dưới kính hiển vi	Phát hiện sợi tơ nấm và bào tử nếu có trong tiêu bản	- Phát hiện đúng các loại nấm có trong tiêu bản: + Nấm hoại sinh mọc: 3-7 ngày + Nấm gây bệnh mọc: 2-3 tuần
14	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	- Dụng cụ, hóa chất được bảo quản đúng quy định, đảm bảo chất lượng cho lần xét nghệm tiếp theo - Đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế và cho cộng đồng	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí với điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng phù hợp - Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng - Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định: + Bệnh phẩm để vào nơi

			quy định + Lam kính, găng ta bỏ vào thùng rác thải y tế
15	Rửa tay	Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng
16	Ghi kết quả vào sổ lưu	Lưu trữ, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác theo quy định: + Nấm gây bệnh/nấm hoại sinh + Ngày xét nghiệm

QUY TRÌNH KỸ THUẬT CẤY NẤM DALMAU

TT	Các bước tiến hành	Ý nghĩa	Tiêu chuẩn phải đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế	- Thể hiện sự nghiêm túc khi làm việc - Đảm bảo an toàn cho người làm xét nghiệm	- Trang phục đúng quy định, gọn gàng - Tóc gọn gàng, móng tay cắt ngắn - Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng đúng kỹ thuật
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm	Thuận tiện cho quá trình thực hiện kỹ thuật xét nghiệm	- Đầy đủ dụng cụ: kính hiển vi, hộp petri, que cấy nấm, lá kính, lamen - Hóa chất đảm bảo chất lượng: Thạch bột bắp, nước muối sinh lý vô khuẩn.. + Còn hạn sử dụng + Có nắp đậy kín + Để ở nhiệt độ phòng (25^0C) - Mẫu nấm cần cấy

Tiến hành			
3	Chuẩn bị đĩa môi trường cấy nấm	- Chuẩn bị đĩa petri cấy nấm	- Ghi thông tin mẫu nấm cần cấy đầy đủ trên đĩa cấy nấm
4	Hòa tan mẫu nấm cần cấy trong nước muối sinh lý vô khuẩn	- Chuẩn bị môi trường nuôi cấy nấm	Nấm tan đều trong nước muối sinh lý
5	Dùng que cấy lấy huyền dịch nấm vạch sâu vào thạch 2 đường song song	- Cấy nấm trên thạch	- Thạch không bị vỡ, đường vạch thẳng đều, song song cách nhau 1 cm - Đảm bảo các kỹ thuật vô trùng
6	Khử trùng que cấy, để nguội, vạch những đường chữ Z trên 2 đường cấy	- Cấy nấm trên thạch	- Que cấy nguội hoàn toàn trước khi cấy - Thạch không bị vỡ, đường vạch thẳng đều - Đảm bảo các kỹ thuật vô trùng
7	Hơ nóng nhẹ lamen đặt lên 2 đường cấy	- Tạo môi trường cho nấm dễ dàng phát triển	- Lamen được đặt ngay ngắn trên 2 đường cấy - Đảm bảo kỹ thuật vô trùng
8	Đậy nắp đĩa petri , ủ ở nhiệt độ phòng 22-25^{0}C, trong 3-5 ngày	- Tạo môi trường cho nấm dễ dàng phát triển	- Đĩa cấy được theo dõi hàng ngày
9	Khi thấy nấm mọc, gỡ lamen đặt lên lam kính có sẵn 1 giọt LPCB (tiêu bản 1)	- Làm tiêu bản soi tươi nấm với LPCB	- Gỡ và đặt nhẹ nhàng lamen lên lam kính - Dung dịch LPCB tràn đều trong lamen cấy nấm, không có bọt

10	Khảo sát 2 tiêu bản dưới kính hiển vi	Phát hiện nấm trong tiêu bản	- Phát hiện đúng các loại nấm có trong tiêu bản
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải	- Dụng cụ, hóa chất được bảo quản đúng quy định, đảm bảo chất lượng cho lần xét nghệm tiếp theo - Đảm bảo an toàn cho nhân viên y tế và cho cộng đồng	- Dụng cụ và hóa chất để đúng vị trí với điều kiện về nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng phù hợp - Lau bề mặt bàn xét nghiệm bằng dung dịch khử trùng - Thu gom và phân loại rác thải đúng quy định: + Bệnh phẩm để vào nơi quy định + Lam kính, găng ta bỏ vào thùng rác thải y tế
12	Rửa tay	Tránh lây nhiễm các tác nhân vi sinh vật gây bệnh	Thực hiện đúng 6 bước rửa tay bằng chất khử trùng
13	Ghi kết quả vào sổ lưu	Lưu trữ, quản lý, theo dõi	Ghi kết quả đầy đủ, chính xác theo quy định: + Nấm gây bệnh/nấm hoại sinh + Ngày xét nghiệm

- Bảng kiểm

BẢNG KIỂM QUY TRÌNH KỸ THUẬT CẤY NẤM TRÊN KÍNH

TT	Các bước tiến hành	Đạt	Không đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế		
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm		
Tiến hành			
3	Đặt lam kính lên que thủy tinh chữ U hoặc V đặt trong đãi		

	petri, đã được hấp vô trùng		
4	Cắt thạch Sabouraud thành khối 1x1mm, đặt lên lam kính trong đĩa petri		
5	Cấy nấm ở điểm giữa mỗi cạnh của khối thạch Sabouraud		
6	Hơ nóng nhẹ lamen đặt lên trên khối thạch		
7	Cho vào trong đĩa petri 1-3ml nước cất vô khuẩn		
8	Đậy nắp đĩa petri , ủ ở nhiệt độ phòng 22-25^{0}C		
9	Theo dõi lứa cấy		
10	Khi thấy nấm mọc, gỡ lamen đặt lên lam kính có sẵn 1 giọt LPCB (tiêu bản 1)		
11	Loại bỏ khối thạch trên lam cấy, giữ lại lam cấy		
12	Nhỏ 1 giọt LPCB lên vị trí khối thạch trên lam cấy, đậy lamen (tiêu bản 2)		
13	Khảo sát 2 tiêu bản dưới kính hiển vi		
14	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
15	Rửa tay		
16	Ghi kết quả vào sổ lưu		

BẢNG KIỂM QUY TRÌNH KỸ THUẬT CẤY NẤM DALMAU

TT	Các bước tiến hành	Đạt	Không đạt
Chuẩn bị			
1	Chuẩn bị nhân viên y tế		
2	Chuẩn bị dụng cụ, hóa chất, bệnh phẩm		
Tiến hành			
3	Chuẩn bị đĩa môi trường cấy nấm		
4	Hòa tan mẫu nấm cần cấy trong nước muối sinh lý vô khuẩn		
5	Dùng que cấy lấy huyền dịch nấm vạch sâu vào thạch 2 đường song song		
6	Khử trùng que cấy, để nguội, vạch những đường chữ Z trên 2 đường cấy		
7	Hơ nóng nhẹ lamen đặt lên 2 đường cấy		
8	Đậy nắp đĩa petri , ủ ở nhiệt độ phòng 22-25^{0}C, trong 3-5		

	ngày		
9	Khi thấy nấm mọc, gỡ lamen đặt lên lam kính có sẵn 1 giọt LPCB (tiêu bản 1)		
10	Khảo sát 2 tiêu bản dưới kính hiển vi		
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải		
12	Rửa tay		
13	Ghi kết quả vào sổ lưu		

- Thang điểm

THANG ĐIỂM KỸ THUẬT CẤY NẤM TRÊN KÍNH

TT	Các bước tiến hành	Thang điểm			Hệ số
		0	1	2	
Chuẩn bị					
1	Chuẩn bị nhân viên y tế				
2	Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
Tiến hành					
3	Đặt lam kính lên que thủy tinh chữ U hoặc V đặt trong đãi petri, đã được hấp vô trùng				
4	Cắt thạch Sabouraud thành khối 1x1mm, đặt lên lam kính trong đĩa petri				
5	Cấy nấm ở điểm giữa mỗi cạnh của khối thạch Sabouraud				
6	Hơ nóng nhẹ lamen đặt lên trên khối thạch				
7	Cho vào trong đĩa petri 1-3ml nước cất vô khuẩn				
8	Đậy nắp đĩa petri , ủ ở nhiệt độ phòng 22-25^{0}C				
9	Theo dõi lứa cấy				
10	Khi thấy nấm mọc, gỡ lamen đặt lên lam kính có sẵn 1 giọt LPCB (tiêu bản 1)				
11	Loại bỏ khối thạch trên lam cấy, giữ lại lam cấy				
12	Nhỏ 1 giọt LPCB lên vị trí khối thạch trên lam cấy, đậy lamen (tiêu bản 2)				
13	Khảo sát 2 tiêu bản dưới kính hiển vi				
14	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				

15	Rửa tay				
16	Ghi kết quả vào sổ lưu				
	Tổng				

Tổng điểm: 32

THANG ĐIỂM KỸ THUẬT CẤY NẤM CẤY NẤM DALMAU

TT	**Các bước tiến hành**	**Thang điểm**			**Hệ số**
		0	**1**	**2**	
Chuẩn bị					
1	Chuẩn bị nhân viên y tế				
2	Đội mũ, đeo khẩu trang, đi găng				
Tiến hành					
3	Chuẩn bị đĩa môi trường cấy nấm				
4	Hòa tan mẫu nấm cần cấy trong nước muối sinh lý vô khuẩn				
5	Dùng que cấy lấy huyền dịch nấm vạch sâu vào thạch 2 đường song song				
6	Khử trùng que cấy, để nguội, vạch những đường chữ Z trên 2 đường cấy				
7	Hơ nóng nhẹ lamen đặt lên 2 đường cấy				
8	Đậy nắp đĩa petri , ủ ở nhiệt độ phòng 22-25^{0}C, trong 3-5 ngày				
9	Khi thấy nấm mọc, gỡ lamen đặt lên lam kính có sẵn 1 giọt LPCB (tiêu bản 1)				
10	Khảo sát 2 tiêu bản dưới kính hiển vi				
11	Thu dọn dụng cụ, hóa chất, rác thải				
12	Rửa tay				
13	Ghi kết quả vào sổ lưu				
	Tổng				

Tổng điểm: 26

- Chỉ tiêu thực hành

STT	Chỉ tiêu	Yêu cầu đạt	Kết quả thực hiện	Xác nhận của người đánh giá
1	Số lần quan sát GV/SV khác thực hiện kỹ thuật	**3**		
2	Số lần thực hiện có hướng dẫn của GV	**1**		
3	Số lần tự làm	**1**		

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG GIÁO TRÌNH

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Văn Đề** (2013), "Ký sinh trùng trong lâm sàng". *Nhà xuất bản y học.*
2. **Nguyễn Văn Đề, Phạm Văn Thân** (2013), "Ký sinh trùng y học – Giáo trình đào tạo bác sỹ đa khoa". *Nhà xuất bản y học.*
3. **Đoàn Thị Nguyện** (2010), "Ký sinh trùng y học". *Nhà xuất bản y học.*
4. **Lê Bách Quang** (2005), "Ký sinh trùng và côn trùng y học". *Nhà xuất bản quân đội nhân dân*.
5. **Lê Bách Quang** (2008), "Ký sinh trùng và côn trùng y học". *Nhà xuất bản quân đội nhân dân*.
6. **Lê Thị Xuân** (2008), "Ký sinh trùng thực hành – Dùng cho đào tạo cử nhân xét nghiệm y học". *Nhà xuất bản giáo dục.*
7. **Centers for Disease Control and Prevention** (2013), "Diagnostic Procedures – Stool Specimens – Microscopic Examination." http://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticProcedures/stool/microexam.html
8. **Gracia, LS. (Ed)** (2010), "Clinial Microbiology Procedures Handbook" *3rd ed, ASM Press, Washington, D.C, Vol 2.*