

**ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA**

VÕ NGỌC NGUYÊN

**NGHIÊN CỨU ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA SỐ LƯỢNG HỒNG CẦU
NGƯỜI, BẠCH CẦU VÀ TIỂU CẦU GIẢ LẬP TRONG
KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC**

Ngành: Công nghệ Sinh học
Mã số ngành: 9420201

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

TP. HỒ CHÍ MINH - NĂM 2024

Công trình được hoàn thành tại **Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM**

Người hướng dẫn 1: PGS. TS. Trần Hữu Tâm

Người hướng dẫn 2: PGS. TS. Nguyễn Thúy Hương

Phản biện độc lập 1

Phản biện độc lập 2

Phản biện 1

Phản biện 2

Phản biện 3

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án họp tại

.....
.....

vào lúc giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM
- Thư viện Đại học Quốc gia Tp.HCM
- Thư viện Khoa học Tổng hợp Tp.HCM

MỞ ĐẦU

Xét nghiệm huyết học là một trong những xét nghiệm thường quy nhất của các đơn vị y tế, được thực hiện ở hầu hết các khâu quan trọng có thể ảnh hưởng đến tính mạng bệnh nhân (phẫu thuật, truyền máu, chẩn đoán và điều trị, ...). Vì vậy, phòng xét nghiệm (PXN) cần phải có mẫu sinh phẩm huyết học để thực hiện ngoại kiểm tra, nội kiểm tra nhằm đảm bảo chất lượng xét nghiệm được tin cậy. Quy trình sản xuất mẫu sinh phẩm dùng trong kiểm tra chất lượng xét nghiệm huyết học là một công nghệ được bảo mật hết sức chặt chẽ. Hiện nay, tất cả các mẫu đang sử dụng hiện nay đều được nhập khẩu và cung cấp bởi các công ty thương mại. Tuy nhiên, mẫu được cung cấp thường không ổn định, hay bị đứt gãy nguồn cung vì phụ thuộc rất nhiều vào chính sách, kế hoạch sản xuất của nhà cung cấp và đơn vị nhập khẩu. Mẫu sinh phẩm huyết học có thành phần chủ yếu là tế bào sống được bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, hạn sử dụng dưới 6 tháng, khi về đến Việt Nam mẫu có hạn sử dụng ngắn lại do thời gian nhập khẩu tương đối dài, trong quá trình vận chuyển có nhiều yếu tố ảnh hưởng nên mẫu thường không ổn định; tốn nhiều chi phí nhập khẩu, vận chuyển, bảo quản nên giá thành mẫu cao. Sản phẩm của nghiên cứu sẽ giúp Việt Nam chủ động được nguồn cung cấp mẫu sinh phẩm trong nước, giảm được chi phí mẫu, tăng thời gian ổn định mẫu khi đến PXN sử dụng.

Ý nghĩa khoa học

Việc nghiên cứu thành công đề tài này sẽ giúp Việt Nam lần đầu tiên có thể tiến hành sản xuất được mẫu sinh phẩm dùng trong kiểm tra chất lượng xét nghiệm huyết học đáp ứng các tiêu chuẩn kỹ thuật theo các tài liệu khoa học có giá trị của thế giới về mẫu kiểm chuẩn.

Ý nghĩa thực tiễn

Sản phẩm khi ứng dụng sẽ giúp nâng cao chất lượng xét nghiệm, hướng đến liên thông kết quả xét nghiệm tại cơ sở y tế; giúp cho các cơ quan quản lý Nhà nước, quản lý y tế chủ động hoạch định và triển khai các chiến lược, kế hoạch quản lý, chính sách an sinh xã hội, chăm sóc và bảo vệ sức khỏe nhân dân.

Đối tượng nghiên cứu: tế bào hồng cầu (TBHC) người từ Ngân hàng máu của Bệnh viện Truyền máu Huyết học TP.HCM, TBHC ngỗng (*Anser cygnoides*) 5-6 tháng tuổi để tạo mẫu tế bào bạch cầu (TBBC) giả lập và TBHC dê (*Capra aegagrus hircus*) 3-4 tháng tuổi để tạo tế bào tiêu cầu (TBTC) giả lập.

Phạm vi nghiên cứu: Tạo ra mẫu sinh phẩm dùng trong kiểm tra chất lượng xét nghiệm huyết học với các thông số tế bào TBHC, TBBC, TBTC sử dụng cho các thiết bị phân tích huyết học đo số lượng tế bào máu bằng phương pháp điện trở và phương pháp đo quang.

Mục tiêu nghiên cứu tổng quát: Tạo mẫu sinh phẩm ổn định về số lượng TBHC, TBBC, TBTC dùng trong kiểm tra chất lượng xét nghiệm huyết học.

Mục tiêu nghiên cứu cụ thể

1. Xác định dung dịch bảo quản TBHC người và điều chế được TBBC giả lập từ TBHC ngỗng, TBTC giả lập từ TBHC dê.
2. Xác định công thức tối ưu môi trường tổ hợp 3 loại tế bào TBHC người, TBBC giả lập, TBTC giả lập ở 3 mức nồng độ thấp, bình thường, cao trong thời gian 3 tháng ở 2-8°C.
3. Xác định giá trị ấn định và đánh giá sự tương đồng về số lượng TBHC, TBBC, TBTC giữa các nhóm thiết bị
4. Ứng dụng mẫu sinh phẩm huyết học để triển khai chương trình ngoại kiểm tra huyết học ở quy mô pilot.
5. Ứng dụng mẫu sinh phẩm huyết học để triển khai nội kiểm huyết học trên dòng máy đo quang và đo điện trở.

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN

- 1.1 **Tổng quan về kiểm tra chất lượng xét nghiệm:** kiểm tra chất lượng (QC) là một phần của đảm bảo chất lượng (QA). Ngoại kiểm tra chất lượng (EQA) và nội kiểm tra chất lượng (IQC) là hai công cụ quan trọng của QC.
- 1.2 **Mẫu sinh phẩm dùng trong QC xét nghiệm huyết học:** định nghĩa và các yêu cầu kỹ thuật của mẫu sinh phẩm dùng trong EQA, IQC huyết học.
- 1.3 **Tình hình nghiên cứu, sản xuất mẫu sinh phẩm dùng trong QC huyết học trên thế giới:** lược khảo tình hình nghiên cứu trên thế giới. Các nghiên cứu đã được một số công ty thương mại ứng dụng trong QC huyết học tuy nhiên ở dạng bảo mật, đăng ký sáng chế.
- 1.4 **Tình hình nghiên cứu, sản xuất mẫu sinh phẩm dùng trong QC huyết học trong nước**
- 1.5 **Đặc điểm máu người, máu ngỗng, máu dê và phương pháp cố định**
- 1.6 **Phương pháp sàng lọc và tối ưu hóa các yếu tố khảo sát ảnh hưởng:** lựa chọn các yếu tố ảnh hưởng, sàng lọc (một yếu tố hoặc đa yếu tố theo phương pháp ma trận Plackett-Burman), tối ưu hóa bằng phương pháp hàm đáp ứng bề mặt - thiết kế cấu trúc có tâm (RSM – CCD).

CHƯƠNG 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

2.1.1 Mẫu máu

- Hồng cầu người và huyết tương tươi đông lạnh được cung cấp bởi bệnh viện Truyền máu Huyết học TP.HCM và đã được kiểm tra âm tính với các virus HIV, HBs-Ag, HCV, Human T-Lymphotropic Virus (HTLV), kháng thể bất thường, giang mai và sốt rét.
- Máu toàn phần từ ngỗng (*Anser cygnoides*) từ 5-6 tháng tuổi, trọng lượng từ 5-6 kg. Máu toàn phần từ dê (*Capra aegagrus hircus*) từ 3-4 tháng tuổi, trọng lượng từ 9-12 kg. Sử dụng chất chống đông CPDA-1 và bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong vòng 3 ngày trước khi tiến hành phân tích.
- Tiêu chuẩn loại trừ: máu tán huyết hoặc bị đông, huyết tương bị lẫn sợi tơ huyết hoặc bị đục.

2.1.2 Hóa chất

- Neomycin sulfate, chloramphenicol, sodium azide, NaCl, trisodium citrate dihydrate, ethylene glycol, citric acid monohydrate, glycerol, formaldehyde, glutaraldehyde, mẫu nội kiểm của ABX Micros 60 và Sysmex XN1000.

2.1.3 Thiết bị xét nghiệm sử dụng để chạy mẫu

- Máy xét nghiệm huyết học tự động: ABX Micro 60, CD 1700, Mindray BC 3000, CD 3200, động CD Ruby, Horiba ABX ABC Vet, Sysmex XP Series, Mindray BC 2000, Sysmex XN series, Horiba Yumizen H500, Mindray BC 5100.

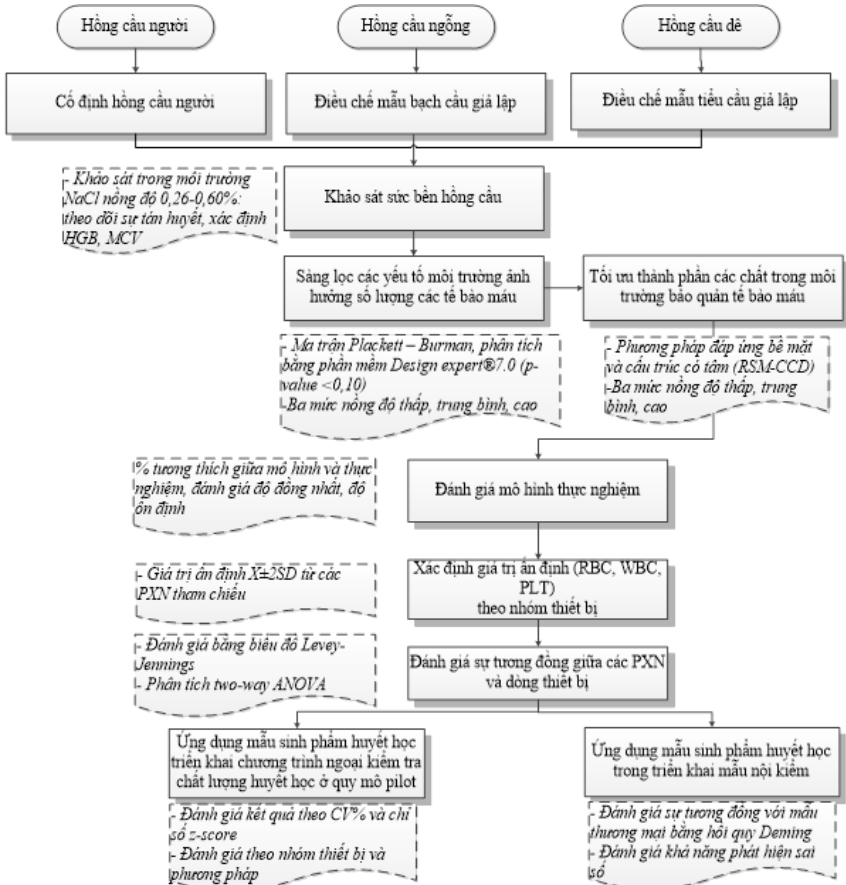
2.1.4 Địa điểm nghiên cứu

Các nội dung nghiên cứu được thực hiện tại:

- Hệ thống phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp II của Trung tâm Kiểm chuẩn Xét nghiệm TP.HCM (TTKCCN TP.HCM).
- Các phòng xét nghiệm ở TP.HCM và các tỉnh có tham gia chương trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm huyết học và sử dụng các dòng máy phân tích huyết học tự động mà nghiên cứu thực hiện.

2.2 Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Sơ đồ nghiên cứu tổng quát



Hình 2. 1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát

2.2.2 Cơ mẫu và thiết kế nghiên cứu

STT	Thí nghiệm	Cỡ mẫu
1	Thí nghiệm cố định hồng cầu người, điều chế bạch cầu giả lập, điều chế tiểu cầu giả lập, khảo sát môi trường bảo quản.	192 mẫu
2	Thí nghiệm sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng, tối ưu hóa thành phần các chất trong môi trường bảo quản	96 mẫu

3	Thí nghiệm đánh giá mô hình dự đoán bằng thực nghiệm, xác định giá trị ấn định, đánh giá sự tương đồng	456 mẫu
4	Thí nghiệm ứng dụng mẫu sinh phẩm huyết học trong triển khai chương trình ngoại kiểm ở quy mô pilot	720 mẫu
5	Thí nghiệm ứng dụng mẫu sinh phẩm huyết học trong triển khai nội kiểm	222 mẫu
Tổng cộng: 1686 mẫu		

2.2.3 *Phương pháp cố định hồng cầu người, điều chế tế bào bạch cầu và tiểu cầu giả lập*

TBHC người tách chiết và bổ sung dung dịch PBS có thời gian bảo quản khoảng 35 ngày. Dung dịch cố định TBHC người gồm: formaldehyde, glutaraldehyde, trisodium citrate và nước cất. TBHC người được cố định bằng cách trộn với dung dịch cố định TBHC, ethylene glycol, glycerol theo tỉ lệ 1:20:0,1:0,2:0,2. Ly tâm thu dịch lắng là TBHC người đã được cố định sau đó bảo quản trong dung dịch Alsever có bổ sung glycerol (ASG).

Máu ngỗng được ly tâm tách dịch lắng, rửa bằng dung dịch PBS thu TBHC ngỗng sạch, cố định bằng dung dịch glutaraldehyde 25% (tỉ lệ 1:10) và bổ sung kháng sinh neomycin sulfate nồng độ cuối 0,003%. Khuấy đều, ly tâm và rửa bằng nước cất thu dịch lắng là TBBC giả lập được cố định hoàn toàn. Bảo quản TBBC giả lập trong nước muối sinh lý NaCl 0,85%, lượng hồng cầu chiếm 30% thể tích dung dịch.

Máu dê được ly tâm tách dịch lắng, rửa bằng dung dịch PBS thu TBHC dê sạch, sau đó cố định bằng hỗn hợp đệm PBS, glutaraldehyde 25% và ethylenglycol 3% với tỉ lệ 1:20, bổ sung kháng sinh neomycin sulfate nồng độ cuối 0,003%. Khuấy đều, ly tâm và rửa bằng nước cất thu dịch lắng là TBTC giả lập được cố định hoàn toàn. Bảo quản TBTC giả lập trong nước muối sinh lý NaCl 0,85%, lượng hồng cầu chiếm 30% thể tích dung dịch.

Đánh giá độ đồng nhất (kiểm định F-test, $\alpha = 0,05$) và độ ổn định (kiểm định t-test, $\alpha = 0,05$) của mẫu TBHC người cố định, TBBC giả lập, TBTC giả lập trong

dung dịch bảo quản để xác định hạn sử dụng của mẫu. Đồng thời khảo sát sức bền của các tế bào hồng cầu sau khi cố định trong môi trường NaCl với nồng độ dao động từ 0,26 đến 0,60 % (tương ứng độ thẩm thấu từ 89 mOsmol/kg đến 205 mOsmol/kg). Nghiên cứu cũng xác định giá trị huyết sắc tố và thể tích bình thường hồng cầu của 3 mẫu RBC trên máy huyết học tự động ABX Micro 60s để đảm bảo mẫu RBC ngừng và dề sau khi cố định không ảnh hưởng đến giá trị huyết sắc tố và thể tích bình thường hồng cầu của RBC người trong mẫu tổ hợp và xác định sự tán huyết của 3 loại RBC.

2.2.4 Phương pháp sàng lọc và tối ưu hóa các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến số lượng các tế bào máu

2.2.4.1 Phương pháp sàng lọc các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến số lượng các tế bào máu

Năm yếu tố tác động đến sự thay đổi số lượng của các tế bào được khảo sát là: chất nền, neomycin sulfate, chloramphenicol, sodium azide và glycerol.

Bảng 2. 1. Các yếu tố khảo sát cho thiết kế sàng lọc yếu tố thí nghiệm theo ma trận Plackett-Burman

STT	Tên yếu tố	Mức dưới (-1)	Mức trên (+1)
1	Huyết thanh (% v/v)	45	65
2	Neomycin sulfate (g/l)	0,3	1,0
3	Chloramphenicol (g/l)	0,02	0,5
4	Sodium azide NaN ₃ (% v/v)	0,5	1,5
5	Glycerol (% v/v)	1	3

Ba loại tế bào máu được phối trộn trong dung dịch nền có thành phần bao gồm 5 yếu tố sàng lọc với nồng độ tương ứng theo thiết kế của ma trận Plackett-Burman đưa ra. Kết quả nghiên cứu được phân tích bằng chương trình “Design expert@7.0”, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA. Ba yếu tố có độ tin cậy p-value < 0,10 và trị tuyệt đối của giá trị ảnh hưởng lớn nhất trong các yếu tố khảo sát sẽ được lựa chọn.

2.2.4.2 Phương pháp tối ưu thành phần các chất trong môi trường bảo quản các tế bào máu

Sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt và cấu trúc có tâm (RSM-CCD) để tối ưu hóa giá trị các yếu tố đang được nghiên cứu. Xác định giá trị tối ưu của ba yếu tố chính từ kết quả sàng lọc thu được và được nghiên cứu ở 5 mức ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$) trong CCD 20 thí nghiệm theo công thức $2n + 2n + 6$ (với n là số yếu tố dùng trong RSM-CCD).

Bảng 2. 2. Nồng độ các yếu tố ảnh hưởng sử dụng thiết kế thí nghiệm CCD

Tên yếu tố	Ngưỡng khảo sát	Mức				
		$-\alpha$	-1	0	$+1$	$+\alpha$
Huyết thanh (% v/v)	38 – 72	38	45	55	65	72
Neomycin sulfate (g/l)	0,06 – 1,24	0,06	0,3	0,65	1,0	1,24
Glycerol (% v/v)	0,3 – 3,7	0,3	1	2	3	3,7

Hàm đáp ứng được chọn là số lượng TBHC người (Y_1 , $A \times 10^{12}/L$), TBBC giả lập (Y_2 , $B \times 10^9/L$) và TBTC giả lập (Y_3 , $C \times 10^9/L$), trong đó A , B , C là số lượng các tế bào máu đo được sau thời gian bảo quản 3 tháng ở $2-8^\circ C$.

2.2.5 Phương pháp xác định giá trị ấn định và đánh giá sự tương đồng về số lượng hồng cầu, bạch cầu và tiểu cầu giữa các nhóm thiết bị

Dựa vào kết quả của các PXN tham chiếu sử dụng dòng máy đại diện cho phương pháp đo quang và đo điện trở để xác định giá trị ấn định. Lựa chọn 5 PXN tham chiếu sử dụng máy ABX Micros 60, Mindray BC 3000, CD 1700, CD 3200, CD Ruby để gửi 10 bộ mẫu mỗi phòng. Giá trị ấn định theo mỗi dòng thiết bị là giá trị trung bình kết quả của PXN tham chiếu $\pm 2SD$.

Kết quả gửi về được xử lý bằng phần mềm Excell và đánh giá bằng biểu đồ Levey-Jennings. Sử dụng phân tích two-way ANOVA và phần mềm Excel để đánh giá kết quả giữa các PXN ($n=10$) trên mỗi dòng thiết bị phân tích và giữa các dòng thiết bị phân tích khác nhau ở cùng một mức nồng độ có đồng nhất hay không.

2.2.6 Ứng dụng mẫu sinh phẩm huyết học để triển khai chương trình ngoại kiểm tra xét nghiệm huyết học ở quy mô pilot

Mẫu đưa vào ứng dụng ở quy mô pilot: sử dụng như mẫu EQA thương mại để triển khai chương trình EQA huyết học từ năm 2022. Số lượng PXN đăng ký năm 2022 là 60 PXN. Kết quả ngoại kiểm xử lý thống kê bằng phần mềm EQA theo nhóm phương pháp (đo quang, đo điện trở kháng) và nhóm thiết bị. Kết quả ngoại kiểm được đánh giá thông qua hệ số biến thiên (CV%) và z-score.

2.2.7 Ứng dụng mẫu sinh phẩm huyết học trong triển khai nội kiểm tra chất lượng xét nghiệm

Mẫu sinh phẩm huyết học sau khi đã được tối ưu hóa ở 3 mức nồng độ thấp, bình thường và cao sẽ được pha chế thành 2 bộ mẫu theo khoảng giá trị ấn định của hãng ABX Micros 60 (đo trở) và Sysmex XN1000 (đo quang), lựa chọn gửi mẫu cho 15 PXN chạy ABX Micros 60 và 15 PXN chạy Sysmex XN1000 để xác định khoảng giới hạn kiểm soát ($\bar{X} \pm 2SD$) theo dòng máy.

Phân tích đồng thời 20 bộ mẫu nội kiểm nghiên cứu (đo lặp lại 3 lần) và 20 bộ mẫu nội kiểm thương mại (đo lặp lại 3 lần) trên dòng máy ABX Micros 60 và Sysmex XN1000, mỗi bộ gồm 3 ống ở 3 mức nồng độ. Đánh giá sự tương đồng của mẫu nghiên cứu và mẫu nội kiểm thương mại bằng phương trình hồi quy Deming theo hướng dẫn của tài liệu CLSI EP14-A3.

2.2.8 Phương pháp đánh giá độ đồng nhất của mẫu

Độ đồng nhất được đánh giá theo ISO 13528, ISO Guide 80, Guide 34 và Guide 35. Lấy mẫu ngẫu nhiên với số lượng là 10% mẫu mỗi lô cho từng lượt kiểm tra mẫu, mỗi mẫu được thực hiện lặp lại 3 lần. Sử dụng kiểm định F-test trong Anova để đánh giá độ đồng nhất.

2.2.9 Phương pháp đánh giá độ ổn định của mẫu

2.2.9.1 Đánh giá độ ổn định theo thời gian thực

Chia mẫu làm 2 lô và kiểm tra số lượng TBHC, TBBC, TBTC định kỳ 5 ngày/lần trong 100 ngày. Sử dụng kiểm định one sample t-test (độ tin cậy 95%) bằng phần mềm SPSS để đánh giá độ ổn định trong suốt thời gian thực nghiệm quan sát ở

nhiệt độ 2-8°C. So sánh giá trị trung bình của 2 lô với giá trị ban đầu. Mẫu được đánh giá ổn định khi ở thời điểm phân tích giá trị p-value > 0,05.

2.2.9.2 *Đánh giá độ ổn định trong điều kiện vận chuyển*

Mẫu được gửi đến PXN để xác định số lượng các tế bào máu ngay trong ngày nhận mẫu và 2 tháng sau đó, mỗi mẫu đo lặp 3 lần. Sử dụng kiểm định ANOVA: Single factor với $\alpha=0,05$ để đánh giá sự tương đồng của các kết quả

CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Độ đồng nhất và ổn định của hồng cầu người cố định, bạch cầu và tiểu cầu giả lập

3.1.1. Đánh giá độ đồng nhất

Kết quả phân tích thống kê số lượng TBHC, TBBC giả lập, TBTC giả lập tại Bảng 3.1 cho thấy $|F_{\text{thực nghiệm}}| < |F_{\text{lý thuyết}}|$ ở cả 3 thông số. Do đó, số lượng TBHC người, TBBC giả lập, TBTC giả lập phân phối vào các ống là đồng nhất.

Bảng 3. 1. Kết quả đánh giá độ đồng nhất

	Hồng cầu ($10^{12}/L$)	Bạch cầu giả lập ($10^9/L$)	Tiểu cầu giả lập ($10^9/L$)
$F_{\text{thực nghiệm}}$	15,21	6,90	3,00
$F_{\text{lý thuyết}}$	19,00	19,00	

3.1.2. Đánh giá độ ổn định

TBHC (số lượng ban đầu $2,80 \times 10^{12}/L$):

- Ngày bảo quản 90: p-value = 0,078 > 0,05, do đó số lượng TBHC vẫn ổn định tại thời điểm ngày thứ 90.
- Ngày bảo quản 95: p-value = 0,04 < 0,05, do đó số lượng TBHC không ổn định và bắt đầu có sự thay đổi tại thời điểm ngày thứ 95.

TBBC giả lập (số lượng ban đầu $5,53 \times 10^9/L$): sau 100 ngày p-value=0,053 > 0,05.

TBTC giả lập (số lượng ban đầu $109 \times 10^9/L$): sau 100 ngày p-value=0,105 > 0,05.

Kết quả cho thấy việc cố định TBHC người, TBHC ngỗng và TBHC dê bằng các dung dịch cố định có thành phần là ethylen glycol, glutaraldehyde, formaldehyde đã giúp kéo dài tuổi thọ của các loại tế bào lên đến hơn 90 ngày.

3.1.3. Khảo sát sức bền các tế bào hồng cầu

Kết quả thí nghiệm (Hình 3.2), cho thấy TBHC người sau khi được cố định chịu được độ thẩm thấu ở nồng độ NaCl 0,46 % (157 mOsmol/kg) cao hơn so với TBHC người không cố định là 0,58% (198 mOsmol/kg).

TBBC giả lập, TBTC giả lập sau khi cố định tế bào ở cả 18 nồng độ đều không có sự tiêu huyết tế bào. Giá trị Hb, MCV của 2 mẫu TBHC ngưng và dề sau khi cố định khi phân tích trên máy huyết học tự động ABX Micros 60 gần như không có (Bảng 3.2), chứng tỏ TBHC ngưng và dề sẽ không làm tăng chỉ số Hb và MCV nếu được tổ hợp chung với nhau. Như vậy, ngoài quan sát sự tán huyết, số liệu đo Hb cũng góp phần khẳng định độ bền của màng hồng cầu sau khi cố định.

3.2 Sàng lọc và tối ưu hóa các yếu tố môi trường ảnh hưởng đến số lượng các tế bào máu

3.2.1 Xác định ngưỡng giá trị của 3 mức nồng độ thấp, bình thường, cao

Dựa trên ngưỡng giá trị lâm sàng của 3 loại tế bào máu TBHC người, TBBC giả lập và TBTC giả lập cùng với khoảng tuyến tính của 3 dòng máy được khảo sát là ABX Micros 60, CD 1700, Mindray BC 3000 theo công bố của nhà sản xuất cùng với các ngưỡng cao bệnh lý để xác định các ngưỡng cao, bình thường và thấp như sau:

Bảng 3.2. Ngưỡng giá trị nồng độ thấp, bình thường, cao của TBHC, TBBC, TBTC

Thông số	Mức nồng độ		
	Thấp	Trung bình	Cao
TBHC ($10^{12}/L$)	0,23-3,5	3,5-5,5	5,5-6,85
TBBC giả lập ($10^9/L$)	0,8-4,5	4,5-11	11-50
TBTC giả lập ($10^9/L$)	10-150	150-400	400-600

3.2.2 Sàng lọc yếu tố ảnh hưởng ở 3 mức nồng độ bình thường, thấp, cao

Với 5 yếu tố được chọn để sàng lọc gồm huyết thanh, neomycin sulfate, chloramphenicol, sodium azide và glycerol với hai mức thấp và cao tiến hành 12 thí nghiệm theo ma trận Plackett-Burman. Dựa trên kết quả đo số lượng các tế bào máu ban đầu, tiến hành pha mẫu theo công thức tính nồng độ để xác định thể tích của từng loại tế bào máu cần hút trong 30 ml hỗn hợp.

Kết quả phân tích thống kê cho thấy cả 3 chỉ tiêu theo dõi (TBHC người, TBBC giả lập và TBTC giả lập) ở 3 mức nồng độ bình thường, thấp, cao đều cùng bị ảnh hưởng bởi 3 yếu tố huyết thanh (% v/v), neomycin sulfate (g/l) và glycerol

(% v/v) với độ tin cậy ($p < 0,1$). Kết quả sàng lọc yếu tố ảnh hưởng cho thấy, độ pha loãng giữa tỷ lệ huyết thanh: các tế bào máu, nồng độ kháng sinh kháng khuẩn neomycin sulfate và tỷ lệ glycerol có tác dụng tăng độ nhớt ảnh hưởng nhất đối với sự ổn định số lượng các tế bào máu. Các yếu tố này được chọn để mở rộng phạm vi nghiên cứu cho thiết kế tối ưu hóa theo RSM-CCD.

3.2.3 Kết quả tối ưu hóa thành phần các chất trong môi trường bảo quản

3.2.3.1 Tối ưu hóa thành phần các chất ở mức nồng độ thấp, bình thường, cao

Phân tích phương sai (ANOVA), phần mềm Design Expert 12.0 đưa ra được dùng như là mô hình tiên đoán số lượng TBHC người (Y1), số lượng TBBC giả lập (Y2) và số lượng TBTC giả lập (Y3) với phương trình cụ thể như sau:

- Số lượng tế bào máu ở mức nồng độ bình thường:

$$Y_1 = 4,11 \cdot 10^{12} + 1,05 \cdot 10^{10} \cdot x_1 + 6,93 \cdot 10^{10} \cdot x_2 + 6,13 \cdot 10^{10} \cdot x_3 - 4,12 \cdot 10^{10} \cdot x_1 x_2 - 5,88 \cdot 10^{10} \cdot x_2 x_3 + 5,01 \cdot 10^9 \cdot x_1^2 - 1,27 \cdot 10^{10} \cdot x_2^2 - 3,21 \cdot 10^{10} \cdot x_3^2$$

$$Y_2 = 6,41 \cdot 10^9 - 1,96 \cdot 10^7 \cdot x_1 + 8,82 \cdot 10^7 \cdot x_2 + 8,82 \cdot 10^7 \cdot x_3 + 1,25 \cdot 10^7 \cdot x_1 x_2 - 8,75 \cdot 10^7 \cdot x_1 x_3 - 8,75 \cdot 10^7 \cdot x_2 x_3 - 3,88 \cdot 10^6 \cdot x_1^2 - 1,45 \cdot 10^9 \cdot x_2^2 - 3,92 \cdot 10^7 \cdot x_3^2$$

$$Y_3 = 1,90 \cdot 10^{11} + 2,08 \cdot 10^9 \cdot x_1 + 1,27 \cdot 10^9 \cdot x_2 + 2,45 \cdot 10^9 \cdot x_3 - 2,38 \cdot 10^9 \cdot x_1 x_2 - 2,38 \cdot 10^9 \cdot x_1 x_3 - 5,12 \cdot 10^9 \cdot x_2 x_3 - 1,33 \cdot 10^9 \cdot x_1^2 + 6,17 \cdot 10^8 \cdot x_2^2 - 2,57 \cdot 10^9 \cdot x_3^2$$

- Số lượng tế bào máu ở mức nồng độ thấp:

$$Y_1 = 3,14 \cdot 10^{12} + 1,96 \cdot 10^9 \cdot x_1 + 7,44 \cdot 10^{10} \cdot x_2 + 6,85 \cdot 10^{10} \cdot x_3 - 6,12 \cdot 10^{10} \cdot x_1 x_2 + 3,12 \cdot 10^{10} \cdot x_1 x_3 - 5,12 \cdot 10^{10} \cdot x_2 x_3 - 5,95 \cdot 10^9 \cdot x_1^2 - 3,42 \cdot 10^{10} \cdot x_2^2 - 4,13 \cdot 10^{10} \cdot x_3^2$$

$$Y_2 = 3,42 \cdot 10^9 + 1,70 \cdot 10^7 \cdot x_1 + 1,22 \cdot 10^8 \cdot x_2 + 8,32 \cdot 10^7 \cdot x_3 - 2,50 \cdot 10^7 \cdot x_1 x_2 - 1,00 \cdot 10^8 \cdot x_1 x_3 - 7,50 \cdot 10^7 \cdot x_2 x_3 - 9,61 \cdot 10^6 \cdot x_1^2 - 1,69 \cdot 10^8 \cdot x_2^2 - 6,26 \cdot 10^7 \cdot x_3^2$$

$$Y_3 = 1,24 \cdot 10^{11} + 4,35 \cdot 10^9 \cdot x_1 + 3,54 \cdot 10^9 \cdot x_2 + 2,77 \cdot 10^9 \cdot x_3 - 4,00 \cdot 10^9 \cdot x_1 x_2 - 4,75 \cdot 10^9 \cdot x_1 x_3 - 9,50 \cdot 10^9 \cdot x_2 x_3 - 8,65 \cdot 10^8 \cdot x_1^2 + 1,08 \cdot 10^9 \cdot x_2^2 - 6,35 \cdot 10^9 \cdot x_3^2$$

- Số lượng tế bào máu ở mức nồng độ cao:

$$Y_1 = 5,11 \cdot 10^{12} + 2,00 \cdot 10^{10} \cdot x_1 + 7,03 \cdot 10^{10} \cdot x_2 + 6,62 \cdot 10^{10} \cdot x_3 - 6,50 \cdot 10^{10} \cdot x_1 x_2 + 1,00 \cdot 10^{10} \cdot x_1 x_3 - 3,75 \cdot 10^{10} \cdot x_2 x_3 + 7,83 \cdot 10^9 \cdot x_1^2 - 1,16 \cdot 10^{10} \cdot x_2^2 - 3,81 \cdot 10^{10} \cdot x_3^2$$

$$Y_2 = 1,63 \cdot 10^{10} + 4,16 \cdot 10^7 \cdot x_1 + 8,32 \cdot 10^7 \cdot x_2 + 1,10 \cdot 10^8 \cdot x_3 - 7,50 \cdot 10^7 \cdot x_1 x_3 - 1,25 \cdot 10^8 \cdot x_2 x_3 + 2,64 \cdot 10^7 \cdot x_1^2 - 1,33 \cdot 10^8 \cdot x_2^2 - 8,94 \cdot 10^6 \cdot x_3^2$$

$$Y_3 = 4,55 \cdot 10^{11} + 5,75 \cdot 10^9 \cdot x_1 + 3,62 \cdot 10^9 \cdot x_2 + 3,28 \cdot 10^9 \cdot x_3 - 6,63 \cdot 10^9 \cdot x_1 x_2 - 3,63 \cdot 10^9 \cdot x_1 x_3 - 1,04 \cdot 10^{10} \cdot x_2 x_3 - 2,36 \cdot 10^9 \cdot x_1^2 + 6,42 \cdot 10^8 \cdot x_2^2 - 4,31 \cdot 10^9 \cdot x_3^2$$

Với x_1, x_2, x_3 lần lượt là hàm lượng huyết thanh, neomycin sulfate và glycerol.

3.2.3.2 *Đánh giá mô hình dự đoán bằng thực nghiệm*

Giá trị phần trăm tương thích giữa giá trị thực nghiệm và lý thuyết của 3 loại tế bào máu đều lớn hơn 95 % ở mức nồng độ bình thường, mức nồng độ thấp và mức nồng độ cao giúp khẳng định tính chính xác của mô hình và sự tồn tại của điểm tối ưu.

Đánh giá độ đồng nhất:

Kết quả phân tích thống kê cho thấy $|F_{\text{thực nghiệm}}| > F_{\text{lý thuyết}}$ trên 3 dòng TBHC, TBBC giả lập, TBTC giả lập ở cả mức nồng độ bình thường, thấp và cao. Điều đó chứng tỏ số lượng 3 dòng tế bào máu bảo quản trong môi trường tối ưu là đồng nhất ở cả 3 mức nồng độ.

Đánh giá độ ổn định:

- Theo kết quả p-value, độ ổn định theo thời gian ở điều kiện nhiệt độ 2-8°C của 3 dòng tế bào là 95 ngày ở mức nồng độ bình thường, 100 ngày ở mức nồng độ thấp, 100 ngày ở mức nồng độ cao.
- Kết quả phân tích ANOVA với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$, chỉ số p-value cho thấy số lượng TBHC người, TBBC giả lập, TBTC giả lập giữa 3 thiết bị ABX Micros 60, CD 1700 và Mindray BC 3000 không có sự khác biệt ở mức nồng độ bình thường, nồng độ thấp và nồng độ cao. Điều này chứng tỏ mẫu huyết học ở cả 3 mức nồng độ bình thường, thấp, cao có thể đáp ứng trên các thiết bị khác nhau và ổn định trong thời gian 3 tháng trong điều kiện vận chuyển.
- Để đánh giá chất lượng mẫu, nghiên cứu thực hiện nhuộm Giemsa để quan sát hình thái các tế bào máu ở thời điểm ban đầu và sau 100 ngày. Hình dạng của TBHC người và TBBC giả lập sau 100 ngày tương đồng với mẫu thương mại, không có sự thay đổi về hình dạng và các TBHC không có hiện tượng bị vỡ.

3.3 Xác định giá trị ấn định và đánh giá sự tương đồng về số lượng hồng cầu, bạch cầu giả lập, tiểu cầu giả lập giữa các nhóm thiết bị

3.3.1 Khảo sát các thiết bị đăng ký thực hiện ngoại kiểm Huyết học nhiều nhất

Năm dòng thiết bị phổ biến nhất: CD Ruby (11,09%), CD 3200 (10,69%), Mindray BC 3000 (8,91%), ABX Micros 60 (8,51%) và CD 1700 (6,53%).

3.3.2 Xác định giá trị ấn định số lượng các tế bào máu bằng phương pháp đo điện trở

3.3.2.1 Dòng máy ABX Micros 60

- Đối với mẫu nồng độ thấp, khoảng giá trị ấn định TBHC người ($\bar{X} \pm 2SD$) là $3,43 \pm 0,33 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $3,83 \pm 0,30 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $95 \pm 6,34 \times 10^9/L$.
- Đối với mẫu nồng độ bình thường, khoảng giá trị ấn định TBHC người là $4,43 \pm 0,14 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $8,32 \pm 0,46 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $151 \pm 6,98 \times 10^9/L$.
- Đối với mẫu nồng độ cao, khoảng giá trị ấn định TBHC người là $5,70 \pm 0,22 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $26,60 \pm 0,66 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $416 \pm 9,44 \times 10^9/L$.

3.3.2.2 Dòng máy CD 1700

- Đối với mẫu nồng độ thấp, khoảng giá trị ấn định TBHC người ($\bar{X} \pm 2SD$) là $3,60 \pm 0,28 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $4,33 \pm 0,66 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $60 \pm 7,10 \times 10^9/L$.
- Đối với mẫu nồng độ bình thường, khoảng giá trị ấn định TBHC người là $5,52 \pm 0,60 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $8,51 \pm 0,75 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $143 \pm 6,54 \times 10^9/L$.
- Đối với mẫu nồng độ cao, khoảng giá trị ấn định TBHC người là $5,80 \pm 0,60 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $26,41 \pm 1,90 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $416 \pm 8,26 \times 10^9/L$.

3.3.2.3 *Dòng máy Mindray BC 3000*

- Đối với mẫu nồng độ thấp, khoảng giá trị ấn định TBHC người ($\bar{X} \pm 2SD$) là $3,43 \pm 0,38 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $3,75 \pm 0,28 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $63 \pm 3,92 \times 10^9/L$.
- Đối với mẫu nồng độ bình thường, khoảng giá trị ấn định TBHC người là $5,24 \pm 0,39 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $7,88 \pm 0,90 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $138 \pm 6,26 \times 10^9/L$.
- Đối với mẫu nồng độ cao, khoảng giá trị ấn định TBHC người là $5,43 \pm 0,66 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $24,83 \pm 1,35 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $396 \pm 8,61 \times 10^9/L$.

3.3.3 *Xác định giá trị ấn định số lượng các tế bào máu bằng phương pháp đo quang*

3.3.3.1 *Dòng máy CD 3200*

- Đối với mẫu nồng độ thấp, khoảng giá trị ấn định TBHC người ($\bar{X} \pm 2SD$) là $3,39 \pm 0,34 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $3,76 \pm 0,48 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $94 \pm 5,70 \times 10^9/L$.
- Đối với mẫu nồng độ bình thường, khoảng giá trị ấn định TBHC người là $5,42 \pm 0,46 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $8,17 \pm 0,80 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $155 \pm 6,66 \times 10^9/L$.
- Đối với mẫu nồng độ cao, khoảng giá trị ấn định TBHC người là $5,64 \pm 0,56 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $23,72 \pm 3,12 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $426 \pm 8,64 \times 10^9/L$.

3.3.3.2 *Dòng máy CD Ruby*

- Đối với mẫu nồng độ thấp, khoảng giá trị ấn định TBHC người ($\bar{X} \pm 2SD$) là $3,10 \pm 0,12 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $3,82 \pm 0,40 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $147 \pm 6,00 \times 10^9/L$.
- Đối với mẫu nồng độ bình thường, khoảng giá trị ấn định TBHC người là $5,25 \pm 0,48 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $7,99 \pm 0,70 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $246 \pm 8,83 \times 10^9/L$.

- Đối với mẫu nồng độ cao, khoảng giá trị ấn định TBHC người là $5,80 \pm 0,72 \times 10^{12}/L$, TBBC giả lập là $22,55 \pm 2,22 \times 10^9/L$ và TBTC giả lập là $669 \pm 8,94 \times 10^9/L$.

3.3.4 Đánh giá sự tương đồng giữa các phòng xét nghiệm và các dòng thiết bị khi phân tích mẫu sinh phẩm huyết học

3.3.4.1 Đánh giá trên các thiết bị đo điện trở

ABX Micros 60: Ở mức nồng độ thấp, có 2 giá trị TBBC giả lập, mức nồng độ bình thường có 1 giá trị TBBC giả lập, 1 giá trị TBTC giả lập và mức nồng độ cao có 1 giá trị TBBC giả lập và 1 giá trị TBHC người nằm ngoài khoảng $X \pm 2SD$ và các sai lệch này nằm ở các PXN khác nhau. Số lượng các PXN có chỉ số không đạt chiếm 2/10 PXN.

Dòng máy CD 1700: Ở mức nồng độ thấp, có 1 giá trị TBHC người, mức nồng độ bình thường có 1 giá trị TBBC giả lập, 2 giá trị TBTC giả lập và mức nồng độ cao có 1 giá trị TBHC người nằm ngoài khoảng $X \pm 2SD$ và các sai lệch này nằm ở các PXN khác nhau. Số lượng các PXN có chỉ số không đạt chiếm 1 tỷ lệ 2/10 PXN.

Dòng máy Mindray BC 3000: Ở cả 3 mức nồng độ, không có giá trị nào nằm ngoài khoảng $X \pm 2SD$.

Sử dụng phân tích two-way ANOVA và phần mềm Excel đánh giá kết quả giữa 10 PXN trên mỗi loại thiết bị phân tích điện trở kháng và giữa các thiết bị phân tích khác nhau ở cùng một mức nồng độ. Kết quả phân tích thống kê như sau:

Mức nồng độ thấp:

- TBBC giả lập $F_1 = 2,05 < F_{9, 18, 0.05} = 2,46$; $F_2 = 20,06 > F_{2, 18, 0.05} = 3,55$.
- TBHC người $F_1 = 1,36 < F_{9, 18, 0.05} = 2,46$; $F_2 = 6,72 > F_{2, 18, 0.05} = 3,55$.
- TBTC giả lập $F_1 = 1,75 < F_{9, 18, 0.05} = 2,46$; $F_2 = 494,16 > F_{2, 18, 0.05} = 3,55$.

Do đó, kết quả TBHC người, TBBC giả lập và TBTC giả lập trên từng thiết bị phân tích giữa các PXN là tương đương nhau và kết quả của 3 thiết bị phân tích đo điện trở là khác nhau và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Mức nồng độ bình thường:

- TBBC giả lập $F_1 = 1,44 < F_{9, 18, 0.05} = 2,46$; $F_2 = 9,94 > F_{2, 18, 0.05} = 3,55$.

- TBHC người $F_1 = 1,35 < F_{9, 18, 0.05} = 2,46$; $F_2 = 58,64 > F_{2, 18, 0.05} = 3,55$.
- TBTC giả lập $F_1 = 0,69 < F_{9, 18, 0.05} = 2,46$; $F_2 = 21,12 > F_{2, 18, 0.05} = 3,55$.

Do đó, kết quả TBHC người, TBBC giả lập và TBTC giả lập trên từng dòng máy giữa các PXN là tương đương nhau và kết quả của 3 thiết bị phân tích đo điện trở khác nhau là khác nhau và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Mức nồng độ cao:

- TBBC giả lập $F_1 = 1,10 < F_{9, 18, 0.05} = 2,46$; $F_2 = 16,68 > F_{2, 18, 0.05} = 3,55$.
- TBHC người $F_1 = 2,37 < F_{9, 18, 0.05} = 2,46$; $F_2 = 3,07 < F_{2, 18, 0.05} = 3,55$.
- TBTC giả lập $F_1 = 1,59 < F_{9, 18, 0.05} = 2,46$; $F_2 = 93,30 > F_{2, 18, 0.05} = 3,55$.

Do đó, kết quả TBHC người, TBBC giả lập và TBTC giả lập trên từng dòng máy giữa 10 PXN là tương đương nhau và kết quả của 3 thiết bị đo điện trở khác nhau ở số lượng TBBC giả lập, TBTC giả lập và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), còn TBHC người thì tương đương nhau.

Như vậy, kết quả phân tích số lượng các tế bào máu của 10 PXN ở cả 3 mức nồng độ là tương đương, tuy nhiên, giữa các thiết bị khác nhau (CD 1700, ABX Micros 60, Mindray BC 3000) ở cùng một mức nồng độ sẽ cho kết quả khác nhau.

3.3.4.2 Đánh giá trên dòng máy đo quang

Dòng máy CD 3200: Ở mức nồng độ thấp có 1 giá trị TBBC giả lập, 1 TBHC người, mức nồng độ bình thường có 2 giá trị TBBC giả lập, 2 giá trị TBHC người, 1 giá trị TBTC giả lập nằm ngoài khoảng giá trị ấn định $X \pm 2SD$ và các sai lệch này nằm ở các PXN khác nhau, còn ở mức nồng độ cao cả 3 giá trị số lượng tế bào máu đều đạt. Số lượng các PXN có chỉ số không đạt chiếm 1 tỷ lệ 2/10 PXN. Dòng máy CD Ruby ở mức nồng độ bình thường có 1 giá trị TBBC giả lập, mức nồng độ cao có 1 giá trị TBTC giả lập nằm ngoài khoảng giá trị ấn định $X \pm 2SD$ và các sai lệch này nằm ở các PXN khác nhau, còn ở mức nồng độ thấp cả 3 giá trị số lượng tế bào máu đều đạt. Số lượng các PXN có chỉ số không đạt chiếm tỷ lệ 1/10 PXN.

Sử dụng phân tích two-way ANOVA và phần mềm Excel để đánh giá kết quả giữa 10 PXN trên mỗi loại thiết bị phân tích và giữa các thiết bị phân tích khác nhau ở cùng một mức nồng độ. Kết quả phân tích thống kê như sau:

Mức nồng độ thấp:

- TBBC giả lập $F_1 = 0,53 < F_{9, 9, 0,05} = 3,18$; $F_2 = 0,40 < F_{1, 9, 0,05} = 5,12$.
- TBHC người $F_1 = 0,53 < F_{9, 9, 0,05} = 3,18$; $F_2 = 1,56 < F_{1, 9, 0,05} = 5,12$.
- TBTC giả lập $F_1 = 2,94 < F_{9, 9, 0,05} = 3,18$; $F_2 = 3243,86 > F_{1, 9, 0,05} = 5,12$.

Kết quả TBHC người, TBBC giả lập, TBTC giả lập giữa các PXN là tương đương nhau, kết quả của 2 thiết bị phân tích đo quang khác nhau ở chỉ số TBTC giả lập và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), còn chỉ số TBBC giả lập và TBHC người thì tương đương nhau.

Mức nồng độ bình thường:

- TBBC giả lập $F_1 = 0,84 < F_{9, 9, 0,05} = 3,18$; $F_2 = 0,91 < F_{1, 9, 0,05} = 5,12$.
- TBHC người $F_1 = 0,72 < F_{9, 9, 0,05} = 3,18$; $F_2 = 0,29 < F_{1, 9, 0,05} = 5,12$.
- TBTC giả lập $F_1 = 1,81 < F_{9, 9, 0,05} = 3,18$; $F_2 = 3410,01 > F_{1, 9, 0,05} = 5,12$.

Kết quả này tương tự với mẫu có nồng độ thấp. Kết quả thống kê cho thấy TBHC người, TBBC giả lập, TBTC giả lập giữa các PXN là tương đương nhau, kết quả của 2 thiết bị phân tích đo quang khác nhau ở chỉ số TBTC giả lập và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), còn chỉ số TBBC giả lập và TBHC người thì tương đương nhau.

Mức nồng độ cao:

- TBBC giả lập $F_1 = 0,49 < F_{9, 9, 0,05} = 3,18$; $F_2 = 0,91 < F_{1, 9, 0,05} = 5,12$.
- TBHC người $F_1 = 0,88 < F_{9, 9, 0,05} = 3,18$; $F_2 = 1,92 < F_{1, 9, 0,05} = 5,12$.
- TBTC giả lập $F_1 = 1,07 < F_{9, 9, 0,05} = 3,18$; $F_2 = 22391,07 > F_{1, 9, 0,05} = 5,12$.

Tương tự, kết quả TBHC người, TBBC giả lập, TBTC giả lập giữa các PXN là tương đương nhau, kết quả của 2 thiết bị phân tích đo quang khác nhau ở chỉ số TBTC giả lập và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), còn chỉ số TBBC giả lập và TBHC người thì tương đương nhau.

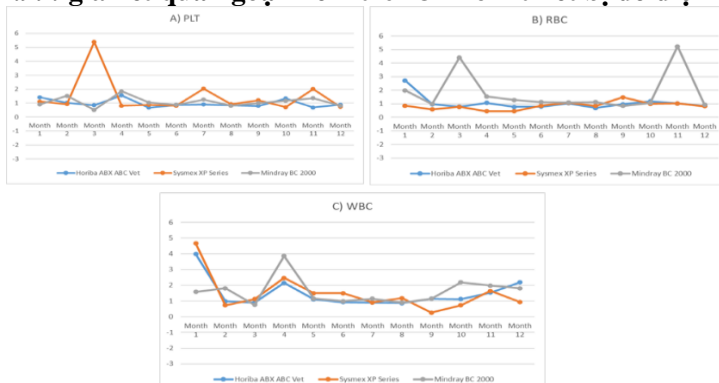
Như vậy, kết quả số lượng các tế bào máu ở 10 PXN khác nhau ở các thiết bị phân tích khác nhau thì tương đương nhau, tuy nhiên với cùng một mức nồng độ thì các dòng máy khác nhau (CD 3200, CD Ruby) sẽ cho kết quả TBBC giả lập và TBHC người tương đương nhau, chỉ có chỉ số TBTC là khác nhau.

Kết quả của các PXN gửi về được phân tích theo 2 nhóm phương pháp là đo quang và đo điện trở kháng và để đảm bảo tính chính xác và khách quan. Chỉ số EQA được quan tâm đầu tiên là CV%: Trên dòng máy ABX chỉ có 1 kết quả CV% ở mức nồng độ thấp HH1 (CV% = 7,16%) lớn hơn 5% ở thông số TBHC người, các thông số ở các mức nồng độ còn lại đều nhỏ hơn 5%. Trên dòng máy CD 1700, số lượng TBTC ở mức nồng độ thấp HH1 có CV% = 6,60%, TBHC người, TBBC giả lập ở mức nồng độ bình thường HH2 (CV% TBHC người = 5,56%, CV% TBBC giả lập = 6,77%) và số lượng TBBC giả lập ở mức nồng độ cao HH3 có CV% = 5,51% lớn hơn 5%. Trên dòng máy Mindray BC 3000 cũng có 1 thông số TBBC giả lập ở mức nồng độ thấp HH1 có CV% = 5,21% lớn hơn 5%. Điều này chứng tỏ, trên cùng 1 dòng thiết bị, các kết quả của các PXN sẽ có sự khác biệt và để đánh giá được độ đúng của các kết quả này thì cần phải so sánh với giá trị đích hay giá trị ấn định.

Biểu đồ Levey-Jenning là công cụ trực quan để đánh giá sự sai lệch của các kết quả phân tích so với giá đích. Các kết quả phân tích được xem là chấp nhận khi nằm trong khoảng $\bar{X} \pm 2SD$. Kết quả phân tích trên 5 dòng máy kiểm tra là ABX Micros 60, CD 1700, Mindray BC 3000, CD Ruby, CD 3200 cho thấy các kết quả sai lệch của TBBC giả lập, TBHC người, TBTC giả lập chủ yếu là ở nồng độ cao và bình thường.

3.4 Ứng dụng mẫu sinh phẩm huyết học để triển khai chương trình ngoại kiểm tra xét nghiệm huyết học ở quy mô pilot

3.4.1 Đánh giá kết quả ngoại kiểm trên 3 nhóm thiết bị đo điện trở



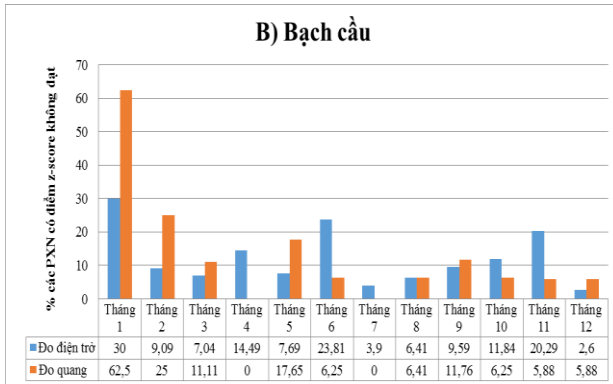
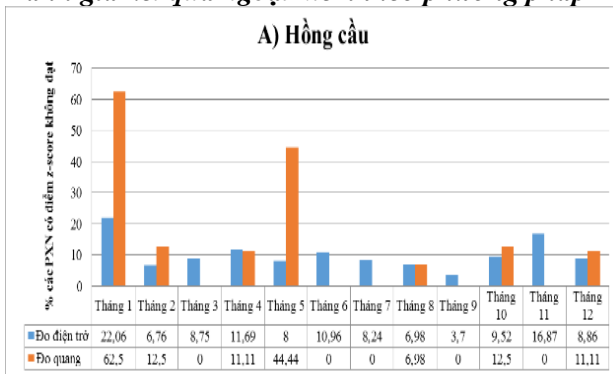
Hình 3. 1. Kết quả z-score trung bình của 3 dòng máy Horiba ABX ABC Vet, Sysmex XP Series, Mindray BC 2000 trong 12 tháng

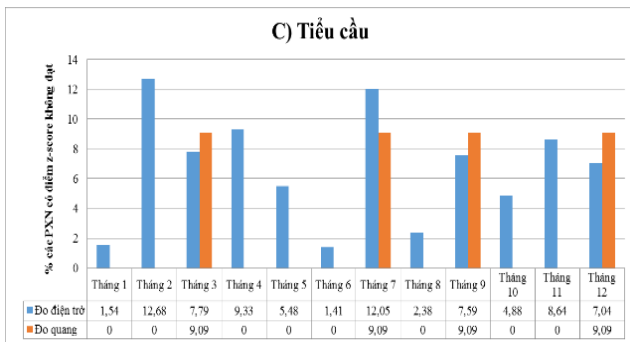
3.4.2 **Đánh giá kết quả ngoại kiểm trên 3 nhóm thiết bị đo quang**



Hình 3. 2. Kết quả z-score trung bình của 3 dòng máy Sysmex XN series, Horiba Yumizen H500, Mindray BC 5100 trong 12 tháng

3.4.3 **Đánh giá kết quả ngoại kiểm theo phương pháp**





Hình 3. 3. Tỷ lệ % các PXN có điểm z-score không đạt trong năm 2022

Như vậy, trong đánh giá kết quả ngoại kiểm theo nhóm thiết bị đo trở thì kết quả phân tích của 15 PXN trên 3 dòng máy là Horiba ABX ABC Vet, Sysmex XP Series, Mindray BC 2000 cho thấy CV% ở thông số TBBC cao hơn so với 2 thông số TBHC và TBTC. Các PXN khi phân tích thông số TBHC cho kết quả ổn định nhất. Điều này chứng tỏ cùng một loại máy phân tích nhưng khi được sử dụng ở những PXN khác nhau thì kết quả sẽ khác nhau. Kết quả z-score trung bình của 3 dòng máy đo trở tương đối tốt, trong 12 tháng thì chỉ có 1 tháng có kết quả không đạt.

Chỉ số CV% trên 3 dòng máy đo quang (Sysmex XN series, Horiba Yumizen H500, Mindray BC 5100) nhỏ hơn so với 3 dòng máy đo trở, do các thiết bị này sử dụng công nghệ hiện đại hơn nên kết quả giữa các PXN không có sai lệch nhiều. Giá trị z-score trung bình của thông số hồng cầu và bạch cầu đa số đều đạt chỉ có thông số TBBC có z-score trung bình không đạt ở các tháng 2, 5, 8, 9, 10. Điều này là do phương pháp phát hiện TBBC của các dòng máy đo quang này khác nhau, có thể là do tán xạ ánh sáng, phản ứng phát huỳnh quang.

Kết quả ở tháng 1, phương pháp đo quang ở thông số TBBC, TBHC tỷ lệ % các PXN có điểm z-score không đạt trên 50%. Tuy nhiên, các tháng sau đó tình trạng này đã được cải thiện. Tỷ lệ % các PXN có điểm z-score không đạt giảm dần sau 12 tháng ở cả 3 thông số TBHC, TBBC, TBTC. Các tháng 10, 11 có tỷ lệ % các PXN có điểm z-score không đạt bằng 0%.

3.5 Ứng dụng mẫu sinh phẩm huyết học trong nội kiểm tra chất lượng xét nghiệm

Kết quả phân tích thống kê và đồ thị hồi quy tuyến tính Deming cho thấy mẫu sinh phẩm huyết học nghiên cứu dùng trong nội kiểm tra đồng với 2 mẫu thương mại của hãng Sysmex XN1000 và ABX Micros 60.

Đánh giá kết quả nội kiểm tại phòng xét nghiệm sử dụng đồng thời mẫu nghiên cứu và mẫu thương mại bằng biểu đồ Levey-Jenning, 6 quy tắc Westgard cơ bản và hiện tượng lệch, trượt cho thấy mẫu nội kiểm nghiên cứu có thể phát hiện quy tắc 1_{2s} , hiện tượng trượt tương tự như mẫu thương mại của hãng Sysmex XN1000 và ABX Micros 60. Việc nghiên cứu thành công mẫu nội kiểm trong nước có thể sử dụng trên dòng máy Sysmex XN1000 (sử dụng phương pháp đo quang) và dòng máy ABX Micros 60 (sử dụng phương pháp đo điện trở) có chất lượng như mẫu thương mại mang lại rất lớn cho các PXN do nhu cầu sử dụng mẫu nội kiểm là rất lớn.

CHƯƠNG 4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1 Kết luận

- Dung dịch bảo quản tế bào TBHC người, TBBC giả lập, TBTC giả lập có độ đồng nhất và ổn định trong 100 ngày. Sau khi cố định 3 loại tế bào có sức bền cao hơn so với các tế bào khi chưa cố định.
- Sàng lọc được 3 yếu tố huyết thanh, neomycin sulfate và glycerol ảnh hưởng nhất đến môi trường tổ hợp và nồng độ tối ưu của huyết thanh, neomycin sulfate và glycerol ở 3 mức nồng độ: bình thường (45,00%; 1,00g/l; 3,00%); thấp (45,00%; 0,30 g/l; 3,00%); cao (45,00 %; 1,00 g/l; 1,00%). Đánh giá mô hình thực nghiệm sau khi tối ưu hóa có > 95% tương tích giữa thực nghiệm và lý thuyết ở cả 3 mức nồng độ. Mẫu sau khi tối ưu đạt độ đồng nhất và ổn định 95 ngày ở mức nồng độ bình thường, 100 ngày ở nồng độ thấp và cao ở điều kiện phòng thí nghiệm và điều kiện vận chuyển ở nhiệt độ 2-8°C. Mẫu sinh phẩm huyết học có hình dạng TBHC người tương đồng với mẫu thương mại.
- Xác định được giá trị ấn định của mẫu trên 5 thiết bị ABX Micros 60, Abbott CD 1700, Mindray BC 3000, CD 3200, CD Ruby. Đối với 3 thiết bị đo điện

trở kháng (Celldyn 1700, ABX Micros 60, Mindray BC 3000) kết quả giữa các PXN là tương đồng và giữa các thiết bị khác nhau ở cùng một mức nồng độ. Đối với các thiết bị đo quang (CD 3200, CD Ruby) kết quả giữa các PXN là tương đồng và giữa các thiết bị khác nhau ở cùng một mức nồng độ TBBC, TBHC là tương đồng, TBTC là khác nhau.

- Mẫu sinh phẩm huyết học dùng trong triển khai chương trình ngoại kiểm tra huyết học ở quy mô pilot trong năm 2022 đã đánh giá được chất lượng của các PXN theo phương pháp và thiết bị
- Mẫu sinh phẩm huyết học ứng dụng trong nội kiểm tra chất lượng xét nghiệm tương đồng với mẫu thương mại và có thể được sử dụng để phát hiện sai số trong quá trình thực hiện xét nghiệm hàng ngày tại PXN.

4.2 Kiến nghị

Nghiên cứu đã tạo ra mẫu sinh phẩm huyết học với 03 loại tế bào TBHC người, TBBC giả lập, TBTC giả lập. Tuy nhiên, nghiên cứu có các kiến nghị nhằm tăng chất lượng mẫu như sau:

- Nghiên cứu làm tăng tuổi thọ của mẫu;
- Nghiên cứu ứng dụng thêm các thiết bị được khảo sát là đang phổ biến tại phòng xét nghiệm hiện nay để đánh giá kết quả, xác định giá trị ấn định;

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

Tạp chí quốc tế

1. Võ Ngọc Nguyên; Trần Hữu Tâm; Nguyễn Thị Hồng Phương; Vũ Đình Dũng; Võ Thanh Sang; Nguyễn Thúy Hương “Determination of the Assigned Values of Blood Cells by an Impedance Method for Hematological Reference Samples Used in Hematology External Quality Assessment (EQA) Programs”. *Biomedicines* 2022, 10,3169.

<https://doi.org/10.3390/biomedicines10123169> (Q1, IF:4.757).

Tạp chí trong nước

1. Võ Ngọc Nguyên, Trần Hữu Tâm, Nguyễn Thị Hồng Phương, Vũ Đình Dũng, Thái Mỹ Trân, Nguyễn Thúy Hương, “Sử dụng phương pháp đo quang để xác định giá trị ấn định của mẫu sinh phẩm huyết học trong kiểm tra chất lượng xét nghiệm huyết học”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 2024, tập 538 (3), 93 – 98.