

XÂY DỰNG QUY TRÌNH SẢN XUẤT MÁU TOÀN PHẦN CHỨA HbA1c DÙNG TRONG NGOẠI KIỂM TẠI VIỆT NAM

Vũ Quang Huy^{1, 2, 3}; Bùi Minh Đức¹; Nguyễn Tiến Huỳnh³
Lê Ngọc Minh Trân³; Lâm Vĩnh Niên¹; Lê Văn Chương¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: xây dựng quy trình sản xuất chất chuẩn HbA1c từ mẫu máu toàn phần dùng trong ngoại kiểm chất lượng xét nghiệm. Nghiên cứu trên cơ sở đánh giá tính đồng nhất và độ ổn định của bộ mẫu chuẩn dựa theo hướng dẫn ISO 13528 và ISO Guide 35. **Đối tượng:** các mẫu máu toàn phần được thu thập tại Bệnh viện Truyền máu Huyết học TP. Hồ Chí Minh. **Phương pháp:** nghiên cứu thực nghiệm, đánh giá tính đồng nhất và độ ổn định của mẫu máu toàn phần chứa HbA1c qua quá trình lưu trữ ở những thời điểm khác nhau. Thử nghiệm sản xuất bộ mẫu máu chứa HbA1c. Sử dụng kiểm định so sánh một trung bình (Oneway ANOVA) và phép kiểm t-test đánh giá tính đồng nhất, độ ổn định của 2 bộ mẫu máu đã sản xuất. **Kết quả:** nồng độ chất ban đầu chứa HbA1c: $5.92 \pm 0.09\%$, CV = 1,54%; $14,94 \pm 0,10\%$, CV = 0,67%. Sau khi đánh giá đồng nhất chất chuẩn HbA1c ở điều kiện đông lạnh và đông khô: ĐL.L1: $6,07 \pm 0,08\%$; ĐL.L.140; T_{thực nghiệm}: ĐL.L1, ĐK.L2: 0,497, ĐL.L3, ĐK.L4: -0,095). Mẫu đông lạnh đánh giá ở nhiệt độ (2 - 8°C) tại các thời điểm sau 3, 5, 7, 10 và 15 ngày (T_{lý thuyết}: 2,200; T_{thực nghiệm}: ĐL.L1, ĐL.L3: 0,956 và p > 0.05). **Kết luận:** đã đánh giá bộ mẫu đạt chất lượng theo ISO 13528; ISO 35 với hai tiêu chí tính đồng nhất và độ ổn định. Sản xuất được hai bộ mẫu dùng trong ngoại kiểm với mức nồng độ bình thường và nồng độ cao đánh giá tại các thời điểm, điều kiện lưu trữ đông lạnh và đông khô. Mẫu đủ điều kiện để tiếp tục dùng đánh giá chất lượng các phòng xét nghiệm.

* Từ khóa: Ngoại kiểm; HbA1c.

Construct the Whole Blood Cells Production Process Contain HbA1c using External Quality Assessment in Vietnam

Summary

Objectives: To develop a process to produce HbA1c standard from whole blood samples used in external quality testing. Research on the basis evaluate the uniformity and stability of the standard set according to ISO 13528 guidelines and ISO Guide 35. **Subjects:** Whole blood samples were purchased at Hochiminh City Hematology Transfusion Hospital. **Methods:** Experimental study, assess the uniformity and stability of whole blood samples containing HbA1c through storage at different times. Test production of blood samples containing HbA1c. Using a comparison test for

1. Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

2. Bệnh viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

3. Trung tâm Kiểm chuẩn Chất lượng Y học, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Người phản hồi (Corresponding): Vũ Quang Huy (drvuquanghuy@gmail.com)

Ngày nhận bài: 10/04/2019; **Ngày phản biện đánh giá bài báo:** 20/05/2019

Ngày bài báo được đăng: 22/05/2019

a medium (Oneway ANOVA) and t-test to assess the uniformity and stability of 2 sets of blood samples produced. Results: Initial concentration of HbA1c: $5.92 \pm 0.09\%$; CV: 1.53%; $14.94 \pm 0.10\%$, CV: 0.70%. After homogeneous evaluation of HbA1c standard under frozen and lyophilized conditions: DL.L1: $6.07 \pm 0.08\%$, DL.L3: $14.84 \pm 0.15\%$; DK.L2: $5.81 \pm 0.12\%$, DK.L4: $14.89 \pm 0.12\%$, F distribution: 3.321; F statistics: DL.L1, DK.L2: 1.140; DL.L3, DK.L4: 1.065 and $p > 0.05$). Lyophilized samples were stored at $2 - 8^\circ\text{C}$ and frozen samples were stored at -80°C , both were assessed at 3, 5, 7, 10 and 15 weeks (F statistics < F distribution and sig value > 0.05), as well as the stability in three months with t statistics < t distribution and $p > 0.05$, $t_{\text{distribution}}$: 2.140; $t_{\text{statistics}}$: DL.L1, DK.L2: 0.497; DL.L3, DK.L4: -0.095. Frozen samples were evaluated at $2 - 8^\circ\text{C}$ at 3, 5, 7, 10 and 15 days, $t_{\text{distribution}}$: 2.200; $t_{\text{statistics}}$: DL.L1, DL.L3: 0.956 and $p > 0.05$. Conclusion: Through the research results, we have assessed the quality of samples according to ISO 13528; ISO 35 with two criteria of uniformity and stability. Produce two sets of samples for external use at normal concentrations and high concentrations assessed at times, freeze-dried and freeze storage conditions. Samples are eligible to continue to use laboratory quality evaluations.

* Keywords: External quality assessment; HbA1c.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đánh giá chất lượng phòng xét nghiệm là một nhu cầu rất cấp thiết đối với hệ thống phòng xét nghiệm. Vì có đánh giá chúng ta mới kiểm soát xác định được năng lực và mức độ hoạt động của phòng xét nghiệm như thế nào, đang đứng thứ hạng được tin cậy cao trong việc trả kết quả cho khách hàng hay không và đó cũng là những tiêu chuẩn tiến tới tham gia ISO 15189 chuẩn thức về xét nghiệm. Đánh giá chất lượng phòng xét nghiệm cung cấp bằng chứng khách quan về kết quả đáng tin cậy cho tất cả khách hàng sử dụng dịch vụ. Việc nghiên cứu bộ mẫu chuẩn HbA1c dùng đánh giá chất lượng các phòng xét nghiệm đóng vai trò rất quan trọng trong kiểm soát và đánh giá chất lượng phòng thí nghiệm, thông qua đó sẽ so sánh giữa các phòng thí nghiệm để giúp kiểm soát và khẳng định bệnh đái tháo đường một cách hiệu quả và thiết thực hơn [3]. Để kiểm soát tốt các sai sót trong quá trình thực hiện và trả kết quả xét nghiệm, đảm bảo độ tin cậy trong chẩn đoán

và đủ tiêu chuẩn kết luận bệnh theo tiêu chuẩn chẩn đoán đái tháo đường Hoa Kỳ (ADA năm 2015) [5]. Hướng tới liên thông kết quả xét nghiệm theo Quyết định 316/QĐ-TTg ngày 27 tháng 02 năm 2016 Thủ tướng Chính phủ [1] và Quyết định 2429/QĐ-BYT ngày 12 tháng 6 năm 2017 của Bộ Y tế về bộ tiêu chí mức đánh giá chất lượng xét nghiệm [4]. Ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm (EQA - External Quality Assessment) được xem như một công cụ minh chứng cho sự hoàn thiện của hệ thống chất lượng phòng xét nghiệm, góp phần không nhỏ trong chẩn đoán và điều trị cho bệnh nhân [7, 10, 11]. Tuy nhiên, để có thể kiểm tra chất lượng xét nghiệm, cần có một mẫu chuẩn đạt tiêu chuẩn [13, 14, 15]. Các mẫu chuẩn thường dùng trong ngoại kiểm hiện nay ở nước ta đa số được nhập khẩu từ nước ngoài, việc vận chuyển và bảo quản rất khó đảm bảo về mặt chất lượng [2]. Vào thời điểm hiện tại, ở Việt Nam chưa có bất kỳ bài báo hay công trình nào được công bố về sản xuất mẫu ngoại kiểm HbA1c trong nước. Trên thực tế,

ngày nay HbA1c được xem như “tiêu chuẩn vàng” trong lựa chọn chẩn đoán và theo dõi điều trị bệnh đái tháo đường [12]. Vì HbA1c không ảnh hưởng của chế độ ăn uống, không phụ thuộc vào thời điểm làm xét nghiệm [8]. Chính vì vậy, việc sản xuất một bộ mẫu HbA1c dùng trong ngoại kiểm chất lượng xét nghiệm rất cần thiết.

Trên cơ sở đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài này với mục tiêu:

- *Đánh giá tính đồng nhất và độ ổn định mẫu chứa HbA1c trong máu toàn phần đã được bảo quản bằng phương pháp đông lạnh và đông khô theo từng thời điểm và nhiệt độ lưu trữ để có một bộ mẫu chuẩn ngoại kiểm đạt chất lượng theo ISO 13528 và ISO 35.*

- *Xây dựng quy trình sản xuất mẫu chuẩn đông lạnh và đông khô chứa HbA1c dùng trong ngoại kiểm tại Việt Nam.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu.

Các túi máu trong nghiên cứu được thu thập từ Bệnh viện Truyền máu Huyết học TP. Hồ Chí Minh.

* *Địa điểm và thời gian:* nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Kiểm chuẩn Chất lượng Xét nghiệm Y học, Trường Đại học Y Dược TP. HCM (ISO 9001-2015 do Tổ chức AJA (Anh Quốc)). Thời gian nghiên cứu từ tháng 10 - 2018 đến 3 - 2019.

* *Tiêu chuẩn chọn mẫu:*

- Mẫu máu toàn phần chứa nồng độ HbA1c < 6,5%.

- Mẫu máu toàn phần chứa nồng độ HbA1c > 7,0%.

- Mẫu máu không sậm màu, không vón cục và không bị tiêu huyết.

- Kết quả công thức máu toàn bộ đều nằm trong giới hạn bình thường.

- Mẫu đã qua sàng lọc, không bị lây nhiễm với kháng nguyên HBsAg, kháng thể kháng HIV1/2, kháng thể HCV.

* *Tiêu chuẩn loại trừ:* những mẫu không phù hợp với tiêu chuẩn lựa chọn.

2. Phương pháp nghiên cứu.

* *Thiết kế nghiên cứu:* nghiên cứu thực nghiệm.

- Tạo 2 bộ mẫu, mỗi bộ mẫu gồm 2 lô (ký hiệu và giải thích: đông lạnh lô 1 (ĐL.L1); ĐL.L3; ĐK.L2; ĐK.L4:).

+ Bộ mẫu thứ nhất: ĐL.L1 và ĐL.L3.

+ Bộ mẫu thứ hai: ĐK.L2 và ĐK.L4.

- Đánh giá đồng nhất và độ ổn định: đánh giá bộ mẫu chứa chất chuẩn HbA1c đồng nhất căn cứ vào ($F_{\text{thực nghiệm}} < F_{\text{lý thuyết}}$), kiểm định Oneway Anova so sánh một trung bình. Mẫu đông khô bảo quản ở 2 - 8°C và mẫu đông lạnh bảo quản ở -80°C, cả hai được đánh giá tại các thời điểm sau 3, 5, 7, 10 và 15 tuần; mẫu đông lạnh tan đông đánh giá ở nhiệt độ 2 - 8°C tại các thời điểm sau 3, 5, 7, 10 và 15 ngày, kiểm định t không bắt cặp (t-tests) với hai phương sai gần bằng nhau.

+ Đánh giá đồng nhất $F_{\text{thực nghiệm}} < F_{\text{lý thuyết}}$; $p > 0,05 \rightarrow$ Kết luận đồng nhất.

+ Đánh giá ổn định $T_{\text{thực nghiệm}} < T_{\text{lý thuyết}}$; $p > 0,05 \rightarrow$ kết luận ổn định.

* *Cỡ mẫu:*

Để bộ mẫu ngoại kiểm máu toàn phần chứa HbA1c với nồng độ bình thường và

nồng độ cao sử dụng trong ngoại kiểm chất lượng đáp ứng được các tiêu chí đánh giá tính đồng nhất và độ ổn định theo quy định và hướng dẫn của tiêu chuẩn ISO 13528: 2015; ISO 35: 2006.

- Số lượng mẫu dùng trong quá trình đánh giá:

+ Tính đồng nhất 10 mẫu/lô: 10 x 4 (lô) = 40 mẫu.

+ Độ ổn định 3 mẫu/lô/thời điểm đánh giá:

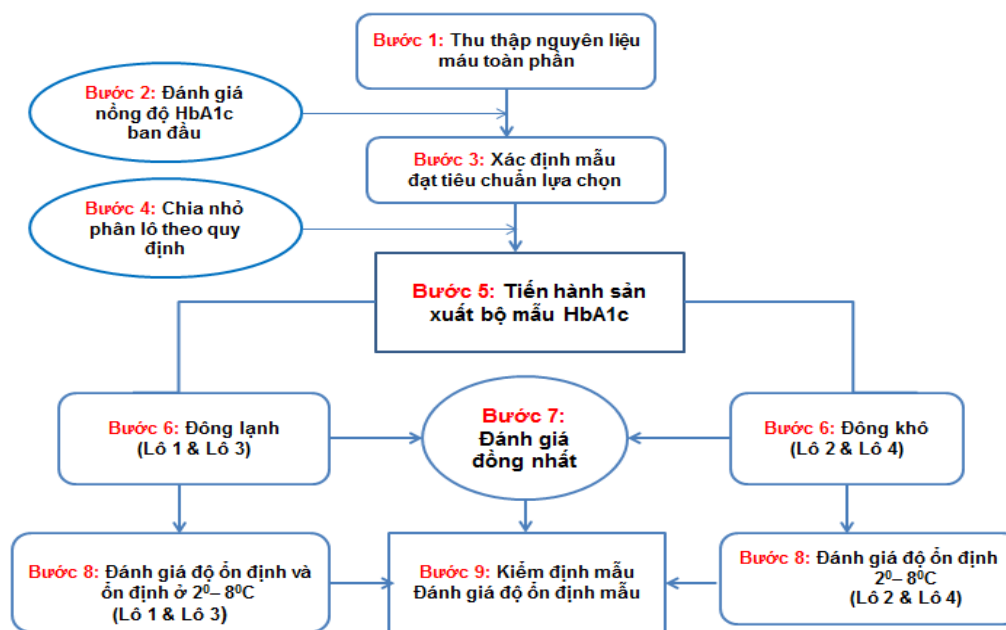
. Thời điểm đánh giá dài hạn 3, 5, 7, 10, 15 tuần đối với mẫu đông lạnh và mẫu đông khô: 3 x 4 (lô) x 5 (thời điểm đánh giá) = 60.

. Thời điểm đánh giá ngắn hạn sau: 3, 5, 7, 10, 15 ngày đối với mẫu sau khi tan đông theo dõi ở nhiệt độ 2 - 8°C: 3 x 2 (mức nồng độ) x 5 (thời điểm đánh giá) = 30 mẫu.

- Cỡ mẫu được tính cho cả quy trình nghiên cứu: $n = 40 + 30 + 60 = 130$ mẫu.

* Quy trình thực hiện:

- Chuẩn bị nguyên liệu và sản xuất bộ mẫu ngoại kiểm HbA1c: thực hiện theo quy trình.



Quy trình sản xuất bộ mẫu chuẩn HbA1c

- Kỹ thuật xét nghiệm: định lượng HbA1c bằng hai phương pháp, thứ nhất đo độ đục phản ứng miễn dịch (DCCT/NGSP) trên máy sinh hóa tự động AU-480 (Hãng Backman Coulter, Mỹ), thiết bị này đạt đầy đủ tiêu chuẩn quốc tế như ISO và chuẩn châu Âu (CE), với thuốc thử hemolyzing reagent (mã REF: 472137) hạn dùng 30/6/2019, reagent R1: mã kit A1cG (Hãng Backman), REF B00389, SEQ: 5524, lot: 1044; reagent R2: mã kit A1cG (Hãng Backman), REF B00389, SEQ: 0400, lot: 1044 hạn dùng: 01/01/2020. Thứ hai, phương pháp sắc ký trao đổi ion HPLC sử dụng để kiểm soát kết quả trong đánh giá đồng nhất và giai đoạn ổn định.

- Vật liệu mẫu nội kiểm tra chất lượng (IQC): extendSURE™, LOT SPECIFIC VALUE ASSIGNMENT CARTD, haemoglobin A1c: mức 1 & mức 2, LOT: 4168, hạn dùng: 31/08/2020.

* *Phân tích dữ liệu:*

Dữ liệu được nhập và xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và Stata 14.0.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 1: Kết quả đánh giá nguyên liệu ban đầu.

TT	Nồng độ ban đầu HbA1c (%)	
	Bình thường	Nồng độ cao
Trung bình	5,92	14,94
Độ lệch chuẩn	0,09	0,10
Biến thiên	1,53%	0,70%

Chúng tôi thu thập được bộ mẫu chứa HbA1c mức bình thường trung bình $5,92 \pm 0,09\%$ và nồng độ cao có giá trị trung bình $14,94 \pm 0,10\%$.

Bảng 2: Kết quả đánh giá độ đồng nhất của bộ mẫu chứa nồng độ HbA1c.

TT	Phân tích đồng nhất các bộ mẫu chứa HbA1c (%)					
	Giá trị ban đầu		Lô mẫu			
	Lô 1 và lô 2	Lô 3 và lô 4	ĐL.L1	ĐK.L2	ĐL.L3	ĐK.L4
Trung bình	5,92	14,94	6,07	5,81	14,84	14,89
Độ lệch chuẩn	0,09	0,10	0,08	0,12	0,15	0,12
Biến thiên	1,53	0,70	0,14	1,01	2,03	0,81
$F_{\text{thực nghiệm}}$			1,140		0,750	
$F_{\text{lý thuyết}}$			3,321		3,321	

Kết quả phân tích đánh giá đồng nhất của bộ mẫu ĐL.L1, ĐL.L3 và bộ mẫu ĐK.L2, ĐK.L4. Với $F_{\text{thực nghiệm}} 1,140 < F_{\text{lý thuyết}} 3,321$ và $F_{\text{thực nghiệm}} 1,065 < F_{\text{lý thuyết}} 3,321$ (tra bảng điểm phần trăm phân phối F với bậc tự do giữa các nhóm $K-1 = 3-1$; bậc tự do toàn bộ mẫu $N-K = 30-3$). Các mẫu máu toàn phần ngoại kiểm trong bộ mẫu: ĐL.L1, ĐL.L3, ĐK.L2 và ĐK.L4 đồng nhất.

Bảng 3: Kết quả đánh giá độ ổn định của bộ mẫu thứ nhất chứa HbA1c.

TT	Lô mẫu ĐL.L1 và ĐK.L2 chứa HbA1c (%) đánh giá qua các thời điểm											
	Đồng nhất		Tuần 3		Tuần 5		Tuần 7		Tuần 10		Tuần 15	
	L.1	L.2	L.1	L.2	L.1	L.2	L.1	L.2	L.1	L.2	L.1	L.2
Trung bình	6,07	5,81	6,03	5,91	6,03	5,79	6,05	5,74	6,03	5,83	6,03	5,80
Độ lệch chuẩn	0,08	0,12	0,05	0,09	0,11	0,07	0,07	0,10	0,06	0,03	0,08	0,07
Biến thiên	0,14	1,01	0,88	1,56	1,80	1,18	1,17	1,68	0,95	0,52	1,40	1,21
T _{thực nghiệm}			-0,033		0,495		0,743		0,769		0,511	
T _{lý thuyết}	2,14											

Kết quả bộ mẫu chứa HbA1c mức nồng độ bình thường đánh giá ở điều kiện nhiệt độ đông lạnh và mẫu đông khô ở nhiệt độ 2 - 8°C, kết quả: giá trị T_{thực nghiệm} tại các thời điểm đánh giá đều nhỏ hơn T_{lý thuyết} tra bảng điểm phần trăm phân phối t với bậc tự do 14 (n1 + n2 - 2 = 10 + 6 - 2). Thỏa điều kiện T_{thực nghiệm} < T_{lý thuyết}. Các lô mẫu chứa HbA1c mức bình thường ĐL.L1 và ĐK.L2 ổn định tại thời điểm nghiên cứu trong thời gian 15 tuần.

Bảng 4: Kết quả đánh giá độ ổn định của bộ mẫu thứ hai HbA1c.

TT	Lô mẫu ĐL.L3 và ĐK.L4 chứa HbA1c (%) đánh giá qua các thời điểm											
	Đồng nhất		Tuần 3		Tuần 5		Tuần 7		Tuần 10		Tuần 15	
	Lô 3	Lô 4	Lô 3	Lô 4	Lô 3	Lô 4	Lô 3	Lô 4	Lô 3	Lô 4	Lô 3	Lô 4
Trung bình	14,84	14,89	14,83	14,94	14,86	14,88	14,85	14,92	14,86	14,91	14,82	14,83
Độ lệch chuẩn	0,15	0,12	0,15	0,14	0,13	0,10	0,18	0,12	0,12	0,05	0,12	0,15
Biến thiên	2,03	0,81	1,01	0,96	0,90	0,67	1,23	0,80	0,80	0,30	0,81	1,04
T _{thực nghiệm}			-0,224		-0,090		-0,251		-0,303		0,395	
T _{lý thuyết}	2,14											

Kết quả bộ mẫu chứa HbA1c lô ĐL.L3 và lô ĐK.L4 đánh giá ở điều kiện nhiệt độ đông lạnh và đông khô theo dõi ở nhiệt độ 2 - 8°C, thể hiện giá trị T_{thực nghiệm} tại các thời điểm đánh giá đều nhỏ hơn T_{lý thuyết} tra bảng điểm phần trăm phân phối t với bậc tự do 14 (n1 + n2 - 2 = 10 + 6 - 2). Thỏa mãn điều kiện T_{thực nghiệm} < T_{lý thuyết}. Các lô mẫu chứa HbA1c nồng độ cao ĐL.L3 và ĐK.L4 ổn định tại thời điểm nghiên cứu trong thời gian 15 tuần.

Bảng 5: Kết quả đánh giá độ ổn định của lô mẫu chứa HbA1c sau khi tan đông nhiệt độ 2 - 8°C.

TT	Lô mẫu ĐL.L1 và ĐL.L3 chứa HbA1c (%) đánh giá qua các thời điểm											
	Đồng nhất		Ngày 3		Ngày 5		Ngày 7		Ngày 10		Ngày 15	
	Lô 1	Lô 3	Lô 1	Lô 3	Lô 1	Lô 3	Lô 1	Lô 3	Lô 1	Lô 3	Lô 1	Lô 3
Trung bình	6,07	14,84	6,03	14,76	6,00	14,79	6,03	14,80	6,03	14,78	6,00	14,75
Độ lệch chuẩn	0,08	0,15	0,08	0,07	0,10	0,15	0,08	0,10	0,07	0,04	0,10	0,13
Biến thiên	0,14	2,03	1,37	0,50	1,72	1,00	1,39	0,67	1,20	0,30	1,67	0,90
T _{thực nghiệm}			0,863	1,205	1,248	0,564	0,883	0,539	0,981	1,078	1,143	1,051
T _{lý thuyết}			2,200									

Kết quả đánh giá độ ổn định lô mẫu tan đông theo dõi ở điều kiện nhiệt độ 2 - 8°C, giá trị T_{thực nghiệm} tại các thời điểm đánh giá đều nhỏ hơn T_{lý thuyết} tra bảng phần trăm phân phối t với bậc tự do 14 (n₁ + n₂ - 2 = 10 + 3 - 2). Thỏa điều kiện T_{thực nghiệm} < T_{lý thuyết}. Các mẫu máu toàn phần ngoại kiểm ĐL.L1 và ĐL.L3 ổn định tại thời điểm nghiên cứu trong thời gian tối đa 15 tuần.

BÀN LUẬN

Ngày nay xét nghiệm HbA1c được sử dụng như tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán bệnh đái tháo đường [2, 4, 9]. Để kiểm soát kết quả xét nghiệm này, đòi hỏi phải có một cơ quan kiểm soát chất lượng. Trung tâm Kiểm chuẩn Chất lượng Xét nghiệm Y học - Bộ Y tế tại Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh đã chủ động kiểm soát chất lượng xét nghiệm dưới sự quản lý của Bộ Y tế, trên cơ sở đó trung tâm, chuyên gia và học viên cùng nghiên cứu đưa ra ý tưởng xây dựng quy trình sản xuất bộ mẫu chuẩn chứa nồng độ HbA1c dùng trong ngoại kiểm chất lượng xét nghiệm tại Việt Nam.

1. Tiến trình xây dựng quy trình sản xuất bộ mẫu chuẩn ngoại kiểm chứa HbA1c.

- Bước 1: chuẩn bị nguồn nguyên liệu ban đầu.

Nguồn nguyên liệu ban đầu được thu tập từ Bệnh viện Truyền máu Huyết học TP. Hồ Chí Minh, đã được sàng lọc, không còn khả năng gây nhiễm đối với bệnh truyền nhiễm. Sau đó, thực hiện đúng quy trình vận chuyển chế phẩm máu về Trung tâm Kiểm chuẩn để kiểm tra lại các thông số hemoglobin và HbA1c, thỏa mãn tiêu chuẩn chọn mẫu trong nghiên cứu sản xuất.

- Bước 2: từ nguồn nguyên liệu trên, định lượng đánh giá kết quả ban đầu.

Mẫu chứa HbA1c mức nồng độ bình thường $5,92 \pm 0,09\%$ và nồng độ cao $14,94 \pm 0,10\%$. Đây là điều kiện cần để sản xuất một bộ mẫu chuẩn chứa HbA1c trong ngoại kiểm.

- Bước 3: tiếp theo quy trình, chia nhỏ thể tích mẫu vào eppendorf với thể tích 1 ml. Sau đó, chia ra làm hai bộ mẫu (mỗi bộ gồm hai lô được ký hiệu: ĐL.L1, ĐL.L3, ĐK.L2, ĐK.L4), bảo quản trong điều kiện đông lạnh và đông khô. Điều kiện thứ nhất: đông lạnh nhiệt độ (-80°C) thực hiện tại phòng thí nghiệm, Trung tâm Kiểm chuẩn Chất lượng Xét nghiệm Y học, Trường Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh và điều kiện thứ hai, bộ mẫu được đông khô, mỗi bộ mẫu gồm hai mức nồng độ, nồng độ bình thường và cao. Sau đó, đánh giá mẫu qua nhiệt độ và thời điểm khác nhau, đánh giá mẫu theo tiêu chuẩn ISO 13528 và ISO Guide 35, cuối cùng chúng tôi có được bộ mẫu chuẩn đảm bảo tính đồng nhất và độ ổn định. Kết quả trong nghiên cứu này đã chứng minh độ ổn định của bộ mẫu HbA1c trong phương pháp định lượng miễn dịch đo độ đục và phương pháp HPLC theo đúng mục tiêu đề ra trong nghiên cứu và có tính gần tương đồng so với các nghiên cứu trên thế giới. Mặc dù trên thực tế hay nhắc đến phương pháp sắc ký trao đổi ion là tối ưu nhất, nhưng trong quá trình nghiêm túc nghiên cứu trên hệ thống chạy máy sinh hóa tích hợp miễn dịch trên cơ sở DCCT/NGSP đã cho kết quả chính xác về độ lặp và độ chụm của mẫu được định lượng, qua đó khẳng định thêm một lần nữa phương

pháp định lượng HbA1c trên hệ thống máy sinh hóa tích hợp như vậy giúp cho người sử dụng tiện lợi hơn, kết quả đảm bảo chẩn đoán và điều trị cho bệnh nhân và phương pháp đo dựa trên trao đổi ion cả hai đều cho kết quả tương đồng. Mặc khác, trong nghiên cứu này còn đánh giá độ ổn định của mẫu bệnh phẩm khi lưu trữ ở những nhiệt độ khác nhau mà kết quả vẫn đảm bảo độ chính xác như trữ mẫu đông lạnh, kết quả tương đồng so với nghiên cứu của Bergmann K và Sypniewska G đông lạnh ổn định sau 15 tuần, mẫu đông khô thuận lợi cho việc vận chuyển và bảo quản, không bị đổ mẫu khi vận chuyển, kết quả đánh giá ổn định sau 15 tuần đảm bảo, mẫu tan đông theo dõi ở nhiệt độ ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) vẫn ổn định sau 15 ngày. Kết quả này một lần nữa cho thấy khi nghiên cứu sản xuất mẫu chuẩn ở điều kiện Việt Nam, mẫu vẫn đảm bảo được sự mong đợi, không có khác biệt so với những nghiên cứu trước đây (như nghiên cứu của Bergmann K và Sypniewska G) về ảnh hưởng của đông lạnh trên mẫu chứa HbA1c [6]. Thông thường, đo trong mẫu tươi ngay sau khi lấy máu hoặc trong các mẫu được bảo quản ở 4°C đến 1 - 2 tuần. Một số nghiên cứu đánh giá độ lặp lại của HbA1c, tập trung vào những công cụ khác nhau sau khi đông lạnh mẫu máu có thể hữu ích nếu cần lưu trữ kéo dài. Đối với kho lưu trữ kéo dài vài tháng hoặc nhiều năm, nên đông lạnh ở nhiệt độ -80°C . Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá hiệu quả của thời gian lưu trữ 2 - 12 tuần ở

điều kiện -80°C và ổn định 1 - 2 tuần ở nhiệt độ $2 - 8^{\circ}\text{C}$ [6]. Một nghiên cứu thực hiện ở Pháp cho thấy nồng độ HbA1c được phân tích bằng phương pháp HPLC trao đổi ion (Bio-Rad Variant II®; phòng thí nghiệm Bio-Rad, CA, Hoa Kỳ) ổn định ở nhiệt độ -80°C trong thời gian ít nhất 1 năm và trong 2 tuần khi được bảo quản ở 4°C [9]. Tuy nhiên, HbA1c không còn ổn định ở nhiệt độ 20°C sau 15 ngày bảo quản. Kết quả tương tự quan sát trong một nghiên cứu của Little R.R phát hiện HbA1c đo trên 5 máy tự động HPLC khác nhau, ổn định nhất ở nhiệt độ -70°C (trong thời gian lưu trữ 57 ngày), trong khi ở 4 phương pháp, độ ổn định ở 4°C cao hơn ở -20°C (tương ứng 14 và 57 ngày).

KẾT LUẬN

Từ những kết quả thí nghiệm và phân tích trên đây, chúng tôi rút ra kết luận:
- Đánh giá tính đồng nhất và độ ổn định mẫu chứa HbA1c trong máu toàn phần được bảo quản bằng phương pháp đông lạnh và đông khô theo từng thời điểm và nhiệt độ lưu trữ để có một bộ mẫu chuẩn ngoại kiểm đạt chất lượng theo ISO 13528 và ISO 35.

- Xây dựng được quy trình sản xuất mẫu chuẩn đông lạnh và đông khô chứa HbA1c dùng trong ngoại kiểm tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Thủ tướng Chính phủ. Quyết định số 316/QĐ-TTg ngày 27 tháng 02 năm 2016, phê duyệt "Đề án tăng cường năng lực hệ thống quản lý chất lượng xét nghiệm y học giai đoạn 2016 - 2025". Thư viện pháp luật. 2016.

2. Vũ Quang Huy. Nghiên cứu xây dựng phát triển chương trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm hóa sinh lâm sàng qua 3 năm 2006, 2007 và 2009 trên 125 phòng xét nghiệm toàn quốc. Tạp chí Y học Thực hành. 2010, 709 (3).

3. Bộ Y tế. Quyết định 3319 hướng dẫn chẩn đoán và điều trị bệnh đái tháo đường týp 2. Thư viện pháp luật. 2017.

4. Bộ Y tế. Quyết định số 2429/QĐ-BYT ngày 12 tháng 6 năm 2017, về việc Ban hành Tiêu chí đánh giá mức chất lượng phòng xét nghiệm y học. 2017, tr.26-31.

5. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2015 abridged for primary care providers. Clin Diabetes. 2015, 33 (2), pp.97-111.

6. K. Bergmann, G. Sypniewska. The influence of sample freezing at -80 degrees C for 2 - 12 weeks on glycated haemoglobin (HbA1c) concentration assayed by HPLC method on Bio-Rad D-10 (R)) auto analyzer. Biochem Med (Zagreb). 2016, 26 (3), pp.346-352.

7. F. Ceriotti. The role of External Quality Assessment Schemes in monitoring and improving the standardization process. Clin Chim Acta. 2014, 432, pp.77-81.

8. B. Lindblad, G. Nordin. External quality assessment of HbA1c and its effect on comparison between Swedish pediatric diabetes clinics. Experiences from the Swedish pediatric diabetes quality register (Swediabkids) and Equalis. Clin Chem Lab Med. 2013, 51 (10), pp.2045-2052.

9. R. R. Little et al. Effects of sample storage conditions on glycated hemoglobin measurement: Evaluation of five different high performance liquid chromatography methods. Diabetes Technol Ther. 2007, 9 (1), pp.36-42.

10. *W.G. Miller et al.* Proficiency testing/external quality assessment: Current challenges and future directions. *Clin Chem.* 2011, 57 (12), pp.1670-1680.

11. *WHO.* Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Use of glycosylated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus: Abbreviated report of a WHO consultation. World Health Organization. Copyright (c) World Health Organization 2011. Geneva. 2011.

12. *S.H. Yang et al.* Positive correlation of plasma PCSK9 levels with HbA1c in patients

with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2016, 32 (2), pp.193-199.

13. *ISO Guide 31.* Reference materials - Content of certificated, label and accompanying documentation. International Organization for Standardization. Third edition. 2015.

14. *ISO Guide 35.* Reference materials - General and statistical principles for certification. International Organization for Standardization. Third edition. 2006.

15. *ISO 13528.* Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. International Organization for Standardization. First edition. 2005.