

Số: 5659/QĐ-BYT

Hà Nội, ngày 19 tháng 12 năm 2017

**QUYẾT ĐỊNH**

**Về việc ban hành “Hướng dẫn giám sát và phòng, chống bệnh xoắn khuẩn vàng da trên người”**

**BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ**

Căn cứ Nghị định số 75/2017/NĐ-CP ngày 20/6/2017 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Y tế;

Xét đề nghị của Cục trưởng Cục Y tế dự phòng,

**QUYẾT ĐỊNH:**

**Điều 1.** Ban hành kèm theo Quyết định này “Hướng dẫn giám sát và phòng, chống bệnh xoắn khuẩn vàng da trên người”.

**Điều 2.** “Hướng dẫn giám sát và phòng, chống bệnh xoắn khuẩn vàng da trên người” là tài liệu hướng dẫn được áp dụng trong các cơ sở y tế dự phòng và các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh trên toàn quốc.

**Điều 3.** Quyết định này có hiệu lực kể từ ngày ký, ban hành.

**Điều 4.** Các ông, bà: Chánh Văn phòng Bộ; Chánh Thanh tra Bộ; Vụ trưởng, Cục trưởng, Tổng Cục trưởng các Vụ, Cục, Tổng cục thuộc Bộ Y tế; Giám đốc Bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế; Viện trưởng Viện Vệ sinh dịch tễ, Viện Pasteur; Giám đốc Sở Y tế; Thủ trưởng y tế các Bộ, ngành; Thủ trưởng các đơn vị có liên quan chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /.

**Nơi nhận:**

- Như Điều 4;
- BT. Nguyễn Thị Kim Tiến (để báo cáo);
- Các đ/c Thứ trưởng Bộ Y tế (để phối hợp chỉ đạo);
- Cục Thú y, Bộ NN và PTNT (để phối hợp);
- Trung tâm: YTDP, KSBT, TTGDSK các tỉnh/thành phố (để thực hiện);
- Bệnh viện đa khoa các tỉnh/thành phố (để thực hiện);
- Chi cục Thú y các tỉnh/thành phố (để thực hiện);
- Lưu: VT, DP.

**KT. BỘ TRƯỞNG  
THỨ TRƯỞNG**



**Nguyễn Thanh Long**

**HƯỚNG DẪN****Giám sát và phòng, chống bệnh xoắn khuẩn vàng da trên người***(Ban hành kèm theo Quyết định số 5659/QĐ-BYT**ngày 19 / 12 / 2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế)***I. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA BỆNH XOẮN KHUẨN VÀNG DA**

Bệnh xoắn khuẩn vàng da (*Leptospirosis*) là bệnh lây truyền từ động vật (zoonosis) sang người với đặc điểm lâm sàng rất đa dạng, gồm 3 thể: nhiễm khuẩn thể ẩn (khoảng 15-40%); thể nhẹ không có biểu hiện vàng da hoặc không có biểu hiện viêm màng não (khoảng 90% số người có biểu hiện triệu chứng) và thể lâm sàng cấp tính điển hình, vàng da nặng gọi là hội chứng Weil (khoảng 5-10%) có thể dẫn đến tử vong.

Bệnh xoắn khuẩn vàng da lưu hành chủ yếu tại khu vực Nam và Đông Nam Á, Châu Đại Dương, vùng Ca-ri-bê, nhiệt đới Mỹ Latinh và Đông Nam Phi. Ở Việt Nam, trước đây bệnh xoắn khuẩn vàng da cũng đã lưu hành rộng rãi ở cả nông thôn, thành thị, cả miền núi, đồng bằng và ven biển... Nhiều nơi có dịch xoắn khuẩn vàng da ở súc vật nuôi, nhất là lợn trong các trại chăn nuôi và lây sang người. Ngày nay, dịch xoắn khuẩn vàng da ở người hiếm xảy ra, nhưng vẫn xuất hiện tản phát, nhất là trong mùa mưa, lụt lội. Tỷ lệ huyết thanh lưu hành xoắn khuẩn vàng da tại Đồng bằng sông Cửu Long là 18,8% (năm 1998), 47,6% tại Thanh Hoá (năm 2013) và 24% tại Thanh Trì, Hà Nội (2015).

Bệnh xoắn khuẩn vàng da (mã ICD10 A27) thuộc bệnh truyền nhiễm nhóm B trong Luật Phòng chống bệnh truyền nhiễm ở Việt Nam.

**1. Tác nhân gây bệnh**

Xoắn khuẩn vàng da là loại xoắn khuẩn thuộc bộ *Spirochaetales* và họ *Leptospiraceae*. Giống xoắn khuẩn vàng da gồm 2 loài: xoắn khuẩn vàng da gây bệnh (*L.interrogans*) và xoắn khuẩn vàng da *L.biflexa* sống tự do không gây bệnh. Sức đề kháng của xoắn khuẩn vàng da yếu tuy nhiên có thể chịu lạnh, sống lâu trong nước nếu pH trung tính, chết ở 56°C trong 10 phút và ở dịch dạ dày trong 30 phút.

**2. Ổ chứa, thời gian ủ bệnh và thời kỳ lây truyền**

Ổ chứa trong thiên nhiên là động vật hoang dã (các loài gặm nhấm hoang dã, hươu, sóc, cáo, chồn hôi, gấu trúc...) và súc vật gần người (chuột, lợn, trâu, bò, chó, gấu trúc...).

Thời gian ủ bệnh thông thường từ 5 đến 14 ngày, tuy nhiên có thể từ 2 ngày đến 30 ngày. Thời gian ủ bệnh trung bình là 11 ngày.



Thời kỳ lây truyền: sự lây truyền của bệnh xoắn khuẩn vàng da từ người sang người là rất hiếm xảy ra. Sau thời gian ủ bệnh, xoắn khuẩn vàng da có thể được đào thải chủ yếu theo đường nước tiểu của súc vật ở các thể lâm sàng khác nhau, kể cả thể không có biểu hiện triệu chứng. Xoắn khuẩn vàng da có thể được bài tiết trong nước tiểu thông thường trong 1 tháng; tuy nhiên ở người và súc vật, xoắn khuẩn vàng da có thể tồn tại khoảng 11 tháng sau khi mắc bệnh cấp tính. Các súc vật là ổ chứa xoắn khuẩn vàng da, nhất là ổ chứa thiên nhiên, có thể lây truyền bệnh suốt đời.

### **3. Đường lây truyền**

Xoắn khuẩn vàng da ở môi trường nước hoặc đất ẩm ướt bị ô nhiễm nước tiểu súc vật xâm nhập vào cơ thể qua da, đặc biệt là chỗ da bị xước và có thể chui qua lỗ chân lông của da hoặc qua niêm mạc ở các hồ bơi bị nhiễm xoắn khuẩn. Có thể bị nhiễm xoắn khuẩn vàng da do tiếp xúc trực tiếp với nước tiểu hoặc mô súc vật bị nhiễm xoắn khuẩn hoặc do ăn phải thức ăn bị nhiễm nước tiểu của động vật nhiễm xoắn khuẩn.

### **4. Tính cảm nhiễm**

Hầu hết mọi người đều có cảm nhiễm với bệnh xoắn khuẩn vàng da, nhưng sự biểu hiện lâm sàng không giống nhau chủ yếu là tùy thuộc vào tuýp huyết thanh gây bệnh. Miễn dịch đặc hiệu tuýp được tạo thành sau khi mắc bệnh nhưng không có miễn dịch bảo vệ chéo giữa các tuýp gây bệnh khác nhau.

## **II. HƯỚNG DẪN GIÁM SÁT**

### **1. Định nghĩa trường hợp bệnh**

#### **1.1. Trường hợp bệnh nghi ngờ**

Là trường hợp có các triệu chứng sau:

- Sốt cao đột ngột 39 - 40°C, rét run kéo dài 5 - 7 ngày;
- Đau cơ, nhất là ở chân, vùng thắt lưng, đau tự nhiên, đau tăng lên khi nắn bóp vào cơ bụng chân;
- Viêm kết mạc;
- Có thể kèm theo một hoặc các biểu hiện sau:
  - + Phát ban.
  - + Hội chứng gan - thận: vàng da, vàng mắt, nước tiểu sẫm màu. Đái ít, nếu diễn biến nặng có thể vô niệu.
  - + Hội chứng màng não: đau đầu dữ dội, vật vã, mê sảng, cứng gáy.

Và có một trong hai điều kiện sau:

- Chẩn đoán xét nghiệm hỗ trợ như IgM (+), Latex (+), ...
- Tiếp xúc với các yếu tố nguy cơ (động vật hoang dã, lũ lụt, đi dã ngoại, săn bắn, gia súc, vật nuôi nghi nhiễm xoắn khuẩn...) và có liên quan đến trường hợp bệnh xác định.

## **1.2. Trường hợp bệnh xác định**

Là trường hợp bệnh nghi ngờ và có ít nhất một trong các kết quả xét nghiệm sau:

- Hiệu giá kháng thể:
  - + Trường hợp có hiệu giá kháng thể lần đầu  $\geq 1/400$ .
  - + Trường hợp có hiệu giá kháng thể lần 2 tăng trên 4 lần so với lần đầu.
- hoặc
- Xét nghiệm miễn dịch huỳnh quang (+), hoặc
  - Nuôi cấy phân lập được xoắn khuẩn vàng da.

## **2. Nội dung giám sát**

### **2.1. Giám sát bệnh nhân, người tiếp xúc**

Điều tra trường hợp bệnh theo phiếu điều tra, lấy mẫu xét nghiệm, báo cáo các trường hợp bệnh nghi ngờ mắc bệnh xoắn khuẩn vàng da.

Lập danh sách, theo dõi sức khỏe hàng ngày các trường hợp có có tiền sử tiếp xúc với nguồn truyền nhiễm trong vòng 30 ngày, khi có biểu hiện bệnh cần đến cơ sở y tế để khám và điều trị.

### **2.2. Giám sát các yếu tố dịch tễ liên quan**

Lấy mẫu đất, nước, chất thải động vật, trung gian truyền bệnh,... tại nơi nghi ngờ lây nhiễm cho người bệnh như: khu vực chuồng trại, giết mổ, chôn xác gia súc, hộ gia đình, ...

Phối hợp với cơ quan thú y thực hiện lấy mẫu trên động vật, sản phẩm động vật nghi mắc bệnh xoắn khuẩn vàng da.

## **3. Thu thập, bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm**

### **3.1. Mẫu bệnh phẩm**

a) Trên người:

- Trong 7 ngày đầu kể từ khi khởi phát:
- + Máu (để phân lập xoắn khuẩn).
- + Dịch não tủy (để phân lập xoắn khuẩn).
- Sau 7 ngày kể từ khi khởi phát:
- + Huyết thanh.
- + Nước tiểu.

b) Trên động vật: máu (để phân lập xoắn khuẩn trong vòng 7 ngày đầu kể từ khi khởi phát), huyết thanh, nước tiểu, phủ tạng động vật (bàng quang, thận, gan).

**3.2. Thu thập, bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm:** thực hiện theo quy định tại Phụ lục 2 kèm theo.

**4. Chẩn đoán phòng xét nghiệm:** hướng dẫn chi tiết tại Phụ lục 3 kèm theo.

## **5. Tổ chức xét nghiệm**

### **5.1. Đơn vị lấy mẫu xét nghiệm**

Trung tâm Kiểm soát bệnh tật/ Trung tâm Y tế dự phòng các tỉnh, thành phố, Trung tâm Y tế quận, huyện các bệnh viện chịu trách nhiệm lấy mẫu bệnh phẩm các trường hợp nghi ngờ mắc bệnh xoắn khuẩn vàng da trên địa bàn, đóng gói theo quy định và vận chuyển mẫu bệnh phẩm về các Viện Vệ sinh dịch tễ, Viện Pasteur theo khu vực phụ trách.

Phối hợp với cơ quan thú y tổ chức lấy mẫu trên động vật nghi mắc bệnh.

Các cán bộ tham gia lấy mẫu bệnh phẩm làm xét nghiệm phải được tập huấn kỹ thuật lấy mẫu, được trang bị phòng hộ cá nhân, phải đảm bảo an toàn khi tiếp xúc với mầm bệnh.

Các Viện Vệ sinh dịch tễ, Viện Pasteur có trách nhiệm chỉ đạo, hỗ trợ chuyên môn kỹ thuật và phối hợp với các tỉnh, thành phố, quận, huyện thuộc khu vực phụ trách tiến hành điều tra, lấy mẫu, bảo quản và vận chuyển bệnh phẩm kịp thời, đúng quy định.

### **5.2. Đơn vị xét nghiệm**

Các Viện Vệ sinh dịch tễ, Viện Pasteur chịu trách nhiệm tiếp nhận các mẫu bệnh phẩm để thực hiện xét nghiệm và thông báo cho đơn vị gửi mẫu bệnh phẩm sau khi có kết quả xét nghiệm khẳng định, đồng thời hỗ trợ kỹ thuật để các đơn vị y tế tuyến tỉnh, thành phố có đủ năng lực thực hiện xét nghiệm.

Phòng xét nghiệm cần đảm bảo mức độ an toàn sinh học cấp II quy định tại Thông tư số 41/2016/TT-BYT ngày 14/11/2016 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc ban hành danh mục vi sinh vật gây bệnh truyền nhiễm theo nhóm nguy cơ và cấp độ an toàn sinh học phù hợp kỹ thuật xét nghiệm.

## **6. Chế độ thông tin báo cáo**

Thực hiện thông tin, báo cáo trường hợp bệnh, ổ dịch theo quy định tại Thông tư số 54/2015/TT-BYT ngày 28/12/2015 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc Hướng dẫn chế độ thông tin báo cáo và khai báo bệnh, dịch bệnh truyền nhiễm.

Thực hiện phối hợp với cơ quan thú y cùng cấp trong giám sát, điều tra, xử lý ổ dịch, truyền thông phòng chống bệnh xoắn khuẩn vàng da... được thực hiện theo quy định tại Thông tư liên tịch số 16/2013/TTLT-BYT-BNN&PTNT ngày 27/5/2013 của Bộ Y tế và Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn về việc Hướng dẫn phối hợp phòng, chống bệnh lây truyền từ động vật sang người nhằm tăng cường giám sát phát hiện sớm, xử lý kịp thời các trường hợp bệnh, ổ dịch bệnh xoắn khuẩn vàng da trên người.

## **III. CÁC BIỆN PHÁP PHÒNG BỆNH**

Công tác phòng và chống dịch bệnh than cần có sự phối hợp chặt chẽ giữa cơ quan thú y và y tế.

## **1. Biện pháp phòng bệnh chung**

Tuyên truyền giáo dục sức khỏe: cung cấp những thông tin cần thiết về bệnh xoắn khuẩn vàng da cho người dân, nhất là ở nơi có bệnh lưu hành địa phương, nơi có ổ dịch tiềm tàng, môi trường lao động có nguy cơ nhiễm xoắn khuẩn vàng da từ nước tiểu súc vật mắc bệnh hoặc quần thể chuột đối với ngành nông nghiệp, chăn nuôi, lâm nghiệp, ngư nghiệp... để người dân biết cách tự phòng bệnh và biết phát hiện sớm những trường hợp bệnh nghi ngờ. Tuyên truyền người dân hạn chế tiếp xúc, giết mổ và ăn thịt gia súc mắc bệnh. Tránh vùng da hở, da bị tổn thương tiếp xúc với gia súc hoặc với nước tại các hồ nước đọng, ao tù, vũng nước có chất phóng uế của gia súc mắc bệnh. Sau khi tiếp xúc, rửa tay và bất kỳ vùng da hở ra bằng xà phòng dưới vòi nước.

Cần có những trang bị bảo hộ lao động, bảo vệ da, niêm mạc như quần áo, tạp dề, ủng, găng tay, kính mắt... cho những người làm việc trong điều kiện có nguy cơ bị nhiễm xoắn khuẩn vàng da (nông dân, ngư nghiệp, công nhân lâm nghiệp, vệ sinh, hầm mỏ, chăn nuôi, thú y, quân đội...).

Các chuồng trại chăn nuôi súc vật, lò mổ... phải cao ráo, có nền cứng dễ thoát nước, thường xuyên được cọ rửa sạch sẽ, khử trùng tẩy uế khi cần thiết. Phải có hệ thống xử lý tốt nguồn chất thải, chất phóng uế của gia súc.

Vấn đề an toàn về chăn nuôi, giết mổ động vật thực hiện theo hướng dẫn của cơ quan thú y địa phương.

## **2. Biện pháp phòng bệnh đặc hiệu**

Hiện nay chưa có biện pháp phòng bệnh đặc hiệu cho bệnh này.

## **3. Điều trị dự phòng sau phơi nhiễm**

Đối với những người chỉ có 1 lần có tiếp xúc với yếu tố nguy cơ (nguồn nước, đất... nghi nhiễm xoắn khuẩn vàng da) và không có vết thương ngoài da: Doxycycline 200 mg liều duy nhất trong vòng 24 - 72 giờ kể từ khi phơi nhiễm.

Đối với những người chỉ có 1 lần có tiếp xúc với yếu tố nguy cơ (nguồn nước, đất... nghi nhiễm xoắn khuẩn vàng da) và có vết thương ngoài da: Doxycycline 200 mg/ ngày trong 3-5 ngày và bắt đầu uống thuốc ngay trong vòng 24 - 72 giờ kể từ khi phơi nhiễm.

Đối với những người có tiếp xúc nhiều lần với yếu tố nguy cơ (nguồn nước, đất... nghi nhiễm xoắn khuẩn vàng da) và ở vùng nguy cơ cao: Doxycycline 200 mg/1 lần/1 tuần cho đến khi không còn nguy cơ phơi nhiễm, tối đa không quá 6 tuần.

## **IV. XỬ LÝ Ổ DỊCH**

### **1. Định nghĩa ổ dịch**

**1.1. Ổ dịch:** Một nơi (thôn, xóm, đội/ tổ dân phố/ đơn vị ...) được gọi là ổ dịch khi ghi nhận ít nhất 1 trường hợp bệnh xác định trở lên và có yếu tố dịch tễ liên quan.

**1.2. Ổ dịch chấm dứt:** Ổ dịch bệnh xoắn khuẩn vàng da chấm dứt khi không ghi nhận trường hợp mắc mới trong vòng 30 ngày kể từ ngày khởi phát trường hợp bệnh gần nhất.



## **2. Các biện pháp xử lý ổ dịch**

### **2.1. Triển khai các biện pháp phòng bệnh chung (Mục 1, Phần III).**

### **2.2. Thực hiện thêm các biện pháp sau**

#### **2.2.1. Đối với người bệnh**

Những trường hợp mắc bệnh hoặc nghi ngờ phải được quản lý, điều trị tại cơ sở y tế. Cách ly, theo dõi, điều trị sớm và phòng chống biến chứng.

Dụng cụ y tế, đồ dùng tiếp xúc trực tiếp với nguồn lây nhiễm và chất thải, dịch tiết cơ thể của bệnh nhân phải được thu gom và khử trùng triệt để.

#### **2.2.2. Đối với người tiếp xúc**

Người tiếp xúc là những người có tiếp xúc trực tiếp với nguồn lây nhiễm (động vật, sản phẩm của động vật, đất, nước... nghi ô nhiễm tác nhân gây bệnh) hoặc tiếp xúc trực tiếp với bệnh nhân.

Điều trị dự phòng cho người tiếp xúc theo hướng dẫn tại Mục 3, Phần III trong Hướng dẫn này.

Lập danh sách người tiếp xúc, theo dõi sức khỏe trong vòng 30 ngày kể từ lần tiếp xúc cuối cùng. Khi phát hiện các triệu chứng cần đến ngay cơ sở y tế để được khám, điều trị kịp thời.

#### **2.2.3. Đối với khu vực ổ dịch**

##### **a) Xử lý môi trường**

Cần sát trùng, tẩy uế đồng thời đối với các đồ vật bị nhiễm máu, nước tiểu bệnh nhân và khu vực bị nhiễm nước tiểu súc vật.

Thường xuyên lau rửa nền nhà, tay nắm cửa và bề mặt các vật dụng bằng các chất tẩy rửa thông thường (xà phòng, các chất khử khuẩn gia dụng).

Phun dung dịch khử trùng có chứa Clo nồng độ 0,5% Clo hoạt tính tại các địa điểm có liên quan dịch tễ càng sớm càng tốt 2-3 lần cách nhau 2-3 ngày. Địa điểm khử trùng (lau rửa, phun) gồm:

- Khu vực nghi ô nhiễm: nhà người bệnh, khu vực chuồng trại, nơi giết mổ, nơi chôn gia súc mắc bệnh.
- Các gia đình tiếp giáp nhà người bệnh, gia đình có gia súc mắc bệnh.
- Tại phòng khám bệnh, nơi điều trị người bệnh.

Các phương tiện sau khi vận chuyển người bệnh phải được xử lý bằng các dung dịch khử trùng có chứa Clo nồng độ 0,5% Clo hoạt tính.

##### **b) Xử lý người bệnh tử vong**

Nếu người bệnh tử vong thì tiến hành sát trùng tẩy uế lần cuối tại gia đình hoặc bệnh viện và mai táng bệnh nhân tử vong theo quy định đối với bệnh truyền nhiễm gây dịch nhóm B theo Thông tư số 02/2009/TT-BYT ngày 26/5/2009 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc hướng dẫn vệ sinh trong hoạt động mai táng và hỏa táng.

**c) Xử lý đối với động vật**

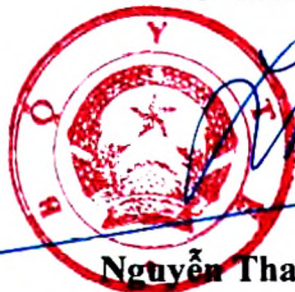
Phối hợp với cơ quan thú y, chính quyền địa phương tiến hành xử lý theo hướng dẫn tại Mục 4, Phụ lục 14 về Hướng dẫn phòng chống bệnh xoắn khuẩn tại Ban hành kèm theo Thông tư số 07/2016/TT-BNNPTNT ngày 31/5/2016 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn về Hướng dẫn phòng, chống bệnh của động vật trên cạn.

**d) Phòng hộ cá nhân**

Những người trực tiếp điều trị, chăm sóc, tham gia xử lý ổ dịch xoắn khuẩn vàng da phải sử dụng đầy đủ phương tiện bảo hộ cá nhân theo quy định để phòng lây nhiễm. Sau đó phải rửa tay, chân sạch bằng xà phòng hoặc ngâm tay, chân vào dung dịch khử trùng chứa Clo với nồng độ 0,5% Clo hoạt tính trong 1 phút rồi rửa kỹ lại bằng nước sạch.

Trong quá trình thực hiện nếu có vướng mắc, đề nghị phản ánh kịp thời về Bộ Y tế (Cục Y tế dự phòng) để giải quyết./.

**KT. BỘ TRƯỞNG  
THỨ TRƯỞNG**



**Nguyễn Thanh Long**



## PHỤ LỤC 1

(Kèm theo Quyết định số 5659/QĐ-BYT ngày 19 tháng 12 năm 2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế)

Cơ sở y tế điều tra ca bệnh:.....

Ngày điều tra:...../...../.....

**Mẫu 1**

### PHIẾU ĐIỀU TRA TRƯỜNG HỢP BỆNH XOÁN KHUẨN VÀNG DA TRÊN NGƯỜI

#### I. THÔNG TIN CÁ NHÂN

1. Họ và tên bệnh nhân:.....

2. Ngày/tháng/năm sinh: ...../...../..... Tuổi:.....

3. Giới: Nam ☐ Nữ ☐

4. Dân tộc:..... 5. Điện thoại:.....

6. Nghề nghiệp (ghi rõ):.....

7. Địa chỉ nơi cư ngụ: .....

8. Địa chỉ nơi làm việc:.....

9. Ngày khởi bệnh:...../...../..... 10. Ngày vào viện:...../...../.....

11. Tên cơ sở điều trị:.....

#### II. TÌNH TRẠNG BỆNH

12. Lý do vào viện: .....

13. Bệnh sử:.....

.....

Bệnh kèm theo:.....

14. Triệu chứng:

Sốt cao <input type="checkbox"/>	Đau nhức cơ <input type="checkbox"/>	Khó thở <input type="checkbox"/>
Đau đầu <input type="checkbox"/>	Vàng mắt <input type="checkbox"/>	Ho <input type="checkbox"/>
Mệt mỏi <input type="checkbox"/>	Vàng da <input type="checkbox"/>	Tiểu ít <input type="checkbox"/>
Buồn nôn <input type="checkbox"/>	Xuất huyết <input type="checkbox"/>	Tiểu nhiều <input type="checkbox"/>
Nôn <input type="checkbox"/>	Đau bụng <input type="checkbox"/>	Nước tiểu vàng <input type="checkbox"/>
Tiêu chảy <input type="checkbox"/>	Biến chứng tim mạch <input type="checkbox"/>	Biến chứng phổi <input type="checkbox"/>
Suy thận <input type="checkbox"/>	Nhiễm trùng máu <input type="checkbox"/>	Viêm não vô khuẩn <input type="checkbox"/>
Suy gan <input type="checkbox"/>	Khác:.....	

15. Xét nghiệm

Loại mẫu: .....

Cơ sở lấy mẫu:.....

Ngày lấy mẫu:...../...../.....

Ngày có kết quả:...../...../.....

Kết quả xét nghiệm:.....

Phương pháp xét nghiệm:.....

Cơ sở xét nghiệm:.....

X-quang: (ngày...../...../.....).....

Kết quả khám nghiệm tử thi:.....

#### III. YẾU TỐ DỊCH TỄ

Tiền sử tiếp xúc: (trong vòng 30 ngày trước khi mắc bệnh)

16. Đi đâu trong vòng 30 ngày gần đây Có ☐ Không ☐  
 Địa chỉ (nếu có đi):.....

17. Tiếp xúc với động vật Có ☐ Không ☐  
 Có thấy chuột/ chất thải của chuột trong nhà Có ☐ Không ☐  
 Tiếp xúc với chuột/ chất thải chuột/ loài gặm nhấm Có ☐ Không ☐  
 Tiếp xúc với gia súc trang trại/ vật nuôi Có ☐ Không ☐  
 Nếu có, loại gia súc/ vật nuôi:.....ở đâu: ..... Ngày...../...../.....  
 Tiếp xúc với động vật hoang dã Có ☐ Không ☐  
 Nếu có, loại động vật:.....ở đâu: ..... Ngày...../...../.....

18. Tiếp xúc với nước:  
 Nước máy ☐ Nước sông ☐ Nước ngập/ lụt ☐ Không ☐  
 Đất ẩm/ướt ☐ Bùn ☐ Nước thải ☐  
 Nước khác:.....  
 Nếu có tiếp xúc, ở đâu:.....ngày...../...../.....  
 Hình thức tiếp xúc: sinh hoạt, khi làm việc, làm vườn, đi bơi, tắm sông, câu cá, đi dã ngoại, săn bắn, khác..... (khoanh tròn mục tương ứng)

19. Tiếp xúc gần với người được chẩn đoán bị bệnh do xoắn khuẩn vàng da trong vòng 30 ngày  
 Có ☐ Không ☐ Không rõ ☐  
 Địa chỉ (nếu có):.....ngày:...../...../.....

20. Môi trường sống tại nơi cư ngụ:  
 Tình trạng vệ sinh nhà ở: .....  
 Tình trạng môi trường/súc vật xung quanh:.....  
 Tình trạng chuột: Có nhiều ☐ Có ít ☐ Không có ☐

21. Môi trường sống tại nơi làm việc:  
 Tình trạng vệ sinh phòng/nơi làm việc: .....  
 Tình trạng môi trường/ súc vật xung quanh:.....  
 Tình trạng chuột: Có nhiều ☐ Có ít ☐ Không có ☐

**V. CHẨN ĐOÁN, RA VIỆN**

22. Chẩn đoán vào viện:.....  
 23. Chẩn đoán khi ra viện/chuyển viện/tử vong:.....  
 24. Ngày ra viện/ chuyển viện/ tử vong (Khoanh tròn mục tương ứng):...../...../.....  
 25. Tình trạng bệnh nhân khi ra viện:  
 Khỏi ☐ Đỡ/ ổn định ☐ Nặng, xin về ☐  
 Chuyển viện ☐ Di chứng (.....) ☐ Tử vong ☐

26. Nếu chuyển viện, tên bệnh viện chuyển đến:.....  
 27. Các ghi nhận khác:.....

Ngày điều tra: ...../...../..... Ngày.....tháng.....năm 20...  
**Người điều tra** **Lãnh đạo cơ sở Y tế**  
(Ký tên đóng dấu)

# PHIẾU YÊU CẦU XÉT NGHIỆM VÀ TRẢ LỜI KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM BỆNH XOẮN KHUẨN VÀNG DA TRÊN NGƯỜI

Mã số bệnh nhân: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Họ và tên: .....

Ngày, tháng, năm sinh: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Tuổi (năm): \_\_\_\_

Giới: ☐ Nam ☐ Nữ

Điện thoại liên lạc: .....

Địa chỉ: Số nhà/số phòng: ..... Xã/phường: .....

Quận/huyện: ..... Tỉnh, thành phố: .....

Ngày nhập viện: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_ (ngày/tháng/năm)

Ngày khởi phát: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_ (ngày/tháng/năm)

Ngày lấy mẫu: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_ (ngày/tháng/năm)

Thời gian lấy mẫu: \_\_\_\_giờ \_\_\_\_phút

Loại bệnh phẩm:

☐ Máu hoặc huyết thanh ☐ Dịch não tủy ☐ Nước tiểu ☐ Mẫu sinh thiết cơ trên người

☐ Phù tạng của súc vật (gan, thận) ☐ Khác (ghi rõ) .....

Nơi lấy mẫu: .....

**Bác sỹ yêu cầu xét nghiệm**  
(ký, họ tên)

**Người lấy mẫu**  
(ký, họ tên)

Số điện thoại của bác sỹ yêu cầu xét nghiệm: .....

## KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM

Đơn vị xét nghiệm: .....

Mã số bệnh nhân: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Ngày nhận bệnh phẩm: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_ (ngày/tháng/năm)

Tình trạng bệnh phẩm: ☐ Tốt ☐ Không tốt ☐ Từ chối xét nghiệm (lý do:.....)

Ngày xét nghiệm: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_ (ngày/tháng/năm)

Kỹ thuật xét nghiệm: .....

Kết quả: ☐ Xoắn khuẩn vàng da gây bệnh (*L.interrogans*) ☐ Xoắn khuẩn vàng da (*L.biflexa*)  
☐ Khác (ghi rõ .....) )

**Cán bộ xét nghiệm**  
(ký, họ tên)

....., ngày.....tháng.....năm.....  
**Trưởng phòng xét nghiệm**  
(ký, họ tên)



MẪU BÁO CÁO TRƯỜNG HỢP BỆNH HOẶC Ồ DỊCH LÂY TRUYỀN TỪ ĐỘNG VẬT SANG NGƯỜI  
(Áp dụng đối với đơn vị y tế khi trao đổi thông tin bệnh dịch với các đơn vị thú y)  
(Ban hành kèm theo Thông tư số 16/2013/TTLT-BYT-BNN&PTNT ngày 25/5/2013)

Cơ quan chủ quản:.....

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Đơn vị:.....

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Số:...../.....

....., ngày..... tháng .....năm .....

**BÁO CÁO**

**Mẫu 3**

**TRƯỜNG HỢP BỆNH HOẶC Ồ DỊCH BỆNH XOẺ KHUẨN VÀNG DA**

Kính gửi: .....

**I. Thông tin bệnh nhân đầu tiên:**

1. Họ tên bệnh nhân:..... Tuổi:..... Giới:.....
2. Họ tên người liên hệ (đối với trẻ em):.....
3. Nghề nghiệp:.....
4. Nơi ở hiện tại:.....
5. Quận/Huyện:..... Tỉnh: .....Số điện thoại: .....
6. Ngày khởi phát triệu chứng đầu tiên:...../...../.....
7. Ngày vào viện:...../...../.....Ngày tử vong (nếu có): ...../...../.....
8. Nơi khám bệnh đầu tiên:.....
9. Nơi bệnh nhân đang điều trị:.....
10. Chẩn đoán ban đầu:.....
11. Chẩn đoán xác định:.....
12. Tiền sử: .....
13. Yếu tố dịch tễ: .....
14. Ngày lấy mẫu bệnh phẩm: .....Loại bệnh phẩm.....
15. Ngày gửi bệnh phẩm xét nghiệm: ...../...../.....
16. Ngày trả và kết quả xét nghiệm: ...../...../.....
17. Nơi xét nghiệm:..... Phương pháp xét nghiệm:.....

**II. Tổng hợp tình hình bệnh hoặc ổ dịch đến thời điểm báo cáo**

1. Tổng số trường hợp mắc:.....
2. Tổng số trường hợp tử vong:.....
3. Số địa phương ghi nhận trường hợp bệnh: Số tỉnh:..... Số huyện:.....Số xã:.....
4. Số mẫu xét nghiệm:.....
5. Số mẫu dương tính:.....
6. Các yếu tố nguy cơ:.....

**III. Nhận định tình hình**

**IV. Các biện pháp phòng, chống dịch đã triển khai**

Nơi nhận:

- .....

Thủ trưởng đơn vị

(ký, đóng dấu)

## PHỤ LỤC 2

### HƯỚNG DẪN LẤY MẪU, BẢO QUẢN, VẬN CHUYỂN, XÉT NGHIỆM

(Kèm theo Quyết định số 5659/QĐ-BYT ngày 19 tháng 12 năm 2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế)

#### 1. Loại bệnh phẩm

Mẫu bệnh phẩm máu hoặc huyết thanh, dịch não tủy, nước tiểu, mẫu sinh thiết cơ trên người; phủ tạng của súc vật (gan, thận).

#### 2. Nội dung quy trình

##### 2.1. Lấy mẫu

a) Máu: Tuỳ theo kỹ thuật xét nghiệm, cụ thể:

- Cấy máu: lấy máu tĩnh mạch 1-2ml trong thời kỳ bệnh nhân đang sốt, cho vào môi trường Ellinghausen- McCullough-Johnson-Harris (EMJH).

- Làm kỹ thuật huyết thanh học: lấy 1- 2ml máu tĩnh mạch (thời kỳ bệnh nhân đang sốt), sử dụng tuýp lấy máu có chất chống đông (heparin), chất huyết thanh. Cất ở  $-20^{\circ}\text{C}$  cho đến khi phân tích.

Lưu ý: Đối với kỹ thuật vi ngưng kết cần lấy máu 2 lần, mỗi lần 2 cách lần đầu 7 -10 ngày.

b) Dịch não tủy: 5 ml ống vô trùng.

c) Nước tiểu: lấy 5 ml vào ống vô trùng.

d) Phẫu tạng của súc vật (gan, thận).

Khử trùng mặt tế bào bằng cách để vào đó chuôi dao mổ nóng, sau đó dùng pipet Pasteur (vô trùng) đâm xuyên hút những mảnh nhỏ cấy vào môi trường.

Cắt những mảnh nhỏ phẫu tạng lấy vô trùng cấy vào tế bào.

##### 2.2. Bảo quản, vận chuyển mẫu

###### 2.2.1. Bảo quản (mẫu máu, huyết thanh)

Mẫu huyết thanh nếu xét nghiệm trong vòng 7 ngày phải bảo quản ở nhiệt độ  $4 - 8^{\circ}\text{C}$ . Nếu tiến hành xét nghiệm sau 7 ngày cần bảo quản ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$  hoặc lạnh hơn. Tuy nhiên mẫu không được tan đông quá 3 lần.

Các ống nghiệm lưu mẫu ở nhiệt độ âm sâu phải là các ống nghiệm chuyên dụng. Phải ghi rõ thông tin về mẫu trên ống nghiệm bằng loại mực không xóa được.

Các mẫu khi lưu phải có mã số, ghi chép trong sổ lưu mẫu theo qui định.

###### 2.2.2. Vận chuyển mẫu

###### a) Đóng gói mẫu

Tất cả các mẫu bệnh phẩm phải được đóng chặt nắp và xếp thẳng đứng trong giá đựng mẫu.

Khi vận chuyển giá đựng bệnh phẩm phải được để trong túi nilon dán kín, bên dưới có lót bông hoặc giấy mềm thấm nước, sau đó đặt vào hộp vận chuyển mẫu có khóa an toàn, nếu không có khóa an toàn cần dùng băng dính dán xung quanh, cố định giá vào hộp vận chuyển mẫu, chèn túi lạnh xung quanh đảm bảo nhiệt độ vận chuyển 4 - 8°C.

Dán hoặc in ký hiệu nguy hiểm sinh học bên ngoài hộp vận chuyển bệnh phẩm. Trường hợp không có nhãn nguy hiểm sinh học thì phải có ghi rõ mọi thông tin và số điện thoại liên hệ bên ngoài của hộp vận chuyển mẫu bệnh phẩm.

Không để danh sách mẫu vào trong hộp vận chuyển mẫu.

#### **b) Vận chuyển mẫu**

*Vận chuyển mẫu bệnh phẩm trong nước*

*\* Vận chuyển mẫu từ nơi thu thập đến phòng thí nghiệm tuyến địa phương*

- Cho mẫu bệnh phẩm vào trong hộp nhựa cứng có nắp xoáy chặt. Ống nghiệm đựng bệnh phẩm phải được bọc bằng giấy mềm trước khi cho vào hộp vận chuyển.

- Bệnh phẩm máu, nước tiểu, dịch não tủy, tổ chức: vận chuyển trong điều kiện nhiệt độ phòng hoặc 4 - 8°C nếu thời gian >1h.

Lưu ý: Đối với xét nghiệm cấy máu cần tiến hành ngay tại giường bệnh hoặc chuyển ngay lập tức tới phòng thí nghiệm ở nhiệt độ phòng.

*\* Vận chuyển đến phòng thí nghiệm tuyến trung ương:* phải đóng gói theo tiêu chuẩn sau:

- Đóng gói bệnh phẩm:

Mẫu bệnh phẩm được giữ trong ống nghiệm nhựa, có nắp xoáy kín. Nắp được bọc kín bằng giấy paraffin. Ghi thông tin của mẫu lên ống nghiệm.

Lớp 1: hộp nhựa có nắp xoáy kín, không thấm nước. Ống nghiệm bệnh phẩm được cuốn một lớp giấy thấm tẩm dung dịch sát khuẩn (cồn 70<sup>0</sup> hoặc dung dịch NaClO 10%) để trong hộp (lưu ý: nếu mẫu là dung dịch thì lượng dung dịch sát khuẩn tẩm và giấy thấm phải thấm đủ tương đương thể tích dung dịch của mẫu). Ghi thông tin lên nhãn của lớp 2.

Lớp 2: Hộp nhựa cứng, có nắp xoáy kín, không thấm nước. Lớp thứ 2 được bọc bằng bìa cát tông và đặt vào trong lòng hộp này.

Lớp 3: Hộp bìa cứng/ hoặc thùng nhựa, chứa đựng toàn bộ phần lớp 2. Ghi thông tin bệnh phẩm, người nhận, người gửi (và/hoặc người chịu trách nhiệm) lên nhãn. Phần chứa của lớp 3 có thể gồm các bình tích lạnh, đá hoặc đá CO<sub>2</sub> tùy theo loại mẫu, thời gian vận chuyển mẫu và nhiệt độ khi vận chuyển.

- Gửi bệnh phẩm: nếu sử dụng phương tiện ô tô: bàn giao mẫu và viết báo cáo. Trường hợp gửi theo bưu điện: tuân thủ các thủ tục yêu cầu của đơn vị chuyển hàng. Theo dõi thông tin và kiểm tra khi hàng đã đến nơi.

- Ghi chép, lưu trữ các báo cáo: hồ sơ gửi mẫu; báo cáo Ban lãnh đạo, Ban ATSH nếu có sự cố xảy ra.

*\* Vận chuyển mẫu trong khu vực phòng thí nghiệm*

Các mẫu bệnh phẩm phải được vận chuyển bằng giá hoặc khay, được để trong hộp inox hoặc hộp nhựa có nắp kín.



*\* Vận chuyển mẫu ra nước ngoài*

- Đóng gói bệnh phẩm:

Sử dụng hộp vận chuyển mẫu theo đúng tiêu chuẩn quốc tế: IATA, UN (hoặc theo yêu cầu của hàng vận chuyển).

Phân loại mẫu theo qui định vận chuyển quốc tế để lựa chọn phương tiện vận chuyển phù hợp (Dangerous Goods Regulations).

Mẫu bệnh phẩm được giữ trong túyp nhựa, có nắp xoáy kín. Nắp được cuốn bằng giấy paraffin. Ghi thông tin của mẫu lên ống nghiệm.

Lớp 1: hộp nhựa có nắp xoáy kín, không thấm nước. Ống nghiệm bệnh phẩm được cuốn một lớp giấy thấm tẩm dung dịch sát khuẩn (cồn 70<sup>0</sup> hoặc NaClO 10%) để trong hộp (lưu ý: nếu mẫu là dung dịch thì lượng dung dịch sát khuẩn tẩm vào giấy thấm phải thấm đủ tương đương thể tích dung dịch của mẫu). Ghi thông tin lên nhãn của lớp 2.

Lớp 2: hộp nhựa cứng, có nắp xoáy kín, không thấm nước. Lớp thứ 2 được bọc bằng giấy bìa cát tông và đặt vào trong lòng hộp này.

Lớp 3: hộp bìa cứng có lớp xốp lót hoặc thùng nhựa có lớp cách nhiệt (isothermal box) chứa đựng toàn bộ phần lớp 2. Ghi thông tin bệnh phẩm, người nhận, người gửi (và/hoặc người chịu trách nhiệm) lên nhãn. Phần chứa của lớp 3 có thể gồm các bình tích lạnh, đá hoặc đá CO<sub>2</sub> tùy theo loại mẫu, thời gian vận chuyển mẫu và nhiệt độ khi vận chuyển.

- Gửi bệnh phẩm:

Giấy xác nhận đồng ý vận chuyển mẫu của cơ quan có thẩm quyền như Bộ Y tế, Ban ATSH.

Tuân thủ các thủ tục yêu cầu của đơn vị chuyển hàng

Theo dõi kiểm tra thông tin khi hàng đến nơi

- Ghi chép, lưu trữ các báo cáo: hồ sơ gửi mẫu; báo cáo cơ quan chức năng như Bộ Y tế, Ban ATSH... nếu có sự cố xảy ra.

### **PHỤ LỤC 3**

#### **HƯỚNG DẪN CHẨN ĐOÁN TRONG PHÒNG XÉT NGHIỆM**

*(Kèm theo Quyết định số 559/QĐ-BYT ngày 19 tháng 12 năm 2017 của Bộ trưởng Bộ Y tế)  
(Áp dụng cho các phòng thí nghiệm tuyến Trung ương hoặc tương đương nếu có phòng thí nghiệm an toàn sinh học cấp II)*

##### **1. Các trang thiết bị cần thiết**

- Tủ an toàn sinh học nhóm 2 (BSC II);
- Tủ ấm: đặt nhiệt độ 28 - 30°C;
- Kính hiển vi nền đen;
- Môi trường EMJH đạt chất lượng;
- Hệ thống máy ELISA: máy rửa bản, máy đọc bản;
- Hệ thống PCR: máy luân nhiệt, máy điện di, máy chụp gel;
- Khay inox vận chuyển mẫu;
- Hộp đựng đồ sắc nhọn (inox);
- Túi đựng rác thải y tế, có nhãn hiệu an toàn sinh học;
- Phương tiện bảo hộ cá nhân;
- Dung dịch tiệt trùng vật liệu thải.

##### **2. Nội dung quy trình**

###### **2.1. Soi trực tiếp**

Lấy máu làm phiến đồ soi tươi trên kính hiển vi nền đen. Xoắn khuẩn vàng da không nhìn thấy ở kính hiển vi quang học có tụ quang thường, ở kính hiển vi nền đen thấy hình xoắn khuẩn sáng trắng.

###### **2.2. Nuôi cấy**

Xoắn khuẩn vàng da có trong máu những ngày đầu của bệnh. Sau 5 - 6 ngày thì ít hơn, sau 7- 8 ngày rất hiếm thấy. Ở nước não tủy và nước tiểu thường thấy xoắn khuẩn vàng da ở đầu tuần lễ thứ hai.

Phân lập từ máu (những ngày đầu của bệnh): phân lập bên giường bệnh, trước khi dùng kháng sinh. Lấy 2 ống có 5 ml môi trường EMJH, ống thứ nhất cho 2 giọt máu, ống còn lại cấy 4 giọt, ủ 28 - 30°C, theo dõi bằng quan sát dưới kính hiển vi nền đen 1 tuần/lần đến 6 tuần.

Phân lập từ nước tiểu (sau 10 ngày sau khởi bệnh): lấy 5 ml nước tiểu, phân lập trong vòng 2 giờ, pha loãng nước tiểu trong PBS theo các nồng độ 1: 10, 1: 20, 1:40, 1: 80. Hút 0,5 ml nước tiểu từng độ pha loãng cho vào ống có 5ml EMJH, theo dõi như phần cấy máu.

Phân lập từ dịch não tủy (5-10 ngày sau khởi bệnh): lấy 0,5ml dịch não tủy cấy vào ống có 5 ml môi trường EMJH, theo dõi như phần cấy máu.

###### **2.3. Phát hiện kháng thể đặc hiệu kháng xoắn khuẩn vàng da bằng phản ứng vi ngưng kết tan (Microscopic Agglutination Test)**

Lấy máu bệnh nhân (đã sốt trên 1 tuần). Lấy máu 2 lần (cách nhau 1-2 tuần). Tuần tự tiến hành các bước sau:

- Các chủng vi khuẩn sống, chứa  $2-4 \times 10^8$  vi khuẩn/ml được nuôi cấy từ 4 đến 8 ngày trong môi trường thích hợp ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ . Để tiến hành xét nghiệm, nên đánh giá số lượng vi khuẩn bằng quan sát dưới kính hiển vi nền đen.

- Phía bên trái của tấm phiên từ A-H: được đánh dấu tên của các chủng vi khuẩn.

Cột đầu tiên là chứng âm (chỉ có PBS và kháng nguyên), được đánh viết là "C". Các cột tiếp theo, từ cột thứ 2 đến cột thứ 12 là huyết thanh pha loãng.

- Huyết thanh và pha loãng kháng nguyên

Huyết thanh nên được bất hoạt ở  $56^\circ\text{C}$  trong 30 phút trước khi tiến hành xét nghiệm.

Huyết thanh của người được pha loãng 1/25, của động vật là 1/10 trong PBS (phụ thuộc vào số lượng chủng vi khuẩn hiện có, để tính lượng huyết thanh cần pha loãng).

Nhỏ 50 $\mu\text{l}$  PBS vào các giếng của hàng đầu tiên của phiên, số giếng bằng số lượng kháng nguyên. Hàng này là chứng âm.

Nhỏ 50 $\mu\text{l}$  PBS vào các giếng từ cột thứ 3 đến cột thứ 12.

Nhỏ 100 $\mu\text{l}$  huyết thanh đã pha loãng vào cột thứ 2.

Dùng pipet chuyển 50 $\mu\text{l}$  đã pha loãng ở cột thứ 2 lần lượt pha loãng đến cột thứ 12, bỏ 50 $\mu\text{l}$  ở cột thứ 12 đi.

Mỗi 1 hàng tương ứng với 1 loại kháng nguyên. Mỗi 1 giếng cần có 50 $\mu\text{l}$  kháng nguyên đã pha loãng. Kháng nguyên được pha loãng với tỷ lệ 1:2 với PBS. Mỗi hàng có 12 giếng, như vậy ta cần có 600 $\mu\text{l}$  kháng nguyên được pha loãng.

Phủ tấm nhựa lên phiên kính, ủ trong vòng 2 giờ ở nhiệt độ  $28^\circ\text{C}$  có lắc nhẹ (Nếu không đọc kết quả trong ngày thì có thể ủ phiên nhựa ở nhiệt độ  $4^\circ\text{C}$  qua đêm).

Nhỏ 1 giọt hỗn hợp kháng nguyên và huyết thanh đã ủ lên lam kính và đặt la men lên, đồng thời cũng nhỏ giọt kháng nguyên (chứng âm) để so sánh, quan sát dưới kính hiển vi nền đen để đọc kết quả

**Đọc kết quả dương tính:** Ngưng kết  $\geq 50\%$  là dương tính

Có thể đọc kết quả bằng quan sát vi khuẩn *Leptospira* tự do di động trên vi trường. Nếu không thấy có vi khuẩn *Leptospira* tự do di động trên vi trường, như vậy có nghĩa là đã có sự ngưng kết hoàn toàn.

Tuy nhiên để đánh giá cho dễ cần so sánh với chứng âm như sau:

- Tỷ lệ vi khuẩn *Leptospira* tự do di động giữa 50 - 100% thì kết quả là âm tính.

- Tỷ lệ vi khuẩn *Leptospira* tự do di động ít hơn 50% thì kết quả là dương tính.



**Một số lưu ý:**

- Thu thập mẫu theo đúng tiêu chuẩn.
- Để sau 30 phút khi máu được lấy (để đứng), sau đó mới ly tâm (5.000 vòng trong 10 phút) để tách huyết thanh.
- Huyết thanh khi đã bắt hoạt ở 56°C trong 30 phút, nếu không làm xét nghiệm ngay thì để huyết thanh đã bắt hoạt xuống bằng nhiệt độ phòng, sau đó mới cất ở tủ - 20°C.
- Khi chuẩn bị kháng nguyên, nếu số lượng vi khuẩn  $<10^8$  vi khuẩn/ml thì không cần pha loãng.
- Các vật liệu dùng cho xét nghiệm cần phải được vô trùng.
- PBS nên bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh (4 - 8°C).

**2.4. Kỹ thuật miễn dịch hấp phụ gắn men (ELISA - Enzyme - Linked Immunosorbent Assay)**

Kỹ thuật ELISA dựa trên cơ sở liên kết đồng hoá trị của phức hợp enzyme và kháng thể mà trong mỗi liên kết này là sự xúc tác và các hoạt tính miễn dịch luôn được duy trì. Kháng thể gắn với kháng nguyên được trình diện và phức hợp này được đo bởi sự chuyển màu của cơ chất.

Tiến hành làm ELISA theo thường quy của bộ sinh phẩm chẩn đoán xoắn khuẩn vàng da IgM (IgG).

- Pha loãng huyết thanh bước 1 theo tỷ lệ 1:40 (10 µl huyết thanh cần thử và 390 µl dd pha loãng 1).
- Tiếp tục pha loãng huyết thanh tỷ lệ 25:1 trong dung dịch pha loãng 2.

Chú ý: Chứng âm và dương (có sẵn) chỉ pha loãng với dung dịch pha loãng 2.

- Chuyển 140 µl huyết thanh đã pha loãng bước 2 vào từng lỗ của bản đã phủ kháng nguyên. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.
- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa bản. Để khô, tránh bọt ở đáy lỗ.
- Nhỏ 100µl chất cộng hợp men vào từng lỗ. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.
- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa bản. Để khô, tránh có bọt ở đáy lỗ.
- Nhỏ 100µl dung dịch Chromogen (tetramethybenzidine hay TMB) vào từng lỗ. Ủ ở nhiệt độ phòng/5 phút.
- Nhỏ 100µl dung dịch dừng phản ứng và lắc nhẹ bằng tay.
- Đọc kết quả bằng máy ELISA tại bước sóng 450 và 620 nm, trong vòng 30 phút đến 1 giờ: Chứng dương  $\geq 0,5$ ;  $0,0 < \text{Chứng âm} < 0,3$ .

**2.5. Phương pháp sinh học phân tử**

Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) là phương pháp khuếch đại gen được dùng để phát hiện ADN của vi khuẩn trong mẫu bệnh phẩm.

- Bệnh phẩm: 10ml nước tiểu đựng trong tuýp vô trùng hoặc mẫu tổ chức.

- Tách chiết ADN:

*Mẫu nước tiểu, máu*

+ Ly tâm với tốc độ 1.000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút.

+ Hút phần nổi, tiếp tục ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút.

+ Lấy phần cặn tiếp tục tách ADN theo thường qui của bộ kit tách chiết DNeasy Blood & Tissue kit (QIA)

*Mẫu tổ chức:* thực hiện theo hướng dẫn của bộ kit tách chiết ADN từ mô (tissue) (QIAamp DNA kit)

- Tiến hành PCR: Dung tích cho phản ứng là 25 µl gồm các thành phần:

Thành phần	Thể tích cho 1 phản ứng (µl)
H <sub>2</sub> O	10,3
Master mix	12,5
<i>flaB</i> (F1) 20 pmol	0,6
<i>flaB</i> 2 (R1) 20 pmol	0,6
ADN	1
Tổng thể tích	25

Chứng âm: nước tinh sạch

Chứng dương: L006

Chạy hỗn hợp PCR theo chu trình sau

99°C/ 40 giây	1 chu kỳ
94°C/ 20 giây 50°C/ 30 giây 72°C/ 60 giây	30 chu kỳ
72°C/ 6 phút	1 chu kỳ

Các sản phẩm PCR thu được cất ở 4°C cho đến khi phân tích.

Phân tích sản phẩm PCR bằng điện di trên thạch agarose, 1,5% agarose với 0,5X đệm TAE (Tris Acetate - EDTA). Nhỏ SYBR Safe DNA Gel Stain (theo tỷ lệ 5 µl trong 100 ml thạch) vào thạch được đun sôi cho tan, xuống nhiệt độ khoảng 60°C.

Trộn 8  $\mu$ l sản phẩm PCR với 2  $\mu$ l dd bromophenol blue.

Nhỏ thang chuẩn (marker) 4  $\mu$ l vào lỗ đầu tiên của bản gel, sau đó cho 10  $\mu$ l sản phẩm PCR đã trộn vào các lỗ tiếp theo trên bản thạch.

Chạy điện di: 100V/45 phút

Quan sát và chụp ảnh bằng đèn đọc UV trên máy GelDoc: Gen *flaB* có trọng lượng 793 bp.

*Đọc kết quả*

- Bệnh phẩm có kết quả PCR dương tính nếu có vạch đặc hiệu tương ứng với vạch của ống chứng dương. Kết luận: Có vi khuẩn *Leptospira* gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm.

- Bệnh phẩm có kết quả PCR âm tính nếu không có vạch đặc hiệu tương ứng với vạch đặc hiệu của ống chứng dương. Kết luận: Không tìm thấy vi khuẩn *Leptospira* gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm.

Lưu ý: Tùy điều kiện phòng thí nghiệm để quyết định thực hiện phương pháp chẩn đoán:

- Phòng thí nghiệm tuyến cơ sở:

+ Huyết thanh học chẩn đoán: miễn dịch hấp phụ men (ELISA), hoặc test nhanh.

+ PCR (nếu có hệ thống máy).

- Phòng thí nghiệm tuyến trung ương/thành phố (có bộ chủng giống):

+ Soi trực tiếp.

+ Huyết thanh học: ELISA, MAT.

+ Sinh học phân tử: PCR.