

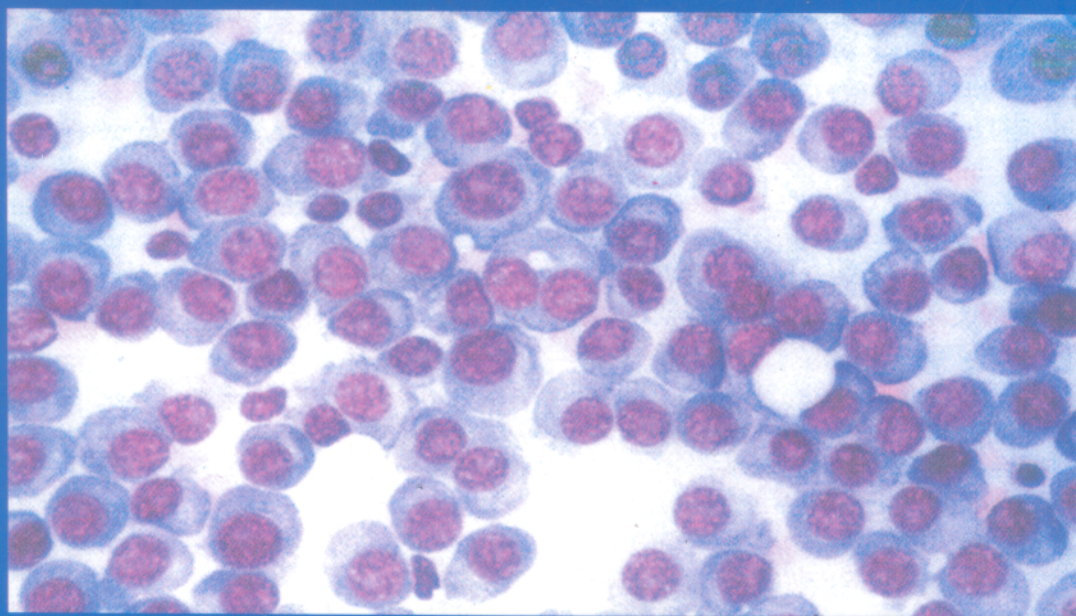
VIỆN HUYẾT HỌC - TRUYỀN MÁU TRUNG ƯƠNG

Chủ biên: GS.TSKH. Đỗ Trung Phần

KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM

HUYẾT HỌC VÀ TRUYỀN MÁU

ỨNG DỤNG TRONG LÂM SÀNG



NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

VIỆN HUYẾT HỌC - TRUYỀN MÁU TRUNG ƯƠNG

Chủ biên: GS. TSKH. Đỗ Trung Phần

KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM

**HUYẾT HỌC VÀ TRUYỀN MÁU
ỨNG DỤNG TRONG LÂM SÀNG**

(Tái bản lần thứ nhất có sửa chữa và bổ sung)

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

HÀ NỘI - 2009

Chủ biên

GS.TSKH. ĐỖ TRUNG PHẤN

Tham gia biên soạn

TS. BÙI THỊ MAI AN

TS. TRƯƠNG CÔNG DUẨN

ThS. PHẠM TUẤN DƯƠNG

ThS. NGUYỄN THỊ Y LĂNG

TS. NGUYỄN THỊ NỮ

GS. TSKH. ĐỖ TRUNG PHẤN

PGS.TS. THÁI QUÝ

BSCCKII. TRẦN THỊ HỒNG THỦY

BSCCKII. ĐỖ MẠNH TUẤN

BSCCKI. NGUYỄN CHÍ TUYẾN

PGS.TS. CUNG THỊ TÝ

TS. NGUYỄN TRIỆU VÂN

PGS.TS. PHẠM QUANG VINH

Thư ký biên soạn

TS. NGUYỄN TRIỆU VÂN

PGS. TS. PHẠM QUANG VINH

LỜI NÓI ĐẦU

Trong 10 năm gần đây, được sự quan tâm của Bộ Y tế về sự phát triển khoa học kỹ thuật, chương trình kỹ thuật cao đã hỗ trợ cho sự phát triển của nhiều chuyên ngành, do đó chất lượng chẩn đoán và điều trị bệnh được nâng lên rõ rệt.

Cùng với sự phát triển chung đó, ngành Huyết học - Truyền máu có nhiều đổi mới về trang thiết bị và kỹ thuật, chất lượng chẩn đoán và điều trị bệnh máu, cũng như an toàn truyền máu và sử dụng máu đã có bước phát triển đáng kể góp phần không nhỏ vào sự nghiệp chăm sóc sức khỏe nhân dân. Để tiếp tục hỗ trợ cho công tác đào tạo của các Trường Đại học và Trung học y tế, hỗ trợ cho các thầy thuốc làm điều trị hiểu rõ hơn các trang bị, kỹ thuật mới và sử dụng tốt hơn các kết quả xét nghiệm về Huyết học - Truyền máu, chúng tôi biên soạn cuốn sách "Kỹ thuật xét nghiệm Huyết học và Truyền máu ứng dụng trong lâm sàng", do các giáo sư, tiến sĩ, thạc sĩ, bác sĩ lâu năm có kinh nghiệm thuộc chuyên ngành Huyết học - Truyền máu biên soạn. Cuốn sách bao gồm 10 chương:

Chương 1: Tế bào - Tổ chức học cơ quan tạo máu

Chương 2: Đông máu - Cầm máu

Chương 3: Di truyền huyết học

Chương 4: Sinh hoá huyết học

Chương 5: Miễn dịch huyết học

Chương 6: An toàn truyền máu

Chương 7: Sản xuất, bảo quản và phân phối máu các sản phẩm máu, sử dụng máu ở các bệnh viện.

Chương 8: Một số vấn đề cơ bản trong xét nghiệm Huyết học - Truyền máu

Chương 9: Đảm bảo chất lượng xét nghiệm huyết học và truyền máu.

Chương 10: Các giá trị sinh học về huyết học và miễn dịch huyết học.

Tái bản lần này chúng tôi có sửa chữa và bổ sung một số vấn đề và kỹ thuật cập nhật.

Hy vọng cuốn sách tái bản kỳ này sẽ làm hài lòng các cán bộ, kỹ thuật viên Huyết học - Truyền máu, các thầy thuốc làm công tác đào tạo ở các Trường Đại học và Trung học y tế cũng như các bác sĩ điều trị ở tất cả các bệnh viện trong toàn quốc. Tuy nhiên, trong quá trình biên soạn không tránh khỏi còn thiếu sót. Rất mong được bạn đọc góp ý.

Xin trân trọng cảm ơn

THAY MẶT TẬP THỂ BIÊN SOẠN

Chủ biên

GS.TSKH. ĐỖ TRUNG PHẤN

MỤC LỤC

<i>Lời nói đầu</i>	3
Chương 1: TẾ BÀO - TỔ CHỨC HỌC CƠ QUAN TẠO MÁU	
<i>TS. Trương Công Duẩn: BSCK II. Trần Thị Hồng Thuỷ</i>	
Cách lấy và bảo quản bệnh phẩm xét nghiệm tế bào	9
Phương pháp làm tiêu bản xét nghiệm	11
Đếm số lượng hồng cầu	14
Đếm số lượng bạch cầu	16
Đếm số lượng tiểu cầu	18
Đếm hồng cầu lưới	20
Định lượng huyết sắc tố	21
Đo thể tích khối hồng cầu	23
Đo tốc độ máu lắng	24
Công thức bạch cầu	25
Kỹ thuật tập trung bạch cầu	27
Máy đếm tế bào. Nguyên tắc hoạt động và phương pháp sử dụng	28
Huyết đồ	33
Tuỷ đồ	34
Hoá học tế bào	37
Sinh thiết tuỷ xương	44
Hạch đồ	49
Sinh thiết hạch	50
Lách đồ	51
Xét nghiệm tìm tế bào Hargrave	52
Tìm ký sinh trùng sốt rét	53
Tìm ấu trùng giun chỉ	58
Xét nghiệm tế bào trong dịch não tủy	59
Xét nghiệm tế bào trong dịch màng phổi	61
Xét nghiệm tế bào trong dịch màng bụng	62
Xét nghiệm tế bào trong dịch khớp và bao khớp	63
Xét nghiệm tế bào trong nước tiểu	64
Xét nghiệm cận Addis	67

Chương 2: ĐÔNG MÁU - CẢM MÁU

PGS. TS. Cung Thị Tý; TS. Nguyễn Thị Nữ

Nguyên tắc lấy bệnh phẩm xét nghiệm đông máu	70
Dấu hiệu dây thắt	71
Thời gian máu chảy	72
Thời gian máu đông	73
Co cục máu	75
Thời gian Howell (Phục hồi calci)	76
Thời gian prothrombin (PT, Quick)	77
Thời gian thromboplastin từng phần hoạt hoá (APTT - Cephalin - Kaolin)	79
Thời gian thrombin (TT)	80
Nghiệm pháp Von-Kaulla (Thời gian tiêu sợi huyết)	81
Thời gian tiêu Euglobulin huyết tương	83
Nghiệm pháp Ethanol hoặc protaminsulphat để phát hiện fibrin monomer	84
Phương pháp xác định fibrinogen	85
Định lượng các yếu tố dựa trên cơ sở xét nghiệm thời gian prothrombin	87
Định lượng các yếu tố dựa trên cơ sở thời gian thromboplastin từng phần	89
Định lượng yếu tố XIII	91
Định lượng sản phẩm thoái hóa fibrinogen và fibrin	92
Hoạt tính yếu tố 3 tiểu cầu	96
Xét nghiệm đo độ ngưng tập tiểu cầu	97
Xét nghiệm xác định sự có mặt của các chất kháng đông lưu hành	99
Xét nghiệm các yếu tố kháng đông máu (anti – coagulation): protein C, protein S, antithrombin III.	101

Chương 3: DI TRUYỀN HUYẾT HỌC

PGS.TS. Phạm Quang Vinh

Cấy máu ngoại vi phân tích nhiễm sắc thể	103
Làm tiêu bản và phân tích nhiễm sắc thể tế bào tủy xương	106
Cách mô tả công thức nhiễm sắc thể	108
Các kỹ thuật nhuộm nhiễm sắc thể	110
Nhuộm phân biệt nhiễm sắc tử chị em	119
Xét nghiệm vật thể Barr	121
Kỹ thuật sinh học phân tử ứng dụng trong y học	123
• Kỹ thuật tách chiết ADN	123
• Kỹ thuật thấm ADN và lai với mẫu "dò"	127
• Kỹ thuật PCR (Polymerase chain reaction)	132

Chương 4: SINH HOÁ HUYẾT HỌC

BSCK I. Nguyễn Chí Tuyển

Sắt huyết thanh	136
Ferritin huyết thanh	138
Sức bền hồng cầu	140
Điện di huyết sắc tố	141
Huyết sắc tố kháng kiềm	143
Định lượng methemoglobin reductase	145
Xét nghiệm sự thiếu hụt men G6PD hồng cầu bằng phương pháp soi đèn tử ngoại	148
Định lượng men G6PD trong dung dịch hồng cầu bằng phương pháp quang phổ	149
Định lượng haptoglobin trong huyết thanh	151

Chương 5: MIỄN DỊCH HUYẾT HỌC

TS. Nguyễn Triệu Vân; GS.TSKH. Đỗ Trung Phần

Một số khái niệm cơ bản về kỹ thuật miễn dịch ứng dụng trong	
Huyết học - Truyền máu	155
Kỹ thuật miễn cảm động vật	158
Kỹ thuật phân lập tế bào miễn dịch	170
Kỹ thuật kết tủa	179
Kỹ thuật ngưng kết	197
Kỹ thuật đo hoạt tính bổ thể	206
Kỹ thuật phát hiện kháng thể kháng nhân	208
Kỹ thuật điện di miễn dịch	212
Kỹ thuật xác định kháng nguyên biệt hoá trên bề mặt tế bào máu	213
Kỹ thuật chuyển dạng lympho	218
Kỹ thuật gây độc bạch cầu trong ống nghiệm	220
Kỹ thuật tìm kháng thể kháng tiểu cầu	221
Kỹ thuật định nhóm kháng nguyên bạch cầu (HLA)	225
Kỹ thuật cấy cụm tế bào (Colony forming culture)	228
Phương pháp tạo quần thể huyết phát hiện tế bào lách sản xuất kháng thể	230
Kỹ thuật thực bào (Phagocytosis)	232

Chương 6: AN TOÀN TRUYỀN MÁU

PGS. TS. Thái Quý; BSCK II. Đỗ Mạnh Tuấn; TS. Bùi Thị Mai An;

ThS. Nguyễn Thị Y Lăng; GS. TSKH. Đỗ Trung Phấn

Vận động hiến máu nhân đạo	235
Tuyển chọn người cho máu	238
Kỹ thuật thu gom máu	243
Kỹ thuật sàng lọc các bệnh nhiễm trùng truyền qua đường truyền máu	249
Kỹ thuật định nhóm máu ABO và phát máu an toàn	269
Kỹ thuật định nhóm máu hệ Rh	277
Kỹ thuật định nhóm máu các hệ khác	281
Phản ứng chéo (phản ứng hoà hợp)	282
Phương pháp hiệu giá kháng thể miễn dịch	283
Phương pháp tách kháng nguyên	286

Chương 7: SẢN XUẤT, BẢO QUẢN VÀ PHÂN PHỐI MÁU, CÁC SẢN PHẨM MÁU

ThS. Phạm Tuấn Dương; ThS. Nguyễn Thị Y Lăng; GS. TSKH. Đỗ Trung Phấn

Cách sản xuất hồng cầu mẫu và bảo quản	288
Kỹ thuật điều chế khối hồng cầu	289
Kỹ thuật điều chế khối hồng cầu nghèo bạch cầu	291
Kỹ thuật điều chế khối hồng cầu rửa	294
Kỹ thuật điều chế khối tiểu cầu	296
Kỹ thuật điều chế huyết tương	300
Kỹ thuật điều chế tủa lạnh giàu yếu tố VIII	301
Kỹ thuật lưu trữ, bảo quản và phân phối máu	303

Chương 8: MỘT SỐ VẤN ĐỀ CƠ BẢN TRONG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC - TRUYỀN MÁU

BSCK II. Trần Thị Hồng Thuỷ

Phương pháp làm sạch và khử trùng dụng cụ làm xét nghiệm	309
Pha các hoá chất, dung dịch sử dụng trong xét nghiệm huyết học	311
Cách sử dụng và bảo quản kính hiển vi	315

Chương 9: ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC VÀ TRUYỀN MÁU

PGS. TS. Phạm Quang Vinh

321

Chương 10: CÁC GIÁ TRỊ SINH HỌC VỀ HUYẾT HỌC VÀ MIỄN DỊCH HUYẾT HỌC

GS. TSKH. Đỗ Trung Phấn và CS

329

Tài liệu tham khảo

343

Chương 1

TẾ BÀO - TỔ CHỨC HỌC CƠ QUAN TẠO MÁU

CÁCH LẤY VÀ BẢO QUẢN BỆNH PHẨM XÉT NGHIỆM TẾ BÀO

Xét nghiệm huyết học ngày càng được sử dụng nhiều ở các cơ sở y tế nhằm góp phần tích cực vào việc chẩn đoán, điều trị, nghiên cứu khoa học cũng như chăm sóc sức khỏe ban đầu. Việc chuẩn hoá các kỹ thuật xét nghiệm là cần thiết. Trong đó việc lấy và bảo quản bệnh phẩm là hết sức quan trọng. Xét nghiệm huyết học gồm xét nghiệm tế bào, xét nghiệm đông - cầm máu, xét nghiệm miễn dịch và xét nghiệm di truyền. Bệnh phẩm xét nghiệm tế bào có thể là máu, nước tiểu và các dịch: não tủy, màng phổi, màng tim, màng bụng, khớp... để các xét nghiệm này có kết quả và có giá trị cho chẩn đoán, lấy mẫu bệnh phẩm xét nghiệm chiếm 50% kết quả xét nghiệm. Vì vậy phải có một số nguyên tắc mà người lấy bệnh phẩm phải tuyệt đối tuân thủ:

- Đúng tên bệnh nhân
- Lấy bệnh phẩm đúng quy cách
- Thực hiện đúng quy trình bảo quản và vận chuyển

1. Máu

1.1. Tên xét nghiệm

Tên xét nghiệm	Viết tắt
1. Số lượng hồng cầu, bạch cầu, công thức bạch cầu gọi chung là công thức máu	CTM
2. Số lượng tiểu cầu	TC
3. Thể tích khối hồng cầu hay hematocrit	Hct
4. Lượng huyết sắc tố hay hemoglobin	Hb
5. Tốc độ máu lắng	ML
6. Kỳ sinh trùng sốt rét	KSTSR
7. Hồng cầu lưới	HC lưới
8. Huyết đồ (gồm đặc điểm hình thái và số lượng của hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu; thể tích khối HC, huyết sắc tố, hồng cầu lưới, công thức bạch cầu).	HD
9. Tập trung bạch cầu	TTBC
10. Tế bào Hargraves	

Các loại xét nghiệm từ 1 đến 8 có thể lấy máu vào cùng một ống chống đông khô, thể tích = 1ml.

Xét nghiệm tập trung bạch cầu lấy vào ba ống chống đông khô có sẵn, mỗi ống = 1ml máu.

Xét nghiệm tế bào Hargraves lấy 3ml vào ống chống đông = Heparin

Máu đã được chống đông, nếu mùa hè (nhiệt độ trên 30°C) có thể để ống máu đã nút kín vào ngăn mát của tủ lạnh nhưng cũng phải được xét nghiệm trong vòng 6 giờ kể từ khi lấy máu, nếu quá thời gian đó, tính chất lý hoá của máu thay đổi làm ảnh hưởng tới kết quả xét nghiệm.

1.2. Phương pháp lấy máu

1.2.1. Trước khi lấy máu

Đối chiếu giấy xét nghiệm với họ tên, tuổi, số giường, căn bệnh của bệnh nhân.

Thường lấy máu vào buổi sáng, bệnh nhân chưa ăn gì và cơ thể nghỉ ngơi thoải mái.

a. Máu mao mạch: Chủ yếu được thực hiện tại labô hoặc do không lấy được máu tĩnh mạch (Hiện nay ít dùng vì đếm bằng máy).

– Dụng cụ: bông, cồn sát trùng 70°, kim chích, dụng cụ lấy máu xét nghiệm.

– Tiến hành: sát khuẩn đầu ngón tay đeo nhẫn (ở người lớn), ở ngón chân cái hoặc gót chân (ở trẻ nhỏ). Dùng kim chích sâu đúng cỡ kim có sẵn cho máu chảy tự nhiên. Không lấy máu ở nơi bị phù nề, có u hoặc những nơi nghi tắc mạch. Tránh nặn bóp nhiều.

b. Máu tĩnh mạch: chủ yếu do y tá bệnh phòng lấy.

– Dụng cụ: bông, cồn sát trùng 70°, garô, kim lấy máu, ống nghiệm đã có sẵn chất chống đông khô, có nút.

– Tiến hành: Ga rô phía trên vị trí định chọc.

Sát khuẩn vị trí định chọc.

Chích kim vào tĩnh mạch hút máu ra.

Rút kim và mở garô.

Ép bông vào vị trí chọc.

– Nơi lấy máu thường là tĩnh mạch khuỷu tay, mu bàn tay, khi cần có thể lấy ở tĩnh mạch bẹn hoặc bẹn lộ tĩnh mạch. Trẻ em có thể lấy ở tĩnh mạch cổ hoặc đầu.

– Máu lấy vào ống chống đông phải được lắc nhẹ, trộn đều và nút kín.

1.2.2. Sau khi lấy máu: ghi lên nhãn ống máu họ tên, tuổi, số giường, phòng bệnh đúng như trên giấy xét nghiệm của bệnh nhân.

Chú ý:

– Không lấy máu quá lâu, máu dễ bị đông đặc.

– Tùy số lượng máu cần dùng mà chọn ống nghiệm phù hợp.

– Máu lắc trộn ít, không đều dễ gây đông.

– Máu lấy đạt yêu cầu là: máu lấy đủ số lượng, không đông, không vỡ hồng cầu.

2. Nước dịch

Gồm nước tiểu, nước não tủy, dịch màng tim, màng phổi, màng bụng, dịch khớp, dịch kyste phổi, thận...

Ống đựng bệnh phẩm phải khô sạch, bệnh phẩm phải được xét nghiệm trong vòng 6 giờ kể từ khi lấy.

- *Cận Addis*

Buổi sáng bệnh nhân đi tiểu hết.

Sau đó uống 300ml nước sôi để nguội, nằm nghỉ. Trong 3 giờ, đi tiểu bình thường vào một cái xô sạch và đo được bao nhiêu mililit thì ghi vào giấy xét nghiệm. Lắc đều toàn bộ nước tiểu và lấy 10ml đem đến phòng xét nghiệm.

- *Một số nguyên tắc:* Ngoài các yêu cầu chung cho bệnh nhân thì việc lấy và bảo quản bệnh phẩm xét nghiệm tế bào cần thực hiện một số yêu cầu sau:

- Không làm thay đổi mật độ tế bào.
- Giữ được tính nguyên vẹn của tế bào.

Để đạt được những yêu cầu trên, cần lưu ý:

- Dụng cụ (ống nghiệm) phải khô, sạch.
- Nếu dùng chất chống đông, phải là chất chống đông khô.
- Lấy máu đúng thời điểm (thường lấy vào buổi sáng trước khi ăn).
- Lấy đúng số lượng (theo tỷ lệ chống đông).
- Ống nghiệm phải được đậy nút, để nhiệt độ phòng xét nghiệm.
- Thời gian từ lúc lấy mẫu đến khi làm xét nghiệm không quá 6 giờ.
- Nếu cần vận chuyển mẫu, phải nhẹ nhàng tránh làm vỡ tế bào.

PHƯƠNG PHÁP LÀM TIÊU BẢN XÉT NGHIỆM

1. Làm tiêu bản máu ngoại vi

1.1. Tiêu bản máu dàn

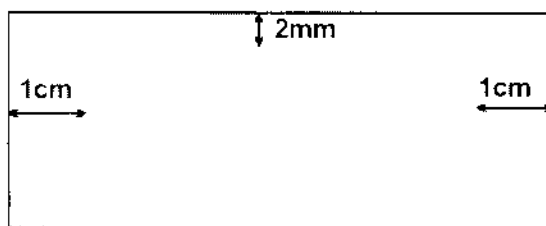
Nhỏ một giọt máu cách đầu lam kính 1cm, lam này được giữ ngang bằng một tay. Tay kia cầm lam kéo, nghiêng 45° , tiếp xúc cạnh gần vào giọt máu để cho máu lan toả theo cạnh này, khi giọt máu đã được chia đều, đẩy nhanh và đều lam kéo theo chiều dài của lam nằm ngang.

Để khô tự nhiên trong phòng xét nghiệm (khô và mát), đánh dấu tiêu bản bằng bút chì.

Tiêu bản tốt là tiêu bản máu được dàn đều, không mỏng quá, không dày quá, cách hai đầu lam kính khoảng 1cm, phần đuôi tạo thành hình “lưỡi mèo”. (Hình 1.1).

Yêu cầu:

- Tiêu bản phải sạch.
- Không được kéo hai lần trên cùng một giọt máu.



Hình 1.1: Tiêu bản máu đàn

1.2. Tiêu bản giọt đặc

Nhỏ hai giọt máu lên hai đầu của một lam kính. Dùng que thủy tinh hoặc góc của một lam kính khác di nhẹ lên giọt máu theo vòng tròn đồng tâm từ trong ra ngoài, đến khi đường kính giọt máu khoảng 1 - 1,5 cm. Để khô tự nhiên trên một mặt phẳng ngang. Đánh dấu tiêu bản, nhuộm ngay, không cần cố định.

1.3. Tiêu bản soi tươi

Nhỏ một giọt máu lên giữa lam kính. Dùng một lamén (lá kính) mỏng đặt lên giọt máu, để máu tràn ra khắp lamén. Đưa lên kính hiển vi soi ngay.

Thường dùng để quan sát ấu trùng giun chỉ còn cử động hoặc hiện tượng hồng cầu chuỗi tiền.

2. Làm tiêu bản dịch tủy xương

Nhỏ 0,2 - 0,3 ml dịch hút tủy xương đã được trộn đều lên một lam kính khô và sạch. Làm 6 - 10 tiêu bản giống như tiêu bản “máu đàn”. Để khô tự nhiên, cố định, nhuộm Giemsa hai thì.

Trong trường hợp cần thiết có thể làm thêm tiêu bản áp: để dịch tủy lắng trên lam kính 2 - 3 phút, nghiêng lam kính nhẹ nhàng và dùng một miếng bông thấm ở mép thấp, lấy cạn còn lại. Áp nhẹ lam kính sạch lên cạn dịch tủy xương, để khô tự nhiên, cố định, nhuộm Giemsa hai thì.

3. Làm tiêu bản nước dịch

Dịch lỏng (màng bụng, màng tim, màng phổi, não tủy,...) được để lắng tự nhiên hoặc ly tâm nhẹ (1000 vòng/phút trong 10 phút), lấy cạn nhỏ một giọt lên lam kính sạch. Dùng que thủy tinh đầu nhọn dẹt di giọt bệnh phẩm theo hình tròn đồng tâm, đường kính 2,0 - 2,5 cm. Để khô tự nhiên, cố định, nhuộm Giemsa một thì.

Lưu ý: Tùy theo độ dày của tiêu bản để đặt thời gian nhuộm nhưng bao giờ cũng ngắn hơn thời gian nhuộm một tiêu bản máu đàn. Rửa tiêu bản phải hết sức nhẹ nhàng để tránh bị trôi bệnh phẩm.

Trong một số trường hợp, dịch đặc và quánh cần được làm tiêu bản càng sớm càng tốt sau khi lấy ra khỏi cơ thể. Dùng tăm bông lấy chất dịch cho lên lam kính. Dùng lam kéo dần tiêu bản như làm tiêu bản máu dần hoặc dùng tăm bông di nhẹ như làm tiêu bản giọt đặc. Để khô, đánh dấu, cố định và nhuộm.

4. Làm tiêu bản mô

4.1. Tiêu bản tuỷ xương (phương pháp paraffin)

4.1.1. Xử lý mảnh sinh thiết

Cố định trong dung dịch Helly:	5-6 giờ
Rửa dưới vòi nước chảy:	1 giờ
Khử calci bằng dung dịch Custer:	12 giờ
Rửa dưới vòi nước chảy:	1 giờ
Loại nước bằng cồn: Cồn 90°	30 phút
Cồn tuyệt đối I	1 giờ
Cồn tuyệt đối II	1 giờ
Cồn tuyệt đối III	3 giờ
Loại cồn bằng xylen: Xylen I	30 phút
Xylen II	90 phút
Xylen III	90 phút
Vùi trong paraffin ở 60°C	12 giờ
Đúc khuôn.	
Cắt tiêu bản chiều dày 2-2,5µm.	

4.1.2. Nhuộm H&E

- Tẩy nền bằng xylen 3 lần: 5 phút 1 lần
- Chuyển qua cồn 100°, 95°, 80°: 5 phút 1 lần
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Phủ tiêu bản bằng dung dịch lugol: 10 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Phủ tiêu bản bằng dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$: 5 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Nhuộm trong dung dịch Hemalun de Mayer (hoặc hematoxylin): 3-5 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Nhúng tiêu bản trong dung dịch cồn-HCl 1%: vài giây
- Phủ tiêu bản bằng dung dịch Na_2CO_3 1%: 1 phút

- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Nhuộm trong dung dịch erythrocine B (hoặc eosin) 1%: 1 phút
- Rửa nhanh trong nước
- Tẩy tiêu bản bằng cồn tuyệt đối, làm trong bằng xylene, gắn lamina (lá kính)

4.2. Tiêu bản mô mềm (Lách, hạch,...)

Các bước xử lý bệnh phẩm sinh thiết giống như đối với tiêu bản tuỷ xương. Cố định bệnh phẩm bằng formol 10% trong 24-48 giờ tuỳ kích thước bệnh phẩm, không cần khử calci cho những bệnh phẩm này. Quy trình nhuộm H&E như sau:

- Tẩy nến bằng xylene 3 lần: 5 phút 1 lần
- Chuyển qua cồn 100°, 95°, 80°: 5 phút 1 lần
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Nhuộm trong dung dịch Hemalum de Mayer (hoặc hematoxylin): 3-5 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Nhúng tiêu bản trong dung dịch cồn-HCl 1%: vài giây
- Phủ tiêu bản bằng dung dịch Na₂CO₃ 1%: 1 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Nhuộm trong dung dịch erythrocine B (hoặc eosin) 1%: 1 phút
- Rửa nhanh trong nước
- Tẩy tiêu bản bằng cồn tuyệt đối, làm trong bằng xylene, gắn lamina

ĐẾM SỐ LƯỢNG HỒNG CẦU (Bảng kính hiển vi quang học)

1. Nguyên tắc

Đếm số lượng hồng cầu của máu toàn phần trong một thể tích đã biết với một tỷ lệ pha loãng nhất định để tính ra số lượng hồng cầu trong một lít máu toàn phần.

2. Máu xét nghiệm, hoá chất và dụng cụ

- Máu tĩnh mạch hoặc mao mạch được chống đông bằng EDTA khô 1,5mg/ml.
- Dụng cụ lấy máu mao mạch (đầu ngón tay) và tĩnh mạch.
- Dung dịch Marciano.
- Quả bóp cao su.

- Ống pha loãng (potain) hồng cầu, loại pha loãng 200 lần.
- Buồng đếm, lamén.
- Kính hiển vi quang học.

3. Kỹ thuật

3.1. Pha loãng, nhỏ lên buồng đếm

Lắc kỹ ống máu, nếu chích đầu ngón tay thì nhớ thấm bỏ giọt đầu. Dùng potain hút máu đến vạch 0,5. Lau sạch đầu ống hút, chú ý không để máu trong ống hút bị thiếu do động tác này. Sau đó hút tiếp dung dịch Marciano đến vạch 101 ở phía trên bầu (độ pha loãng 1/200), bóp quả bóp ra, dùng ngón tay cái và trỏ (hoặc giữa) bịt chặt hai đầu potain, lắc theo chiều dọc potain khoảng 1-2 phút. Chú ý không để có bọt khi hút máu và dung dịch pha loãng, không hút máu quá vạch chuẩn, không được để mất máu khi hút dung dịch pha loãng.

Trường hợp bệnh nhân thiếu máu, có thể hút máu đến vạch 1, sau đó hút dung dịch pha loãng đến vạch 101 (độ pha loãng 1/100).

Gắn lamén lên buồng đếm khô, sạch. Sau khi lắc kỹ potain, bỏ vài giọt đầu, để đầu dưới potain sát cạnh lamén, nhỏ một giọt hỗn dịch sao cho lan toả khắp buồng đếm nhưng không tràn ra ngoài, đợi 5 phút. Dùng vật kính x 10 kiểm tra xem hồng cầu có trải đều trên buồng đếm hay không.

3.2. Đếm số lượng hồng cầu

Lựa chọn khu vực đếm hồng cầu trên buồng đếm. Có nhiều loại buồng đếm khác nhau như Gorlaep, Thoma, Neubauer và Smic, nhưng có đặc điểm chung khi đếm hồng cầu là đều đếm 5 khu vực (5 ô vuông lớn), trong đó 4 khu vực ở bốn góc và một khu vực ở giữa buồng đếm. Mỗi khu vực đếm gồm 16 ô vuông nhỏ. Mỗi ô vuông nhỏ có thể tích là $1/4000 \text{ mm}^3$. Bằng vật kính x 10, đếm tất cả hồng cầu nằm gọn trong khu vực ô vuông lớn và các hồng cầu nằm trên hai cạnh của mỗi ô vuông lớn.

3.3. Tính kết quả

Kết quả được chấp nhận khi số lượng hồng cầu ở mỗi khu vực chênh lệch nhau không quá 10. Gọi n là tổng số hồng cầu trên 5 khu vực đếm, độ pha loãng là 1/200, N là số lượng hồng cầu trong một lít máu, thì:

$$N = n \times 200 \times 4000 / 80 \times 10^6 = n / 100 \times 10^{12} / \text{lit}$$

4. Nguyên nhân sai số

- Máu xét nghiệm không đúng quy cách: đông đặc, máu mao mạch bị pha loãng bởi dịch gian bào do nặn bóp đầu ngón tay nhiều khi chích máu, ống máu để lâu không đầy nút,...
- Dụng cụ không đủ tiêu chuẩn: bẩn, ướt, sút mẻ ...
- Gắn lamén không khít.

- Pha loãng không chuẩn: hút máu không đúng vạch quy định trên potain, dung dịch pha loãng thiếu hoặc thừa.
- Dung dịch pha loãng nhiều cạn hoặc vẫn đục.
- Không trộn đều.
- Nhỏ trên buồng đếm không đúng kỹ thuật: có bọt khí, hồng cầu phân bố không đều...
- Đếm hoặc tính kết quả sai.

ĐẾM SỐ LƯỢNG BẠCH CẦU (Bằng kính hiển vi quang học)

1. Nguyên tắc

Đếm số lượng bạch cầu của máu toàn phần trong một thể tích đã biết với một tỷ lệ pha loãng nhất định để tính ra số lượng bạch cầu trong một lít máu toàn phần.

2. Máu xét nghiệm, hoá chất và dụng cụ

- Máu tĩnh mạch hoặc mao mạch chưa kịp đông hay đã được chống đông bằng EDTA khô 1,5mg/ml.
- Dụng cụ lấy máu mao mạch (đầu ngón tay) và tĩnh mạch.
- Dung dịch đếm bạch cầu: có thể dùng dung dịch Lazarus, dung dịch Hayem hoặc dung dịch xanh acetic.
- Quả bóp cao su.
- Ống pha loãng (potain) bạch cầu, loại pha loãng 20 lần.
- Buồng đếm, lamén.
- Kính hiển vi quang học.

3. Kỹ thuật

3.1. Pha loãng, nhỏ lên buồng đếm

Lắc kỹ ống máu, nếu chích đầu ngón tay thì nhớ thấm bỏ giọt đầu. Dùng potain hút máu đến vạch 0,5. Lau sạch đầu ống hút, chú ý không để máu trong ống hút bị thiếu do động tác này. Sau đó hút tiếp dung dịch pha loãng bạch cầu đến vạch 11 ở phía trên bầu (độ pha loãng 1/20), bỏ quả bóp ra, dùng ngón tay cái và trỏ (hoặc giữa) bịt chặt hai đầu potain, lắc theo chiều dọc potain khoảng 2-3 phút đến khi màu của máu trong potain chuyển sang màu sẫm. Chú ý không để có bọt khí hút máu và dung dịch pha loãng, không hút máu quá vạch chuẩn, không được để mất máu khi hút dung dịch pha loãng.

Gắn lamên lên buồng đếm khô, sạch. Sau khi lắc kỹ, bỏ giọt đầu, để đầu dưới potain sát cạnh lamên, nhỏ một giọt hỗn dịch vào sao cho lan toả khắp buồng đếm nhưng không tràn ra ngoài, đợi 5 phút. Dùng vật kính x 10 kiểm tra xem bạch cầu có trải đều trên buồng đếm hay không.

3.2. Đếm số lượng bạch cầu và tính kết quả

3.2.1. Buồng đếm Gorlaep

Đếm bạch cầu trong 25 khu vực (mỗi khu vực có 4 ô vuông). Gọi n là tổng số bạch cầu đếm được trong 25 khu vực, độ pha loãng 1/20 thì:

$$\text{Số lượng bạch cầu} = n \times 20 \times 10/4 \times 10^6 = 50 n \times 10^9/\text{lit}$$

Trong đó: 10 là chiều cao buồng đếm.

$$4 \text{ là } 4 \text{ mm}^2 \text{ (diện tích của 25 khu vực đếm).}$$

3.2.2. Buồng đếm Neubauer và Smic

Đếm bạch cầu trong 4 khu vực (mỗi khu vực có 16 ô vuông). Gọi n là tổng số bạch cầu đếm được trong 4 khu vực, độ pha loãng 1/20 thì:

$$\text{Số lượng bạch cầu} = n \times 20 \times 10 / 4 \times 10^6 = 50 n \times 10^9/\text{lit}$$

Trong đó: 10 là chiều cao buồng đếm.

$$4 \text{ là } 4 \text{ mm}^2 \text{ (diện tích của 4 khu vực đếm).}$$

3.2.3. Buồng đếm Thoma

Đếm bạch cầu trong 16 khu vực (mỗi khu vực có 16 ô vuông) có diện tích là 1 mm². Gọi n là tổng số bạch cầu đếm được trong 16 khu vực, độ pha loãng 1/20 thì:

$$\text{Số lượng bạch cầu} = n \times 20 \times 10 \times 10^6 = 200n \times 10^9/\text{lit}$$

3.2.4. Buồng đếm Malassez

Đếm bạch cầu trong 100 khu vực (mỗi khu vực có 20 ô vuông) có diện tích là 1mm². Gọi n là tổng số bạch cầu đếm được trong 100 khu vực, độ pha loãng 1/20 thì:

$$\text{Số lượng bạch cầu} = n \times 20 \times 10 \times 10^6 = 200n \times 10^9/\text{lit}$$

4. Nguyên nhân sai số

– Máu xét nghiệm không đúng quy cách: đông dây, máu mao mạch bị pha loãng bởi dịch gian bào do nặn bóp đầu ngón tay nhiều khi chích máu, ống máu để lâu không đầy nút,...

– Dụng cụ không đủ tiêu chuẩn: bẩn, ướt, sắt mẻ ...

– Gắn lamên không khít.

– Pha loãng không chuẩn: hút máu không đúng vạch quy định trên potain, dung dịch pha loãng thiếu hoặc thừa.

– Dung dịch pha loãng nhiều cạn hoặc vẫn đục.

- Không trộn đều.
- Nhỏ trên buồng đếm không đúng kỹ thuật: có bọt khí, bạch cầu phân bố không đều,...
- Đếm hoặc tính kết quả sai.

ĐẾM SỐ LƯỢNG TIỂU CẦU (*Bằng kính hiển vi quang học*)

1. Nguyên tắc

Đếm số lượng tiểu cầu của máu toàn phần trong một thể tích đã biết với một tỷ lệ pha loãng nhất định để tính ra số lượng tiểu cầu trong một lít máu toàn phần.

2. Máu xét nghiệm, hoá chất và dụng cụ

- Máu tĩnh mạch hoặc mao mạch chưa kịp đông hay đã được chống đông bằng EDTA khô 1,5mg/ml (tốt nhất khi bệnh nhân chưa ăn sáng).
- Dụng cụ lấy máu mao mạch (đầu ngón tay) và tĩnh mạch.
- Dung dịch amoni oxalat hoặc dung dịch Marciano.
- Quả bóp cao su.
- Ống pha loãng (potain) hồng cầu, loại pha loãng 200 lần hoặc potain bạch cầu loại pha loãng 20 lần.
- Buồng đếm, lamén.
- Kính hiển vi đối pha hoặc kính hiển vi quang học.

3. Kỹ thuật đếm trực tiếp

3.1. Pha loãng tiểu cầu bằng dung dịch Marciano

Lắc kỹ ống máu, nếu chích đầu ngón tay thì nhớ thấm bỏ giọt đầu. Dùng potain hồng cầu hút máu đến vạch 0,5. Lau sạch đầu ống hút, chú ý không để máu trong ống hút bị thiếu do động tác này. Sau đó hút tiếp dung dịch Marciano đến vạch 101 ở phía trên bầu (độ pha loãng 1/200), bỏ quả bóp ra, dùng ngón tay cái và trỏ (hoặc giữa) bịt chặt hai đầu potain, lắc theo chiều dọc potain khoảng 3-5 phút. Chú ý không để có bọt khí hút máu và dung dịch pha loãng, không hút máu quá vạch chuẩn, không được để mất máu khi hút dung dịch pha loãng.

Trường hợp bệnh nhân giảm tiểu cầu, có thể hút máu đến vạch 1, sau đó hút dung dịch pha loãng đến vạch 101 (độ pha loãng 1/100).

3.2. Pha loãng tiểu cầu bằng dung dịch amoni oxalat

Lắc kỹ ống máu, nếu chích đầu ngón tay thì nhớ thấm bỏ giọt đầu. Dùng potain bạch cầu hút máu đến vạch 0,5. Lau sạch đầu ống hút, chú ý không để

máu trong ống hút bị thiếu do động tác này. Sau đó hút tiếp dung dịch amoni oxalat đến vạch 11 ở phía trên bầu (độ pha loãng 1/20), bỏ quả bóp ra, dùng ngón tay cái và trỏ (hoặc giữa) bịt chặt hai đầu potain, lắc theo chiều dọc potain khoảng 3-5 phút để hồng cầu tan hết. Chú ý không để có bọt khi hút máu và dung dịch pha loãng, không hút máu quá vạch chuẩn, không được để mất máu khi hút dung dịch pha loãng.

Trường hợp bệnh nhân giảm tiểu cầu, có thể hút máu đến vạch 1, sau đó hút dung dịch pha loãng đến vạch 11 (độ pha loãng 1/10).

3.3. Đếm số lượng tiểu cầu

Gắn lamên lên buồng đếm khô, sạch. Sau khi lắc kỹ, bỏ một vài giọt dầu, để dầu dưới potain sát cạnh lamên, nhỏ một giọt hỗn dịch vào sao cho lan toả khắp buồng đếm nhưng không tràn ra ngoài, đợi 10 phút. Dùng vật kính x 10 đếm số lượng tiểu cầu.

Khu vực đếm tiểu cầu chính là khu vực đếm hồng cầu trên buồng đếm. Có nhiều loại buồng đếm khác nhau như Gorlaep, Malassez, Thoma, Neubauer và Smic, nhưng có đặc điểm chung khi đếm tiểu cầu là đều đếm 5 khu vực (5 ô vuông lớn), trong đó 4 khu vực ở bốn góc và 1 khu vực ở giữa buồng đếm. Mỗi khu vực đếm gồm 16 ô vuông nhỏ. Mỗi ô vuông nhỏ có thể tích là $1/4000 \text{ mm}^3$. Bằng vật kính x 10, đếm tất cả tiểu cầu (chấm sáng nhỏ bằng 1/10 hồng cầu, cần phân biệt với các hạt mỡ) nằm gọn trong khu vực ô vuông lớn và các tiểu cầu nằm trên hai cạnh của mỗi ô vuông lớn.

3.4. Tính kết quả

Gọi n là tổng số lượng tiểu cầu trên 5 khu vực đếm, độ pha loãng là 1/200. N là số lượng tiểu cầu trong một lít máu, thì:

$$N = n \times 200 \times 4000 / 80 \times 10^9 = n \times 10^9 / \text{lit}$$

Nếu độ pha loãng là 1/20 thì:

$$N = n \times 20 \times 4000 / 80 \times 10^9 = n / 10 \times 10^9 / \text{lit}$$

4. Kỹ thuật gián tiếp

Đếm số lượng tiểu cầu thông qua tỷ lệ phân bố bạch cầu/tiểu cầu trên tiêu bản nhuộm Giemsa và số lượng bạch cầu của chính mẫu máu đó.

Phương pháp này tuy có sai số lớn nhưng nó có vai trò bổ sung hiệu quả cho phương pháp đếm số lượng tiểu cầu trực tiếp, ngay cả khi đếm tiểu cầu bằng máy đếm tế bào.

5. Nguyên nhân sai số

- Máu xét nghiệm không đúng quy cách: đông dây, máu mao mạch bị pha loãng bởi dịch gian bào do nạn bóp đầu ngón tay nhiều khi chích máu, ống máu để lâu không đầy nút,...
- Dụng cụ không đủ tiêu chuẩn: bẩn, ướt, sút mẻ...

- Gắn lamén không khít.
- Pha loãng không chuẩn: hút máu không đúng vạch quy định trên potain, dung dịch pha loãng thiếu hoặc thừa.
- Dung dịch pha loãng có nhiều cặn hoặc vẩn đục.
- Không trộn đều.
- Nhỏ trên buồng đếm không đúng kỹ thuật: có bọt khí, hồng cầu phân bố không đều,...
- Đếm hoặc tính kết quả sai.

ĐẾM HỒNG CẦU LƯỚI

(Phương pháp nhuộm xanh crésyl)

1. Nguyên tắc

Hồng cầu lưới là giai đoạn trung gian giữa hồng cầu có nhân và hồng cầu trưởng thành, được đặc trưng bởi ARN còn lại trong bào tương. Người ta có thể nhận biết đặc điểm này nhờ các thuốc nhuộm làm tửa ARN trong hồng cầu.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA khô.
- Ống nghiệm khô sạch có nút.
- Lam kính, lam kéo khô sạch.
- Pipette Pasteur.
- Xanh crésyl bão hoà.
- Tủ ấm hoặc Bain marrie.
- Kính hiển vi quang học.

3. Kỹ thuật

Cho vào ống nghiệm hai giọt máu xét nghiệm và hai giọt xanh crésyl bão hoà, lắc đều, đập nút, ủ ở 37°C/20 phút. Lắc đều, làm tiêu bản máu dàn (kéo tiêu bản thật mỏng), để khô tự nhiên. Đọc kết quả trên kính hiển vi với vật kính dầu. Tính tỷ lệ phần trăm hồng cầu lưới trong 1000 hồng cầu trưởng thành.

4. Nguyên nhân sai sót thường gặp

- Lắc không đều: khi lấy máu để ủ, khi làm tiêu bản.
- Thuốc nhuộm kém chất lượng, hoặc cặn.
- Đọc nhầm thể vùi hoặc bạch cầu

ĐỊNH LƯỢNG HUYẾT SẮC TỔ

(Phương pháp quang phổ kế)

1. Nguyên tắc

Do mật độ quang học của mẫu nghiệm sau khi đã chuyển huyết sắc tố thành methemoglobin - một dẫn xuất bền vững mà sự hấp phụ tốt nhất ở bước sóng 540nm. Do mật độ quang tỷ lệ thuận với nồng độ của huyết sắc tố nên dễ dàng tính ra được lượng huyết sắc tố của mẫu nghiệm.

2. Máu xét nghiệm, thuốc thử và dụng cụ

- Máu tĩnh mạch hoặc mao mạch chưa kịp đông hay đã được chống đông bằng EDTA khô 1,5mg/ml.
- Dụng cụ lấy máu mao mạch (đầu ngón tay) và tĩnh mạch.
- Dung dịch drabkin sử dụng.
- Hemo-trol chuẩn.
- Pipette vạch 20 μ l (0,02 ml).
- Quang phổ kế có bước sóng 540 nm.

3. Kỹ thuật

3.1. Thiết lập biểu đồ mẫu

Làm bằng dung dịch chuẩn mà hiệu giá cyanmethemoglobin (bền vững trong điều kiện bảo quản ở 4°C) đã được xác định chính xác và ghi rõ trên mỗi lọ mẫu chuẩn, thường khoảng 60 mg/100 ml, nghĩa là mật độ quang học tương ứng với một mẫu máu chứa lượng huyết sắc tố 15 mg/100 ml khi được pha loãng trong dung dịch drabkin (20 μ l/5ml). Để vẽ đường thẳng mẫu, người ta thực hiện trên một loạt ống nghiệm tương ứng với hiệu giá của hemo-trol đã ghi chú:

Bảng 1.1: Tương quan giữa hiệu giá hemo-trol và mật độ quang (OD)

Số ống nghiệm	1	2	3	4	5	Chứng
Drabkin sử dụng	0 ml	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml
Hemo-trol	5 ml	4 ml	3 ml	2 ml	1 ml	0 ml
Mật độ quang	OD ₁	OD ₂	OD ₃	OD ₄	OD ₅	OD ₆
Huyết sắc tố (g/l)	5n/20	4n/20	3n/20	2n/20	1n/20	0

Do mật độ quang học các ống nghiệm ở bước sóng 540nm, ghi trên giấy kẻ ô vuông milimet các mật độ quang học đọc được (OD₁, OD₂, ..., OD₆) lên trục tung và lượng huyết sắc tố tương ứng tính được lên trục hoành (đơn vị g/l).

Cách tính lượng huyết sắc tố tương ứng từ mật độ quang đo được như sau:

Ví dụ, nếu tỷ lệ huyết sắc tố của hemo-trol chuẩn là 58 mg/100ml = 580g/l, thì:

$$\text{Ống 1} = 580 \times 5 : 20 = 145\text{g/l.}$$

$$\text{Ống 5} = 580 \times 1 : 20 = 29\text{g/l.}$$

$$\text{Ống chứng} = 0.$$

Nhờ có biểu đồ mẫu được thiết lập (một đường thẳng), đọc huyết sắc tố sẽ đơn giản bằng cách ghi mật độ quang học ở trục tung và suy ra lượng huyết sắc tố ở trục hoành tương ứng.

Trong điều kiện khó khăn, không thiết lập được biểu đồ mẫu hoặc vì môi trường phòng xét nghiệm không đảm bảo (không đủ kín, không có điều hoà, không có hút ẩm) nên đo các mẫu nghiệm cùng với một mẫu hemo-trol chuẩn sau đó tính ra lượng huyết sắc tố cho mẫu nghiệm.

3.2. Đo mẫu xét nghiệm

Chuẩn bị những ống nghiệm đựng 5ml dung dịch drabkin sử dụng. Cho vào mỗi ống 0,02 ml máu chưa kịp đông hoặc đã được chống đông khô, lắc thật đều, để khoảng 5 phút cho tan hoàn toàn hồng cầu. Đổ vào cồng của quang kế dung dịch drabkin sử dụng, điều chỉnh mật độ quang ở bước sóng 540 nm về số 0 (trừ trắng). Đổ dung dịch cần đo vào cồng, đo mật độ quang học ở bước sóng 540nm. Sau đó đối chiếu với biểu đồ mẫu hoặc dung dịch chuẩn (hemo-trol) để có tỷ lệ huyết sắc tố g/l.

4. Nguyên nhân sai số thường gặp

- Độ pha loãng không chuẩn: hút máu hoặc dung dịch drabkin không đúng số lượng quy định.
- Hồng cầu chưa tan hết trong dung dịch drabkin: lắc không đều, thời gian quá ngắn.
- Huyết tương đục.
- Bạch cầu quá cao.
- Điện nguồn không ổn định hoặc quá thấp.
- Kính lọc mờ do hơi nước hoặc cũ.
- Dung dịch drabkin sử dụng không đúng nồng độ hoặc bị hỏng.

5. Các phương pháp khác

5.1. Phương pháp máy đếm tế bào: Nguyên tắc đo huyết sắc tố của máy đếm tế bào cũng giống như phương pháp đo bằng quang phổ kế nói trên. Tuy nhiên, phương pháp máy đếm tế bào (kể cả máy tự động và máy bán tự động) tiện lợi và chính xác hơn nhiều. Xét nghiệm viên không cần chuẩn bị dung dịch chuẩn, không cần thiết lập biểu đồ mẫu, không cần pha loãng máu trong dung dịch drabkin.

5.2. Phương pháp đo trực tiếp bằng máu toàn phần: Dựa trên sự chênh lệch cường độ ánh sáng phản xạ khi chiếu vào giọt máu toàn phần so với chuẩn trắng của máy đo. Phương pháp này gọn nhẹ về trang thiết bị, đơn giản về kỹ thuật, thích hợp cho công tác thực địa nhất là các vùng xa, vùng sâu; nhưng kết quả kém ổn định so với phương pháp quang phổ kế.

5.3. Phương pháp so màu bằng mắt trên huyết sắc kế Sahli: Phương pháp này kém chính xác. Hiện nay không nên áp dụng.

ĐO THỂ TÍCH KHỐI HỒNG CẦU **(Phương pháp microhematocrit)**

1. Nguyên tắc

Thể tích khối hồng cầu là thể tích mà khối hồng cầu chiếm chỗ so với lượng máu toàn phần đã biết, khi máu được chống đông và dùng lực ly tâm làm hồng cầu lắng xuống thành một khối. Biểu thị bằng l/l.

2. Máu xét nghiệm, chống đông và dụng cụ

- Máu tĩnh mạch hoặc mao mạch chưa kịp đông hay đã được chống đông bằng EDTA khô 1,5mg/ml.
- Dụng cụ lấy máu mao mạch (đầu ngón tay) và tĩnh mạch.
- Heparin tráng ống vi thể tích (nếu máu chưa được chống đông).
- Máy ly tâm vi thể tích tốc độ 10.000g/phút.
- Thuốc đo kèm theo máy.
- Ống ly tâm vi thể tích chuẩn.
- Matis.

3. Kỹ thuật

Nếu lấy máu mà không cho vào ống chống đông thì phải tráng ống vi thể tích bằng heparin và thấm bỏ giọt máu đầu tiên sau khi chích đầu ngón tay, nếu máu tĩnh mạch lấy vào ống chống đông thì phải trộn đều.

Nhúng đầu ống vi thể tích vào máu, nghiêng 45° - 60° , để máu mao dẫn đến khoảng 3/4 chiều dài ống vi thể tích. Lau sạch máu ở đầu ống vi thể tích và gắn đầu ống bằng matis.

Để các ống vi thể tích trên khay của ly tâm vi thể tích, đầu gắn matis quay về phía ngoài. Nếu phải đợi làm hàng loạt thì để ống mao dẫn thẳng đứng trên khay matis theo số thứ tự.

Sau khi đặt nắp ly tâm cẩn thận, ly tâm 5 phút tốc độ 10.000 g/ phút.

Đọc kết quả ngay sau khi máy ly tâm dừng, bằng cách điều chỉnh mức trên và dưới của ống vi thể tích với vạch chuẩn của thước đo.

4. Nguyên nhân sai số thường gặp

- Lấy máu: Lấy cả giọt đầu khi chích máu đầu ngón tay, garô lâu quá 1 phút.
- Nồng độ EDTA không thích hợp hoặc heparin bị hỏng do bảo quản.
- Máu để quá 6 giờ.
- Lắc máu không đều trước khi mao dẫn.
- Thời gian và tốc độ của ly tâm không đảm bảo.
- Hồng cầu tụ ngưng kết, vỡ hồng cầu.
- Huyết tương bay hơi trong thời gian ly tâm do máy nóng quá hoặc ly tâm xong nhưng chưa đọc ngay.
- Gắn matis chưa đủ chặt.

5. Các phương pháp khác

5.1. Máy đếm tế bào

Tất cả máy đếm tế bào từ 5 thông số trở lên đều đo được hematocrit. Nguyên tắc cơ bản là tính hematocrit từ tổng kích cỡ các xung điện được tạo ra bởi hồng cầu. Đây là phương pháp cho kết quả nhanh, ổn định và chính xác nhất hiện nay. Tuy nhiên, khi hồng cầu tụ ngưng kết thì phần lớn các trường hợp máy cho kết quả hematocrit không chính xác.

5.2. Phương pháp macrohematocrit

Sử dụng ống Wintrobe, quay trên máy ly tâm thông thường. Phương pháp này tốn máu, sai số lớn, hiện nay rất ít được sử dụng.

ĐO TỐC ĐỘ MÁU LẮNG

1. Nguyên lý

Máu toàn phần lấy ra khỏi cơ thể, chống đông, cho vào ống thủy tinh để thẳng đứng. Sau một thời gian tế bào máu sẽ lắng xuống để lại cột huyết tương ở phía trên.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Máu chống đông bằng EDTA khô (lấy máu khi chưa ăn), hoặc phương tiện lấy máu mao mạch.
- Giá và ống máu lắng (Pachenkow hoặc Westergreen).
- Đồng hồ.
- Dụng cụ pha loãng: ống nghiệm, dung dịch natri citrat 3,8%.

3. Kỹ thuật

3.1. Phương pháp Westergreen

Pha loãng 1,6 ml máu với 0,4 ml dung dịch natricitrat 3,8% (tỷ lệ 1/5). Lắc đều nhẹ nhàng. Dùng ống Westergreen hút máu đã pha loãng đến vạch 0. Lau sạch xung quanh ống máu lắng. Cắm thẳng đứng ống máu lắng lên giá Westergreen. Đọc chiều cao cột huyết tương bằng thước vạch có sẵn trên ống Westergreen sau 1 giờ và 2 giờ.

3.2. Phương pháp Pachenkow

Tráng ống Pachenkow bằng dung dịch chống đông. Hút dung dịch natricitrat 3,8% đến vạch P (50), thổi vào ống nghiệm nhỏ, khô, sạch. Hút hai lần máu đến vạch K (0) thổi vào ống nghiệm đã có dung dịch natricitrat. Lắc đều nhẹ nhàng. Sau cùng, hút máu đã pha loãng chống đông (1/5) vào ống Pachenkow đến vạch K. Cắm thẳng đứng ống máu lắng lên giá. Đọc kết quả sau 1 giờ và 2 giờ.

4. Nguyên nhân sai sót thường gặp

- Máu lấy không đủ hoặc đông đặc.
- Ống máu lắng không sạch, ướt, sút mẻ...
- Tỷ lệ pha loãng không chính xác.
- Lắc trộn máu không đều.
- Có bọt không khí trong ống máu lắng.
- Ống máu lắng không thẳng đứng.
- Đọc kết quả không đúng thời gian hoặc không đúng cách thức quy định.

5. Phương pháp khác

Hiện nay có nhiều loại máy xét nghiệm máu lắng, bao gồm:

- Loại máy chỉ đơn thuần đọc kết quả máu lắng.
- Máy có chức năng hút mẫu nhưng không tự rửa ống máu lắng.
- Máy tự động hoàn toàn.

Các máy đo tốc độ máu lắng đều dựa trên nguyên tắc Westergreen.

CÔNG THỨC BẠCH CẦU

1. Nguyên lý

Dựa vào hình thái và đặc điểm bắt màu thuốc nhuộm của các loại bạch cầu trên tiêu bản máu ngoại vi để tính tỷ lệ phần trăm của mỗi loại.

2. Dụng cụ, hoá chất

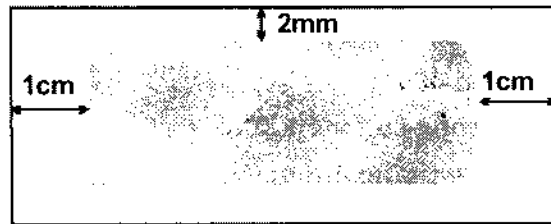
- Kính hiển vi quang học
- Dầu soi
- Dụng cụ đếm
- Kim chích đầu ngón tay
- Lam kính khô sạch
- Cồn tuyệt đối
- Giemsa
- Phương tiện sát khuẩn tại chỗ

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Bệnh phẩm

- Máu tĩnh mạch có chống đông
- Máu mao mạch: chích ở đầu ngón tay

3.2. Làm tiêu bản máu đàn (xem mục 1.1 bài Phương pháp làm tiêu bản xét nghiệm)



Hình 1.2: Tiêu bản máu đàn

3.3. Lập công thức bạch cầu

Dùng vật kính x 10 quan sát toàn bộ tiêu bản, tiêu bản phải đạt các yêu cầu: sạch, dàn đều, bắt màu đều.

Chuyển sang vật kính dầu x 100

Nhỏ 1 giọt dầu lên 1/3 giữa của tiêu bản

Quan sát và phân loại ít nhất 100 bạch cầu, xem mỗi loại có bao nhiêu và ghi tỷ lệ % mỗi loại.

4. Nhận xét kết quả

4.1. So sánh với chỉ số bình thường tính theo tuổi: (bảng 1.2)

Bảng 1.2: Chỉ số bạch cầu bình thường tính theo tuổi

Số lượng tế bào trong 1 mm ³	Trẻ mới đẻ	9 tháng	3 tuổi	10 tuổi	Trưởng thành
SLBC(G/l)	5 - 25	4 - 15	4 - 11	5 - 10	4 - 11
CTBC (%)					
Bạch cầu đoạn trung tính	54 - 86	25 - 40	35 - 50	45 - 60	55 - 75
Bạch cầu ưa acid (toan)	0 - 2	1 - 2	1 - 4	1 - 4	4 - 8
Bạch cầu ưa base (kiềm)	0	0,4	0,2	0,1	0,1
Lymphocyt	10 - 38	50 - 70	45 - 60	40 - 59	25 - 35
Monocyt	0 - 7	8	6	6	1 - 4
Bạch cầu đĩa	6	6	6	4	1 - 4
Các tế bào non dòng tủy	2	2	1	0	0

4.2. Cơ sở để phân loại bạch cầu

- Hình thái và kích thước của bạch cầu.
- Nhân: hình thái và tỷ lệ nhân trên bào tương.
- Bào tương: màu sắc, các hạt, hốc trong bào tương.

4.3. Có thể tính số lượng tuyệt đối của mỗi loại BC theo công thức

Tỷ lệ phần trăm x số lượng bạch cầu chung.

5. Những sai sót thường gặp

- Quy trình không đúng: tiêu bản quá dày hoặc quá mỏng, cố định không tốt (tiêu bản chưa thật khô, độ ẩm cao), thời gian nhuộm sai.
- Hoá chất: cồn, thuốc nhuộm không đảm bảo chất lượng.
- Nhận định sai hình thái bạch cầu, đếm không đủ số lượng tế bào cần thiết.

KỸ THUẬT TẬP TRUNG BẠCH CẦU

1. Nguyên lý

Trong các trường hợp có ít tế bào bất thường ở máu ngoại vi, đặc biệt ở bệnh nhân có số lượng bạch cầu thấp, không thể phát hiện được bằng tiêu bản máu dàn. Tập trung bạch cầu là một kỹ thuật làm tăng số lượng và mật độ tế bào có nhân trên tiêu bản, giúp khắc phục khó khăn trên.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Pipette Pasteur.
- Bộ dụng cụ làm tiêu bản máu đàn.
- Máy ly tâm.
- Kính hiển vi quang học.
- Chất chống đông (EDTA, natricitrat hoặc heparin).Thuốc nhuộm Giemsa.

3. Quy trình kỹ thuật

- Lấy 3-5 ml máu tĩnh mạch chống đông.
- Để ống máu thẳng đứng ở nhiệt độ phòng 30 phút, hút lấy phần huyết tương cho tới quá ranh giới với hồng cầu khoảng 0,5 mm.
- Ly tâm 1000 vòng/phút trong 15 phút, hút bỏ phần huyết tương phía trên chỉ để lại 0,5 ml cặn.
- Lắc đều, làm tiêu bản, để khô, cố định, nhuộm Giemsa như tiêu bản máu đàn.

4. Kết quả

- Quan sát tiêu bản bằng vật kính x 10: đánh giá mật độ và đặc điểm phân bố tế bào có nhân, tìm kiếm các tế bào kích thước lớn. Tiêu bản đạt yêu cầu phải có ≥ 10 tế bào có nhân trong mỗi vi trường x 100, tế bào có nhân không bị nát.
- Quan sát tiêu bản ở vật kính x 100: đánh giá hình thái, phân loại theo tỷ lệ phần trăm tế bào có nhân. Chú ý phát hiện tế bào lạ, đặc biệt là "blast".
- Trả lời kết quả bằng một bản công thức tế bào có nhân trên tiêu bản, có thể kèm theo các nhận xét nếu cần thiết.

MÁY ĐẾM TẾ BÀO NGUYÊN TẮC HOẠT ĐỘNG VÀ PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG

1. Mở đầu

Năm 1642, Leeuwenhook phát hiện ra tế bào máu. Cho đến năm 1934, Moldavan mới đề xuất một phương pháp đếm số lượng hồng cầu đã được pha loãng sẵn dựa trên nguyên tắc điện tử, đây là nền móng đầu tiên cho kỹ thuật máy đếm tế bào phát triển ở những năm sau này. Năm 1845, một phương pháp đếm tế bào hồng cầu khác được mô tả dựa trên nguyên tắc quang học hoàn toàn. Bằng việc xác định mật độ quang của hỗn dịch hồng cầu so với chuẩn để tính ra số lượng hồng cầu trong mẫu bệnh phẩm. Đến đầu những năm 1950, kỹ sư Wallace Coulter đã nghiên cứu thành công và bắt đầu triển khai phương pháp tự động đếm và phân loại kích thước các tế bào máu. Từ đó nguyên tắc này được biết đến

với tên gọi là "*Nguyên tắc Coulter*". Năm 1953, với sự ra đời của máy đếm tế bào Coulter model "A", nguyên tắc đếm tế bào tự động của Coulter được phổ biến gần như khắp thế giới. Năm 1968, hãng Coulter chế tạo chiếc máy đếm tự động đầu tiên "Coulter model S" với 7 chỉ số. Phải chờ 10 năm sau, năm 1978, cùng với những tiến bộ của ngành điện tử, máy "Coulter model S plus" ra đời mới có khả năng đếm số lượng và tính được kích thước tiểu cầu.

Càng ngày, các thế hệ máy đếm tế bào càng hoàn thiện về tính năng và độ tin cậy. Nguyên lý cơ bản của máy đếm tế bào theo dòng là sự biến đổi điện trở khi tế bào đi qua điện trường tạo thành các xung điện. Nguyên lý này giúp phân tích sự khác biệt về kích thước các loại tế bào khác nhau. Hạn chế của loại máy này là không có khả năng nhận diện chính xác tế bào bạch cầu để phân loại. Để khắc phục nhược điểm này, người ta sử dụng các xung điện cộng hưởng đa chiều và tia laser, giúp bộc lộ các khác biệt về hình thái và cấu trúc nhân, nên có thể lập được công thức bạch cầu một cách chính xác. Cho đến nay, trên thế giới, có năm hãng được coi là lớn nhất và cũng là các hãng có uy tín cao trên thị trường quốc tế là Coulter, Abbott, TOA (Sysmex), Technicon và Roche. Các máy đếm tế bào hiện đang được sử dụng có thể chia làm hai loại:

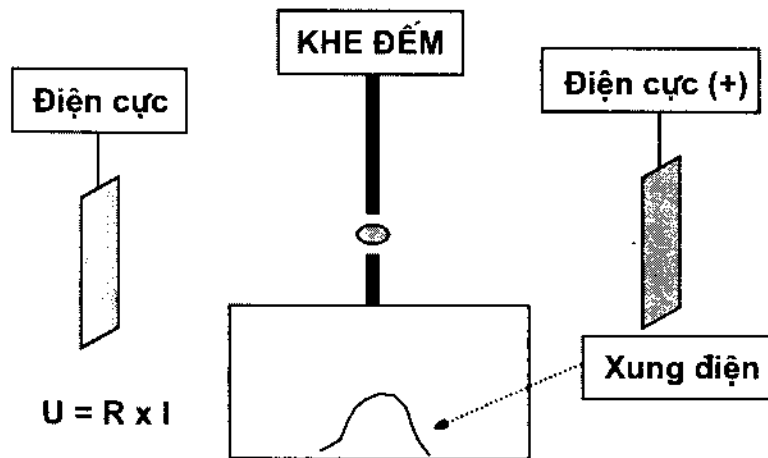
- Các máy đếm tế bào nguyên lý trở kháng: Bao gồm máy đếm tế bào bán tự động và tự động hoàn toàn. Nhược điểm của thế hệ máy này là kết quả phân loại bạch cầu chỉ chính xác trong các trường hợp hình thái bạch cầu hoàn toàn bình thường.

- Các máy thế hệ sau: Ưu điểm hơn hẳn của thế hệ máy này là tốc độ cao và phân loại bạch cầu chính xác. Với những máy sản xuất theo các model trước năm 1996 như Technicon H1, Cell Dyn 3500, MAXM, Helios, SE 9000, sai số trong phân loại bạch cầu, nói chung, khoảng 10%. Các model gần đây, với việc áp dụng tổng hợp các cơ chế trở kháng, xung điện đa chiều, laser, tế bào bạch cầu cần phân loại được đặt trong một không gian phân tích ba chiều, do đó khả năng nhận diện tế bào được nâng lên đến khoảng 95%, kể cả việc nhận diện các tế bào blast trong leukemia cấp. Một số hãng còn áp dụng thêm cơ chế nhuộm men peroxylase để tăng cường cho khả năng nhận diện bạch cầu hạt. Một số máy như Cell Dyn 4000 của hãng Abbott, SE-Avante của Sysmex còn được tăng cường hiệu quả bởi khả năng đếm trực tiếp hồng cầu lưới trong cùng một mẫu máu.

Không chỉ dừng ở mức sử dụng các máy đếm tế bào đơn lẻ, một số trung tâm xét nghiệm hiện đại đã triển khai một dây chuyền xét nghiệm tự động. Các thành phần cơ bản bao gồm một máy đếm tế bào đóng vai trò máy chủ và một số máy khác như máy đếm hồng cầu lưới, máy làm tiêu bản, máy nhuộm tiêu bản. Như vậy, con người chỉ cần lấy máu bệnh nhân và phân tích một số (thường là rất ít) các tiêu bản Giemsa có bất thường ngoài khả năng của máy.

2. Nguyên tắc hoạt động của máy đếm tế bào

Nguyên tắc cơ bản là trở kháng:



Hình 1.3: Nguyên tắc hoạt động của máy đếm tế bào theo nguyên lý trở kháng

Các máy hiện đại có thêm:

- Cơ chế laser scatter và nhuộm men peroxylase: tạo ra cơ chế không gian ba chiều để nhận dạng bạch cầu, kể cả tế bào blast.
- Nhuộm ARN cho đếm hồng cầu lưới.

3. Phương pháp sử dụng máy đếm tế bào

3.1. Các thông số

Tám thông số cơ bản cho đa số các máy đếm tế bào hiện nay đang lưu hành trên thị trường là:

- Số lượng hồng cầu (Red blood cell - RBC),
- Số lượng bạch cầu (White blood cell - WBC),
- Lượng huyết sắc tố (Hemoglobine - HGB),
- Hematocrit (Hct)
- Thể tích trung bình hồng cầu (Mean corpuscular volume - MCV),
- Lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu (Mean corpuscular Hemoglobine - MCH),
- Nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu (Mean corpuscular hemoglobine concentration - MCHC)
- Số lượng tiểu cầu (Platelet - PLT).

Các máy thế hệ trở kháng có thể có thêm: số lượng và tỷ lệ phần trăm của các loại bạch cầu, thể tích trung bình tiểu cầu (Mean platelet volume- MPV), đặc

biệt là độ dao động đường kính hồng cầu (Red distribution wide - RDW) và tiểu cầu (Platelet Distribution Wide:PDW). Các thông số về thành phần bạch cầu chỉ chính xác khi hình thái và kích thước bạch cầu bình thường, muốn chắc chắn nên kiểm tra trên tiêu bản nhuộm Giemsa. Các máy thế hệ laser và hoá tế bào có khả năng phân loại bạch cầu với độ chính xác cao; ngoài ra, máy còn có khả năng phân loại được hồng cầu non, tế bào blast và đếm được hồng cầu lưới.

3.2. Chuẩn máy

3.2.1. Yêu cầu

- Máu chuẩn: đảm bảo chất lượng, có đủ ba mức thấp, bình thường, cao.
- Nhiệt độ phòng xét nghiệm.

3.2.2. Quy trình chuẩn máy: Dùng máy để đếm các mẫu máu chuẩn. Đối chiếu kết quả với các thông số của bộ máu chuẩn. Tính hệ số chênh lệch giữa kết quả thu được và các thông số của máu chuẩn, điều chỉnh hệ số chuẩn của máy. Kiểm tra lại máu chuẩn. Chỉ kết thúc quá trình chuẩn máy khi nào tất cả kết quả thu được ở cả ba mức nằm trong khoảng dao động cho phép. Đặc biệt lưu ý các thông số MCV, MCH và MCHC. Một máy đếm tế bào được gọi là chuẩn khi ba thông số này nằm trùng hoặc gần trùng giá trị giữa khoảng dao động cho phép của máu chuẩn. Cũng có thể sử dụng quy trình chuẩn tự động của máy (nếu có).

3.3. Một số yêu cầu khi sử dụng máy

- Nơi đặt máy sạch, cần nhất là không bụi, khô và mát.
- Bệnh phẩm đúng quy cách, sử dụng ống nghiệm có nút và chất chống đông khô, tốt nhất là ống nhựa có EDTA khô.
- Lắc máu cẩn thận: tốt nhất là có máy lắc chuyên dụng.
- Thực hiện nghiêm túc các quy định bảo quản và vận hành máy:
 - + Phải có dây đất chống nhiễu đúng quy cách.
 - + Dung dịch của máy nào chỉ sử dụng cho máy ấy.
 - + Hạn chế sử dụng ồ ạt.
 - + Bảo dưỡng ngày, tuần, tháng theo quy định.

3.4. Phân tích kết quả

3.4.1. Các thông số hồng cầu:

- Số lượng hồng cầu: bình thường luôn tồn tại mối liên quan quy luật giữa màu sắc ống máu với số lượng hồng cầu. Thông thường số lượng hồng cầu tỷ lệ thuận với màu sắc ống máu. Trường hợp số lượng hồng cầu cao không tương xứng với màu sắc ống máu, cần xem ngay các chỉ số MCV, MCH và MCHC xem có phải hồng cầu nhỏ, nhược sắc không? Nếu số lượng hồng cầu thấp không tương xứng với màu sắc ống máu, cần xem có phải máu bị đông đặc, lắc không đều, máu tự ngưng kết hay hút không đủ máu (do máu quá nhớt hoặc hút kim)?

– Lượng huyết sắc tố: nếu huyết sắc tố cao không tương xứng với số lượng hồng cầu cần xem có phải do huyết tương đục hay bạch cầu quá cao không? Nếu huyết sắc tố thấp bất thường, cần xem kỹ các báo động của máy trên bản in kết quả, có thể do lỗi của máy hoặc lắc không đều, đông dây, máu ngưng kết hoặc hút không đủ máu.

– Hematocrit: các sai lầm song hành với số lượng hồng cầu và huyết sắc tố.

– Nồng độ huyết sắc tố trung bình trong một lít hồng cầu: bình thường MCHC 320-360 g/l, nếu > 380 g/l phải tìm nguyên nhân gây sai số.

3.4.2. Các dấu hiệu bất thường trong bản kết quả

– Kỹ thuật: tùy loại máy mà có hệ thống quy ước báo động riêng khi các yếu tố kỹ thuật ảnh hưởng đến kết quả, ví dụ điện thế nguồn thấp, nhiều, thiếu thuốc thử...

– Bệnh lý: khi các thông số trong kết quả nằm ngoài khoảng bình thường (do cài đặt) máy sẽ báo giá trị cao hay thấp. Ngoài ra, tùy từng loại máy mà có thể có báo động một số tình trạng, ví dụ tiểu cầu vón, hồng cầu lẫn vào tiểu cầu,...

3.4.3. Một số điểm cần lưu ý

– Đối chiếu các thông số của máy với tiêu bản nhuộm Giemsa.

– Hồng cầu ngưng kết: các thông số cao thấp không có quy luật, không tương xứng với màu ống máu, đặc biệt MCHC thường rất cao. Cần kiểm tra kỹ ống máu để khẳng định.

– Tiểu cầu vón: trong mọi trường hợp đối với máy trở kháng, cần kiểm tra mật độ phân bố và độ tập trung tiểu cầu trên tiêu bản nhuộm Giemsa. Nếu tiểu cầu vón, số lượng sẽ không tương xứng với mật độ, độ tập trung tiểu cầu.

– Bạch cầu cao: do làm tăng mật độ quang nên gây tăng giả tạo huyết sắc tố, MCHC rất cao.

– Tăng sức bền hồng cầu: ví dụ trường hợp bilirubin máu cao, dung dịch phá vỡ hồng cầu với nồng độ và thời gian bình thường của máy tự động không đủ làm tan hết hồng cầu trưởng thành, gây ra tăng giả tạo số lượng bạch cầu trong kết quả xét nghiệm. Chỉ bằng cách kiểm tra trên tiêu bản Giemsa mới phát hiện được.

– Huyết tương đục: làm tăng giả tạo huyết sắc tố.

– Tăng độ nhớt huyết tương: với thời gian và áp lực hút thông thường của máy đếm tế bào có thể gây ra giảm ba dòng ngoại vi giả tạo do hút không đủ máu.

– Máu bụi bẩn: làm tăng tiểu cầu giả tạo.

Tóm lại: Máy đếm tế bào là một trong những ứng dụng hiệu quả tiến bộ khoa học kỹ thuật vào y học, mở ra nhiều khả năng quan trọng mà phương pháp thủ công không làm được nhưng rõ ràng không thể thay thế hoàn toàn được con người.

HUYẾT ĐỒ

1. Khái niệm về huyết đồ

Nhiều tình trạng sinh lý và bệnh lý của cơ thể được phản ánh trực tiếp hoặc gián tiếp qua số lượng, hình thái cũng như thành phần các tế bào máu. Huyết đồ là bản tổng kết có bình luận các biểu hiện đó.

2. Dụng cụ

Bộ dụng cụ lấy máu tĩnh mạch, làm tiêu bản, nhuộm Giemsa và hồng cầu lưới.

Máy đếm tế bào hoặc các thiết bị thay thế (quang phổ kế, ly tâm vi thể tích, potain).

Kính hiển vi quang học.

3. Các thông số cần thiết

– Số lượng hồng cầu, số lượng bạch cầu, số lượng tiểu cầu, lượng huyết sắc tố, hematocrit, thể tích trung bình hồng cầu, lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu, nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu, tỷ lệ phần trăm hồng cầu lưới.

– Công thức bạch cầu, đặc điểm hình thái tế bào hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, độ tập trung tiểu cầu và những bất thường trên tiêu bản.

4. Phương pháp phân tích kết quả

4.1. Nguyên tắc

– Quan sát kỹ các đặc điểm hình thái trên tiêu bản máu nhuộm Giemsa, đối chiếu các thông số đo, đếm được (số lượng tế bào các loại, huyết sắc tố,...) với thực tế trên tiêu bản, nếu không phù hợp phải tìm nguyên nhân: do kỹ thuật hay bất thường bệnh lý.

– So sánh các thông số, các đặc điểm quan sát với giá trị tham chiếu tương ứng của người khỏe mạnh, cần lưu ý đến tuổi, giới của bệnh nhân.

– Đối chiếu lâm sàng bao gồm bệnh sử, các triệu chứng thực thể đặc biệt là tình trạng nhiễm trùng, xuất huyết, gan to, lách to, hạch to; tiền sử tiếp xúc, bệnh tật và dùng thuốc của bệnh nhân.

4.2. Cách thu thập dữ liệu

– Hồng cầu: số lượng bình thường, tăng hay giảm; mức độ tăng, giảm? Đặc điểm phân bố trên tiêu bản (bình thường, ngưng kết, chuỗi tiền)? Kích thước đồng đều hay không, nếu không đồng đều thì hồng cầu to hay nhỏ chiếm ưu thế? Hồng cầu bình sắc hay nhược sắc? Hình thái có bình thường không, nếu không bình thường thì phải mô tả các hình thái quan sát được và mức độ nhiều ít của từng

loại (hình bia bắn, hình giọt nước, hình liềm,...). Các thể bất thường trong hồng cầu: thể Jolly, vòng Cabot,... Có hồng cầu non hay không, loại nào là chủ yếu? Hồng cầu lưới bình thường, tăng hay giảm?

– Bạch cầu: số lượng bạch cầu bình thường, tăng hay giảm; mức độ tăng, giảm? Nhận xét từng loại bạch cầu quan sát được trên tiêu bản máu về số lượng và hình thái, đặc biệt lưu ý các bạch cầu có hình thái bất thường: phải cố gắng xác định mức độ biệt hoá, có phải blast không, thuộc loại bạch cầu nào (nhuộm hoá học tế bào khi cần thiết).

– Tiểu cầu: số lượng và độ tập trung tiểu cầu có bình thường không, tăng hay giảm? Nếu tiêu bản làm từ máu chống đông thì thường không đánh giá được độ tập trung tiểu cầu. Kích thước tiểu cầu bình thường, to hay nhỏ? Có tiểu cầu khổng lồ hay không, nhiều hay ít? Trong trường hợp nghi ngờ sinh máu ngoài tuỷ cần tìm xem có mẫu tiểu cầu ở máu hay không?

– Các bất thường khác: ký sinh trùng sốt rét, ấu trùng giun chỉ, ung thư di căn...

4.3. Trả lời kết quả

4.3.1. Số liệu: Ghi đầy đủ các thông số cần thiết (mục 3).

4.3.2. Nhận xét

– Đối với các dữ kiện bình thường: không nhất thiết phải liệt kê đầy đủ, tùy theo từng trường hợp cụ thể mà ghi những đặc điểm cần thiết.

– Đối với các dữ kiện nằm ngoài miền giá trị bình thường thì phải ghi đầy đủ và càng lượng hoá chính xác càng tốt.

4.3.3. Kết luận: Chỉ kết luận khẳng định khi có các yếu tố chắc chắn (ví dụ tìm thấy ký sinh trùng sốt rét). Đa số trường hợp kết quả phân tích huyết đồ chỉ cho phép gợi ý định hướng chẩn đoán (ví dụ nghi ngờ leukemia cấp) hoặc khu trú vấn đề do loại trừ được một hay nhiều khả năng.

4.3.4. Đề nghị: Có thể đề xuất yêu cầu cần thiết cho chẩn đoán bệnh (ví dụ đề nghị điện di huyết sắc tố khi huyết đồ gợi ý một tan máu bẩm sinh).

TUỶ ĐỒ

1. Khái niệm

Tuỷ đồ là xét nghiệm phân tích số lượng và hình thái các tế bào tuỷ xương để thăm dò chức năng tạo máu cũng như gợi ý các nguyên nhân gây rối loạn chức năng tạo máu tại tuỷ xương.

2. Dụng cụ, hoá chất

Bộ dụng cụ sát trùng tại chỗ: Cồn iod 5%, cồn 70⁰, bông,...

Bơm tiêm 5 - 10 ml.

Kim chọc tuỷ.

Ống nghiệm có EDTA (K₂ hoặc K₃) khô.

Vật liệu cầm máu.

Bộ dụng cụ làm tiêu bản tuỷ, nhuộm Giemsa và hồng cầu lưới.

Máy đếm tế bào hoặc các thiết bị thay thế (quang phổ kế, ly tâm vi thể tích, potain).

Kính hiển vi quang học.

Xylocain 2%.

Thuốc nhuộm Giemsa và hồng cầu lưới.

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Chuẩn bị

Phòng thủ thuật phải sạch, dụng cụ phải vô trùng: kim chọc tuỷ, kim lấy máu, gạc thấm máu...

Bệnh nhân phải được chuẩn bị tinh thần trước khi làm thủ thuật, giải thích về sự cần thiết của thủ thuật.

Thủ test thuốc tê.

3.2. Vị trí chọc

– Gai chậu sau trên: Bệnh nhân nằm sấp thoải mái, kẻ nối hai mào chậu với nhau, kẻ tiếp một đường nối đỉnh xương cụt với mào chậu ở đường nách giữa, làm thành một tam giác xương cụt-chậu-cột sống. Điểm chọc nằm chính giữa đường phân giác của tam giác trên kẻ từ góc cột sống-chậu. Đơn giản hơn, sờ tay vào vùng gai chậu sau trên (điểm lõm khi bệnh nhân nằm sấp) sẽ thấy một điểm gồ lên, đó chính là điểm chọc.

– Xương ức: Khoảng liên sườn 2-3 trên đường chính giữa.

– Ngoài ra, có thể chọc ở gai chậu trước trên, phần trên trong của đầu trên xương chày, phía trong giữa xương gót.

3.3. Thủ thuật

– Xác định vị trí chọc.

– Sát trùng da theo hình xoáy ốc từ điểm mốc ra xung quanh bán kính 5 cm bằng cồn iod, sau đó bằng cồn 70⁰.

– Gây tê tại chỗ từng lớp bằng 1ml xylocain, bắt đầu từ dưới da đến màng xương, chờ 2-3 phút.

– Cầm kim chọc tủy bằng hai ngón cái và trỏ, lòng bàn tay tỳ lên đốc kim. Đưa kim qua da đúng vào điểm gây tê bằng cách xoay nhẹ nhàng nghiêng 45° so với mặt da, sau đó dựng đứng kim chọc qua phần cơ, khoan nhẹ trên màng xương, nếu bệnh nhân không đau tiếp tục khoan qua bản xương cứng, khi có cảm giác xóp hơn, khoan tiếp 3-5mm, lay nhẹ kim nếu thấy chắc thì dừng tại đó.

– Rút nòng thông để vào hộp vô trùng.

– Lắp bơm tiêm cẩn thận.

– Hút gọn, áp lực vừa phải (0,5 ml) bệnh nhân cảm thấy hơi đau, khi gần đủ số lượng 0,5 ml dịch tủy, nối lỏng bơm tiêm hút tiếp cho đủ số lượng.

– Rút bơm tiêm, lắp nòng thông lại và rút kim.

Bơm 0,3 ml dịch tủy vào ống nghiệm có chống đông khô, lắc nhẹ để đếm số lượng tế bào tủy và ủ hồng cầu lưới; 0,2 ml lên một lam kính, kéo 8 tiêu bản. Cũng có thể làm thêm tiêu bản áp nếu cần thiết.

– Để tiêu bản khô tự nhiên trong phòng xét nghiệm (mát, khô), nhuộm Giemsa hai thì.

4. Phân tích kết quả

4.1. Nguyên tắc

– Về cơ bản giống như nguyên tắc phân tích huyết đồ.

– Cần đối chiếu các dữ liệu thu thập được giữa máu ngoại vi và dịch hút tủy xương của bệnh nhân trong cùng thời điểm.

4.2. Quan sát toàn bộ tiêu bản nhuộm Giemsa bằng vật kính x 10

– Đánh giá mật độ tế bào có nhân và đặc điểm phân bố của tế bào kể cả hồng cầu trưởng thành.

– Tìm kiếm mẫu tiểu cầu và các tế bào kích thước lớn (ung thư di căn).

– Lựa chọn cách thức tính tỷ lệ phần trăm các tế bào có nhân.

4.3. Quan sát bằng vật kính dầu x 100

– Xem xét kỹ khu vực đầu, đuôi, trung tâm và hai cạnh tiêu bản nhuộm Giemsa để rút ra những nhận định về đặc điểm số lượng, hình thái tế bào và tình trạng biệt hoá của mỗi dòng tế bào cũng như tương quan phát triển của các dòng tế bào.

– Tìm hình thể bất thường: ung thư di căn, ký sinh trùng... Nếu có blast, phải căn cứ vào hình thái và hoá học tế bào để xác định xem blast thuộc dòng nào (dòng hạt, lympho, mono,...).

– Lập công thức tủy từ 100-500 tế bào có nhân tùy theo mục đích chẩn đoán hay nghiên cứu. Tính chỉ số trưởng thành của dòng hạt, dòng hồng cầu và tỷ lệ nguyên hồng cầu/bạch cầu hạt.

– Lập công thức mẫu tiểu cầu từ 100 mẫu tiểu cầu nếu bệnh nhân có giảm tiểu cầu ngoại vi.

4.4. Trả lời kết quả

4.4.1. Bản trả lời kết quả: ngoài các số liệu cụ thể phải nêu nhận xét về số lượng và hình thái tế bào tuỷ và các bất thường (nếu có).

- Chất lượng của tiêu bản.
- Mức độ giàu - nghèo của tuỷ xương.
- Phân tích số lượng và hình thái các dòng tế bào bình thường.
- Các bất thường nếu có.

4.4.2. Kết luận

- Khẳng định chẩn đoán.
- Khu trú phạm vi hoặc định hướng tìm kiếm chẩn đoán.
- Loại trừ một hay nhiều khả năng.
- Một số ít trường hợp không kết luận được.

4.4.3. Đề nghị: Trong một số trường hợp có thể ghi yêu cầu cần thiết cho chẩn đoán bệnh nếu kết quả tuỷ đồ không khẳng định được chẩn đoán.

HOÁ HỌC TẾ BÀO

Hoá học tế bào là phương pháp khảo sát một số thành phần có chứa trong các không bào nằm trong bào tương của tế bào, dưới kính hiển vi quang học sau khi làm hiện màu bằng các thuốc nhuộm hoặc các cơ chất thích hợp.

1. Nguyên tắc chung

1.1. Tất cả các phương pháp nhuộm hoá học tế bào đều bao gồm ba giai đoạn

1.1.1. Cố định: Ngoài mục đích cố định tế bào trên tiêu bản, đối với mỗi phương pháp nhuộm phải lựa chọn hoá chất cố định hợp lý để bảo tồn tối đa thành phần cần khảo sát: ví dụ các không bào mỡ trong nhuộm sudan đen, men peroxydase trong nhuộm peroxydase,...

1.1.2. Nhuộm: Dùng các thuốc nhuộm (sudan đen) hay các cơ chất (benzidin, α naphthol AS acetat,...) để trực tiếp hoặc gián tiếp làm hiện màu các thành phần cần khảo sát.

1.1.3. Tạo nền: Dùng một thuốc nhuộm làm hiện màu hình thái tế bào (nhân và bào tương) trên tiêu bản. Màu nền phải có độ tương phản cần thiết để giúp quan sát thuận lợi các hạt dương tính trong mỗi phương pháp nhuộm.

1.2. Phải loại bỏ hết chất nhuộm hay cố định và để khô tiêu bản trước khi chuyển sang bước tiếp theo

1.3. Đọc kết quả

1.3.1. Đánh giá mức độ dương tính

- Độ 0: Không có hạt bắt màu hoá học tế bào là (-)
- Độ 1: Các hạt bắt màu chiếm khoảng $\leq 1/3$ bào tương tế bào là (+)
- Độ 2: Các hạt bắt màu chiếm khoảng $>1/3$ đến $< 3/4$ bào tương tế bào là (++)
- Độ 3: Các hạt bắt màu chiếm hết bào tương tế bào là (+++)
- Độ 4: Các hạt bắt màu chiếm hết bào tương và đè lên cả nhân tế bào là (++++)

1.3.2. **Tính điểm (score):** Đánh giá mức độ dương tính hoá học tế bào của 100 tế bào cần nghiên cứu. Giả sử tỷ lệ phần trăm tế bào ở các độ 0, 1, 2, 3, 4 tương ứng với a, b, c, d, e thì công thức tính điểm như sau:

$$\text{Score} = (a \times 0) + (b \times 1) + (c \times 2) + (d \times 3) + (e \times 4)$$

2. Giá trị của hoá học tế bào

– Hỗ trợ phương pháp hình thái học để xác định dòng tế bào, mức độ biệt hoá tế bào trong phân loại lơ xê mi cấp, hội chứng rối loạn sinh tuỷ và các bất thường khác.

– Trong một số trường hợp đặc biệt, hoá học tế bào giúp xác định một quần thể tế bào có phải blast hay không: ví dụ các microblast dòng hạt trên tiêu bản Giemsa giống như lympho rối loạn hình thái.

3. Biểu hiện hoá học tế bào của một số dòng tế bào máu

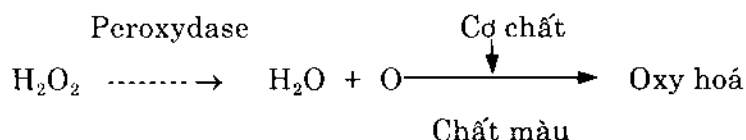
Bảng 1.3: Phản ứng hoá tế bào của các tế bào máu

Phương pháp \ Tế bào	Dòng hạt	Dòng mono	Dòng hồng cầu	Dòng lympho
Peroxydase	+++	$\pm \rightarrow ++$	-	-
Sudan đen	+++	$+$ $\rightarrow$ ++	-	-
Esterase đặc hiệu	+++	-	-	-
Esterase không đặc hiệu	++	+++	-	$- \rightarrow \pm$
Esterase không đặc hiệu có NaF	$\pm \pm \rightarrow ++$	$- \rightarrow \pm$	-	$- \rightarrow \pm$
PAS	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$- \rightarrow +++$
LAP	+++	-	-	-
Perls	-	-	$- \rightarrow +$	-

4. Một số phương pháp nhuộm hoá học tế bào

4.1. Nhuộm peroxylase (Phương pháp cải tiến của Nguyễn Văn Tính)

4.1.1. Cơ chế: Dưới tác dụng của peroxylase, hydrogen peroxyl (H_2O_2) sẽ giải phóng ra một oxy nguyên tử, oxy hoá cơ chất (benzidin) tạo chất tủa màu tương ứng trong bào tương bạch cầu:



4.1.2. Pha dung dịch benzidin 0,1%

- Benzidin: 100mg
- Cồn tuyệt đối: 10ml
- Nước cất vừa đủ 100ml
- Oxy già (30 thể tích): vài giọt

Lắc đều, bảo quản ở nhiệt độ phòng xét nghiệm. Lắc trước khi sử dụng.

4.1.3. Quy trình nhuộm

- Ngâm tiêu bản trong cồn formol 10%: 10 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.
- Nhuộm benzidin 0,1%: 2 - 3 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 1 phút, để khô tự nhiên.
- Nhuộm Giemsa 1/10: 10-12 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 1 phút, để khô.

4.1.4. Đọc kết quả

Phương pháp nhuộm này cho các hạt dương tính màu vàng xỉn (gỉ sắt) trong bào tương tế bào. Tính số lượng tế bào dương tính trong tổng số 100 tế bào cần xem xét. Đối với leukemia cấp thì đó là 100 tế bào blast. Người ta chỉ quan sát để có nhận xét chung về mức độ dương tính chứ không cần thiết tính score trong phương pháp nhuộm peroxylase.

4.2. Nhuộm sudan đen

4.2.1. Cơ chế: Chất màu sudan đen có thuộc tính hoà tan trong lipid, người ta lợi dụng đặc điểm này để phát hiện thành phần lipid có trong tế bào.

4.2.2. Pha dung dịch sudan

- (1): Sudan đen B: 0,1g
Cồn 96^o: 30ml

(2): Dung dịch phenol:

Dung dịch phenol: 2,96ml

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$: 0,06g

Cồn 96°: 6ml

Nước cất: 20ml

Trộn (1) và (2)

4.2.3. Quy trình nhuộm

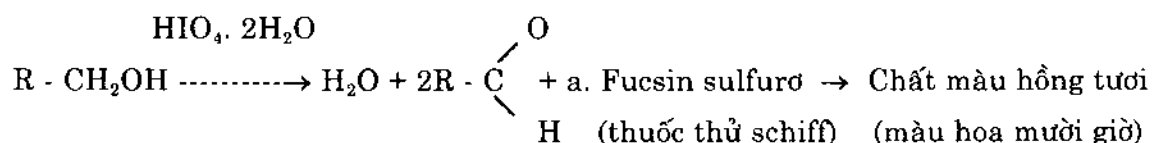
- Cố định tiêu bản bằng hơi formol: 10 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.
- Nhuộm sudan: 25 phút.
- Nhúng cồn 70°: 1/ 2-1 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.
- Nhuộm Giemsa 1/10: 12 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 1 phút, để khô.

4.2.4. Đọc kết quả

Các tế bào dương tính chứa các hạt, cục màu đen trong bào tương và thường chồm lên nhân, có khi che kín cả tế bào. Cách đọc kết quả giống như phương pháp nhuộm peroxidase.

4.3. Nhuộm PAS (Periodic Acid Schiff)

4.3.1. Cơ chế: Dưới tác động của periodic ($\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), nhóm chức rượu của glycogen được chuyển thành aldehyd, sẽ tác dụng với thuốc thử schiff, cho hợp chất màu hồng tươi trong bào tương tế bào.



4.3.2. Pha dung dịch nhuộm

a. Dung dịch periodic 1%

- Periodic: 1g
- Nước cất: 100ml

b. Dung dịch schiff

- Fuchsin basic: 0,5 g
- Nước cất: 100ml / 40-50°C.
- Lắc đều cho tan hết, để nguội, lọc.

- Thêm 0,9 ml acid HCl nguyên chất
- Thêm 0,5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$

Để trong tủ tối 24 giờ, dung dịch chuyển sang màu vàng nhạt.

Bảo quản trong lọ màu ở 4°C để dùng dần.

c. Dung dịch hematoxylin:

- | | |
|----|--|
| 1. | Alun de kali: 25g
Nước cất 350ml (đun sôi cho tan hết)
Thêm 0,5g hematoxylin |
| 2. | Iodat kali (KIO_3): 0,1g
Nước cất: 50ml |

Khi nào (1) đã nguội, trộn (1) và (2), sau đó cho thêm 100ml glycerin nguyên chất.

4.3.3. Quy trình nhuộm

- Ngâm tiêu bản trong formol 10%: 10 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.
- Nhuộm periodic 1%: 10-15 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.
- Nhuộm schiff: 10-12 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.
- Nhuộm hematoxylin: 20 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.

4.3.4. Đọc kết quả

Các tế bào dương tính có các hạt, cục màu đỏ tươi (màu hoa mười giờ) trong bào tương. Các tế bào dương tính lan toả (bào tương có màu đỏ tươi mịn, không có hạt) không có giá trị. Đọc kết quả giống như phương pháp nhuộm peroxylase.

4.4. Nhuộm esterase không đặc hiệu

4.4.1. Cơ chế: Trong điều kiện pH và nhiệt độ thích hợp, naphtol tự do được giải phóng từ cơ chất (ví dụ $\propto$ Naphtol ASD acetate) dưới tác dụng của men esterase của bạch cầu hạt và mono tế kết hợp với muối diazo (tan, không màu) để tạo thành một chất tủa và có màu (azo).

Diazo

Cơ chất $\rightarrow$ Naphtol tự do $\rightarrow$ ↓ Oxy hoá (men esterase)

Azo (màu, tủa)

Tuy nhiên, có sự khác nhau giữa hoạt tính men esterase trong bạch cầu mono và bạch cầu hạt khi thêm NaF vào dung dịch nhuộm: men esterase trong bạch cầu mono bị mất hoạt tính (ức chế) gần như hoàn toàn, ngược lại, hoạt tính men esterase trong bạch cầu hạt hầu như không thay đổi. Chính vì đặc điểm này mà người ta sử dụng hai phương pháp nhuộm esterase không đặc hiệu là ức chế và không ức chế để phân định dòng hạt và mono.

4.4.2. Pha dung dịch nhuộm:

1. Đệm Tris: - Tris: 2,43g
 - Nước cất: 25ml
 - Acid HCl 1N: 18,5ml
 - Nước cất vừa đủ 100ml
2. Dung dịch cơ chất: - ∞ Naphthol -AS acetate: 10mg
 - Propylen glycol: 0,3ml

Trộn 20ml (1) với (2) lắc đều, thêm một ít muối fast blue (≈ 30 mg). Dung dịch có màu vàng chanh, sau đó đem nhuộm ngay.

4.4.3. Quy trình nhuộm

a. Không ức chế

- Cố định bằng hơi formol 40%: 15 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.
- Ủ trong dung dịch nhuộm ở 37°C: 1 giờ.
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.
- Nhuộm Kernetrot: 12 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.
- Chú ý: tiêu bản phải được cố định ngay, càng sớm càng tốt kể từ khi lấy bệnh phẩm ra khỏi cơ thể.

b. Ức chế bằng NaF

- Cố định bằng hơi formol 40%: 15 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.
- Ủ trong dung dịch nhuộm ở 37°C: 1 giờ.
(có thêm NaF vào dung dịch nhuộm: 5mg/ml)
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.
- Nhuộm Kernetrot: 12 phút.
- Rửa dưới vòi nước chảy 30 giây, để khô tự nhiên.

4.4.4. Đọc kết quả

Các tế bào dương tính có hạt màu xanh thẫm trong bào tương. Trong phân loại leukemia cấp, khi đọc kết quả phải tính score.

4.5. Nhuộm phosphatase kiềm bạch cầu

4.5.1. Cơ chế

Muối phosphat của α naphthol dưới tác động của men phosphatase kiềm bạch cầu trong môi trường có ion magie sẽ giải phóng ra α naphthol. α naphthol kết hợp với muối diazo (fast blue) tạo thành một sản phẩm azo tủa, có màu.

4.5.2. Pha dung dịch nhuộm

- Dung dịch đậm
- + TRIS: 12,5g.
- + Nước cất: 12,5 ml.
- + Acid HCl 1N: 41ml.
- + Nước cất vừa đủ 500 ml, pH = 8,07.
- Dung dịch cơ chất
- + 40 mg α naphthol phosphat.
- + 1, 2 ml N-N dimethyl formamid.
- + Lắc đều cho tan hết.
- + Thêm vào 200 ml dung dịch đậm TRIS.
- + Khi nhuộm cho thêm vào hỗn dịch trên một ít muối fast blue sao cho hỗn dịch có màu xanh hơi nhạt.
- Dung dịch Kernetrot:
- + Nuclear fast red: 0,2g.
- + $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$: 5 g.
- + Nước cất: 100ml

Đun nóng để $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ tan hết trong nước cất, sau đó cho nuclear fast red vào để 5 phút, để nguội, thêm vào vài hạt thymol. Lọc trước khi sử dụng.

4.5.3. Kỹ thuật

- Cố định tiêu bản máu và tủy bằng cồn formol 10%: 15 phút.
- Rửa sạch, để khô.
- Ủ trong dung dịch nhuộm 1 giờ, 37°C.
- Rửa dưới vòi nước chảy, để khô.
- Nhuộm nền bằng dung dịch Kernetrot.
- Chú ý: tiêu bản phải được cố định ngay, càng sớm càng tốt kể từ khi lấy bệnh phẩm ra khỏi cơ thể.

4.5.4. Đọc kết quả

Các tế bào dương tính có hạt màu xám đen trong bào tương. Tính score trong 100 tế bào cần xem xét.

4.6. Nhuộm Perls

4.6.1. Cơ chế

Trong môi trường acid, ion sắt của ferritin (Fe^{+++}) sẽ tác dụng với ferrocyanid tạo ra ferric ferrocyanid có màu xanh phổ (xanh cobalt đậm).

4.6.2. Pha dung dịch nhuộm

Trộn lẫn hai dung dịch sau theo tỷ lệ 1/2:

- Acid HCl 2%: 01 thể tích.
- Dung dịch Potassium Ferrocyanid ($\text{K}_4\text{FeCN}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 2%: 02 thể tích.

4.6.3. Kỹ thuật

- Tiêu bản máu, tuỷ cố định bằng cồn metylic: 10 phút
- Rửa tiêu bản, để khô
- Nhuộm trong dung dịch nhuộm: 30 phút
- Rửa tiêu bản
- Nhúng trong acid HCl 1%.
- Rửa tiêu bản
- Nhuộm nhân bằng dung dịch Kernetrot: 12 phút
- Rửa tiêu bản
- Tiêu bản máu, tuỷ để khô và đọc kết quả

4.6.4. Đọc kết quả

Các tế bào dương tính có hạt hoặc cục màu xanh phổ trong bào tương. Tính score trong tổng số 100 tế bào hồng cầu trưởng thành hoặc nguyên hồng cầu. Ngoài ra, cần tính tỷ lệ phần trăm tế bào nguyên hồng cầu sắt vòng.

SINH THIẾT TỦY XƯƠNG

1. Nguyên lý

Bằng kỹ thuật cắt lát, cố định và nhuộm tổ chức học, sinh thiết tuỷ xương cho phép khảo sát:

- Nước cất: 35ml
- Citrat sodium: 17g/85ml nước cất ấm (40° C)

3.3. Dung dịch Hemalun de mayer

- Alun de kali: 5g
- Hematein: 0,6g
- Acid acetic: 5ml

4. Quy trình kỹ thuật

4.1. Thủ thuật

- Xác định điểm chọc (xem bài tuỷ đồ).
- Sát trùng vùng gai chậu sau trên bằng cồn iod và cồn 70°.
- Gây tê từng lớp, đặc biệt cẩn thận màng xương gai chậu sau trên.
- Chờ 2 phút.
- Dùng hai đầu ngón tay (ngón giữa và trỏ trái) cố định điểm mốc chọc.
- Tay phải cầm kim sinh thiết bằng ngón cái và trỏ, lòng bàn tay tỳ lên đốc nòng kim sinh thiết.
- Đưa kim qua da nhẹ nhàng bằng lực ấn xoay, kim nghiêng 45° so với mặt da.
- Sau khi qua da, dựng kim thẳng đứng khoan nhẹ nhàng qua lớp cơ.
- Xác định lại điểm mốc bằng đầu ngón trỏ trái: dịch chuyển đồng thời da và kim sang một phía.
- Khoan nhẹ kim trên màng xương, nếu bệnh nhân không đau tiếp tục khoan xoáy từ từ qua màng xương, góc quay kim khoảng 10-15°.
- Khi có cảm giác vào phần xốp, tay trái giữ cố định phần vỏ kim, tay phải rút nòng kim.
- Dệm một miếng gạc vô trùng lên đốc kim, tay phải tiếp tục khoan xoáy nhẹ nhàng 1-1,5 cm.
- Lắc nhẹ kim để cắt.
- Xoay kim tại chỗ theo một chiều 2-3 vòng.
- Rút kim bằng cách xoay, cho đến hết phần xương.
- Nghiêng kim, đẩy đồng thời cả kim và phần da sang phải 0,5-1cm bằng tay phải và hai ngón (trỏ và giữa) trái, ấn chặt ngón giữa trái vào hố sinh thiết.
- Rút kim qua da, cầm máu, dán băng.
- Thả mảnh sinh thiết vào dung dịch cố định.

4.2. Xử lý mảnh sinh thiết

- | | |
|--------------------------------|----------|
| Cố định trong dung dịch Helly: | 5-6 giờ. |
| Rửa dưới vòi nước chảy: | 1 giờ. |

Khử calci bằng dung dịch Custer:	12 giờ.	
Rửa dưới vòi nước chảy:	1 giờ.	
Loại nước bằng cồn:	Cồn 90°	30 phút
	Cồn tuyệt đối I	1 giờ
	Cồn tuyệt đối II	1 giờ
	Cồn tuyệt đối III	3 giờ
Loại cồn bằng xylen:	Xylen I	30 phút
	Xylen II	90 phút
	Xylen III	90 phút
Vùi bệnh phẩm trong paraffin ở 60 °C	12 giờ.	
Đúc khuôn.		
Cắt tiêu bản chiều dày 2-2,5µm.		

4.3. Nhuộm sinh thiết (phương pháp H&E)

- Tẩy nấn bằng xylen 3 lần: 5 phút 1 lần
- Chuyển qua cồn 100°, 95°, 80°: 5 phút 1 lần
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Phủ tiêu bản bằng dung dịch lugol: 10 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Phủ tiêu bản bằng dung dịch Na₂S₂O₃: 5 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Nhuộm trong dung dịch hemalun de mayer: 3-5 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Nhúng tiêu bản trong dung dịch cồn-HCl 1%: vài giây
- Phủ tiêu bản bằng dung dịch Na₂CO₃ 1%: 1 phút
- Rửa dưới vòi nước chảy: 10 phút
- Nhuộm trong dung dịch eosin 1%: 1 phút
- Rửa nước nhanh
- Tẩy tiêu bản bằng cồn tuyệt đối, làm trong bằng xylen, gắn lá kính

5. Phương pháp phân tích kết quả

5.1. Tiêu chuẩn tiêu bản sinh thiết

Dài 1-1,5 cm.

Có ít nhất 10 khoang sinh máu.

Một lớp tế bào.

Giữ nguyên vẹn cấu trúc mô bệnh học tủy xương.

Thể hiện được đặc điểm tế bào và mô sinh máu.

5.2. Nguyên tắc

– Quan sát tổng thể (bằng vật kính x 4 hoặc x 10) cấu trúc khoang tạo máu và các thành phần có kích thước lớn như mẫu tiểu cầu, di căn ung thư trước khi quan sát chi tiết hình thái tế bào bằng vật kính x 40.

– So sánh các dữ liệu thu thập được với người bình thường cùng tuổi, giới.

– Trong nhiều trường hợp, cần đối chiếu với lâm sàng và kết quả huyết tủy đồ (nếu có).

5.3. Cách thu thập dữ liệu

5.3.1. Đánh giá chung (vật kính x 4)

– Kích thước mảnh sinh thiết có đủ để đánh giá tình trạng bệnh lý cụ thể hay không.

– Có sai sót kỹ thuật như ép tủy quá mạnh, chạm mạch máu, hay xé rách khoang tạo máu không?

– Có những thay đổi cấu trúc lớn như di căn ung thư, hoặc u lympho hay không?

5.3.2. Đánh giá chi tiết (vật kính x 40)

– Cấu trúc khoang tạo máu, bao gồm:

+ Kích thước và đặc điểm của bè xương: Có thể bị rỗng đi (rỗ xương) hoặc dày lên. Bình thường tạo cốt bào nằm trong các bè xương, hầu như không gặp hủy cốt bào.

+ Mật độ và phân bố tế bào: Đánh giá sơ bộ tỷ lệ tế bào tạo máu và tế bào đệm (xơ, mỡ) trên toàn bộ tế bào tủy. Bình thường khu vực tế bào tạo máu chiếm khoảng 60-70% diện tích sinh máu, càng lớn tuổi tổ chức mỡ càng phát triển.

– Tỷ lệ dòng hạt/dòng hồng cầu: Bình thường 2/1 - 4/1.

– Mức độ trưởng thành của dòng hạt và dòng hồng cầu: Tỷ lệ trưởng thành của dòng hạt và dòng hồng cầu bình thường khoảng 1/4.

– Dòng mẫu tiểu cầu: Bình thường có 1-4 MTC/ vi trường x40. Khi số lượng mẫu tiểu cầu gấp 3-4 lần bình thường mới được coi là tăng mẫu tiểu cầu.

– Lymphocyt: Bình thường chiếm khoảng 5% tế bào tủy, nằm rải rác trong khoang tạo máu không theo quy luật. Ở người trên 40 tuổi, lymphocyt chiếm khoảng 10-15%.

– Plasmocyt: dưới 5% tế bào tủy, thường nằm cạnh thành mạch máu.

– Đại thực bào: Tỷ lệ rất ít, bào tương mờ nên khó phát hiện trên các tiêu bản sinh thiết. Khi quan sát thấy đại thực bào là chứng tỏ tăng đại thực bào.

– Dự trữ sắt: Nhuộm Perls.

- Sợi liên võng: Nhuộm Gomogi và Van Gieson.
- Xâm nhập của các tế bào ngoài tuỷ xương (lành tính hoặc ác tính).

5.4. Trả lời kết quả

Là một bản mô tả kèm theo nhận xét dựa trên cơ sở phân tích khách quan những chi tiết cụ thể, có thể minh hoạ bằng số liệu gồm:

- Vị trí sinh thiết, các điểm đặc biệt khi làm thủ thuật (xương xốp, cứng,...) và đặc trưng cơ bản về tiêu chuẩn của tiêu bản.
- Đặc điểm cấu trúc và thành phần khoang tạo máu (kích thước bề xương và khoang sinh máu, mật độ và đặc điểm phân bố tế bào...).
- Đặc điểm về hình thái học và tương quan số lượng của các dòng tế bào, bao gồm cả xơ, mỡ, huỷ cốt bào và tạo cốt bào.
- Tình trạng xâm nhập của các tế bào ngoài tuỷ, đặc biệt là di căn ung thư.

HẠCH ĐỒ

1. Nguyên lý

Hạch đồ là một xét nghiệm tế bào học cần thiết trong phần lớn các trường hợp hạch to, nhất là đối với các trường hợp nghi ngờ ác tính hoặc viêm đặc hiệu. Thông qua việc chọc hút và làm tiêu bản, có thể đánh giá được thành phần và tỷ lệ tế bào trong hạch. Là xét nghiệm thăm dò trực tiếp, hạch đồ rất có giá trị cho chẩn đoán xác định.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Bộ dụng cụ sát khuẩn và cầm máu tại chỗ.
- Bơm tiêm 5-10ml, kim tiêm loại 20 G x 1 $\frac{1}{2}$ hoặc lớn hơn.
- Phiến kính làm tiêu bản.
- Bộ dụng cụ nhuộm Giemsa.
- Kính hiển vi quang học.

3. Quy trình kỹ thuật

- Lựa chọn hạch: tốt nhất là các hạch ngoại biên nằm phía trên cơ hoành, trường hợp đặc biệt mới chọc hạch dưới cơ hoành. Phải cân nhắc rất kỹ khi chọc các hạch ở sâu (nguy cơ chảy máu cao) như hạch ổ bụng, trung thất.

- Sát khuẩn tại chỗ.
- Cố định hạch bằng ngón trỏ và ngón cái tay trái. Tay phải cầm bơm tiêm lấp sẵn kim, chọc nhẹ nhàng qua da, khi chọc qua vỏ hạch sẽ có cảm giác mật độ

chắc hơn. Tuỳ theo kích thước hạch to hay nhỏ mà quyết định độ sâu của kim. Nói chung, nên chọc vào hạch 0,5-1 cm hoặc đến vùng trung tâm hạch. Hút mạnh 4-5 lần (áp lực -5 đến - 8 ml), nếu hạch có mật độ chắc thì có thể giữ bơm tiêm ở áp lực âm quay bơm tiêm 2-3 vòng đồng tâm. Thả từ từ pit tông của bơm tiêm cho đến khi hết áp lực âm. Rút bơm tiêm và kim tiêm. Bơm nhẹ chất hạch lên phiến kính, dàn tiêu bản.

- Để khô tiêu bản tự nhiên, cố định nhuộm Giemsa.
- Kèm theo hạch đồ, người ta thường làm hai tiêu bản máu ngoại vi để so sánh khi cần thiết.

4. Đọc kết quả

- Dùng vật kính x 4 và x 10 quan sát toàn bộ tiêu bản. Nên xem nhiều tiêu bản chọc hút. Chọn các tiêu bản giàu tế bào, các tiêu bản nghi ngờ để quan sát kỹ.
- Quan sát chi tiết tế bào trong các tiêu bản đã lựa chọn bằng vật kính x 40, trường hợp đặc biệt mới cần dùng vật kính x 100.
- Thành phần tế bào của hạch bình thường như sau:
Tế bào lympho: 90 - 99%, trong đó 90 - 98% là lymphocyt.
Tế bào có thể gặp nhưng tỷ lệ rất thấp là liên võng, monocyt, plasmocyt, tổ chức bào, mastocyt.

SINH THIẾT HẠCH

1. Nguyên lý

Trong một số trường hợp bệnh lý, hạch đồ không đủ dữ kiện thuyết phục chẩn đoán, cần thiết làm sinh thiết hạch. Là một xét nghiệm mô bệnh học, sinh thiết hạch cho phép quan sát cấu trúc hạch, hình thái và phân bố tế bào trong hạch.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Bộ dụng cụ sát trùng da.
- Bộ dụng cụ tiểu phẫu.
- Bộ dụng cụ cầm máu tại chỗ, bao gồm cả kim và chỉ khâu.
- Bộ dụng cụ chuyển đúc, cắt và nhuộm tiêu bản mô.
- Kính hiển vi quang học.

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Lấy hạch

- Lựa chọn hạch: chọn hạch ngoại biên nông, kích thước vừa hoặc nhỏ (đường kính dưới 2 cm), tốt nhất ở phía trên cơ hoành.
- Thông thường lấy cả hạch, chỉ cắt một phần khi hạch quá to.

3.2. Xử lý hạch và làm tiêu bản

- Cắt hạch theo chiều dọc thành 2-3 mảnh tùy kích thước hạch.
- Cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm theo quy trình kỹ thuật làm tiêu bản tổ chức mô mềm.

4. Đọc kết quả

- Quan sát tiêu bản ở vật kính nhỏ (x 4 hoặc x 10) để có nhận xét tổng thể về cấu trúc hạch và đặc điểm phân bố tế bào.
- Quan sát tiêu bản ở vật kính x 40 để xem xét thành phần và hình thái tế bào.

LÁCH ĐỎ

1. Nguyên lý

Bằng việc chọc hút và làm tiêu bản có thể quan sát được thành phần tế bào trong lách, giúp cho chẩn đoán một số bệnh, nhất là ở bệnh nhân có lách to.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Bộ dụng cụ sát khuẩn và cầm máu tại chỗ.
- Bơm tiêm 5-10ml, kim tiêm loại 20 G x 1 $\frac{1}{2}$ hoặc lớn hơn.
- Lam kính làm tiêu bản.
- Bộ dụng cụ nhuộm Giemsa.
- Kính hiển vi quang học.

3. Quy trình kỹ thuật

- Chuẩn bị bệnh nhân: Trong trường hợp bệnh nhân có các xét nghiệm về đông máu không bình thường, cần cân nhắc kỹ chỉ định chọc lách, phải lường trước biến chứng chảy máu trong ổ bụng sau khi tiến hành thủ thuật, nhất là ở bệnh nhân lách to đã lâu ngày.

- Bệnh nhân nằm ngửa, thoải mái.
- Chọn vị trí chọc: Thường chọc vào móm lách trên đường nách trước.
- Sát trùng vị trí chọc.
- Chọc nhẹ nhàng kim đã lắp sẵn bơm tiêm đến hết chiều dày thành bụng. Cho bệnh nhân hít sâu và nín thở, chọc thật nhanh vào lách, hút 1-3 lần với áp lực từ -5ml đến -8 ml, thả pit tông cho hết áp lực âm, rút bơm tiêm cùng kim tiêm. Cho bệnh nhân thở bình thường.

- Bơm chất hút được ra lam kính, làm tiêu bản như kỹ thuật máu dàn, nhuộm Giemsa.
- Bệnh nhân cần nằm bất động 2 giờ. Bàn giao cho bác sĩ điều trị theo dõi bệnh nhân.
- Kèm theo lách đồ, người ta thường làm hai tiêu bản máu ngoại vi để so sánh khi cần thiết.

4. Đọc kết quả

- Dùng vật kính x 4 và x 10 quan sát toàn bộ tiêu bản. Nên xem nhiều tiêu bản chọc hút. Chọn các tiêu bản giàu tế bào, các tiêu bản nghi ngờ để quan sát kỹ.
- Quan sát chi tiết tế bào trong các tiêu bản đã lựa chọn bằng vật kính x 40, trường hợp đặc biệt mới cần dùng vật kính x100.
- Thành phần tế bào của lách bình thường như sau:
Tế bào lympho: 50 - 60%.
Bạch cầu đoạn: 20 - 30%.
Tế bào liên võng: 10 -15%
Ngoài ra, có thể gặp tế bào tổ chức lách, tế bào biểu mô, tế bào thực bào với tỷ lệ rất ít.

XÉT NGHIỆM TÌM TẾ BÀO HARGRAVE

1. Nguyên lý

Kháng thể tự sinh trong huyết thanh kết hợp với kháng nguyên tương ứng của màng nhân tế bào, dưới tác động của bổ thể, làm tổn thương màng nhân, tạo thành khối thuần nhất. Bạch cầu đoạn trung tính thực bào phức hợp này tạo ra “tế bào Hargrave”.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Bơm tiêm 3 ml.
- Ống nghiệm 5 ml.
- Máy lắc ống nghiệm.
- Bi nhựa nhỏ.
- Bộ dụng cụ làm tiêu bản máu dàn.
- Bộ dụng cụ và hoá chất nhuộm Giemsa.

3. Quy trình kỹ thuật

- 3 ml máu tĩnh mạch chống đông bằng heparin (20 đơn vị / ml).
- Trộn đều, để bơm tiêm thẳng đứng quay kim lên trên trong 60 phút.
- Bẻ cong kim, bơm nhẹ nhàng một nửa phần huyết tương ra một ống nghiệm khô và sạch (ống 1). Phần lắng giữa khối hồng cầu và huyết tương được bơm ra một ống nghiệm khác, trộn đều và được chia thành hai phần: một nửa để nguyên (ống 2), còn một nửa đem lắc bi trong 15 phút (ống 3).
- Hoà lẫn ống 1, ống 2, ống 3. Lắc trộn đều nhẹ nhàng, ủ 37°C trong 60 phút.
- Lắc đều, ly tâm nhẹ lấy cặn kéo 4 tiêu bản và nhuộm Giemsa như tiêu bản máu đàn.

4. Kết quả

Tế bào Hargrave được tạo ra do bạch cầu đoạn trung tính thực bào một nhân đang thoái hoá. Nhân thoái hoá là một khối thuần nhất tròn, to, màu gạch non trên tiêu bản nhuộm Giemsa. Các đoạn nhân (2-4 đoạn) của bạch cầu thực bào bị đẩy dạt ra xung quanh khối thuần nhất tạo nên hình "hoa hồng". Bào tương của bạch cầu đoạn trung tính thực bào rất mờ nhạt, khó quan sát trên tiêu bản nhuộm Giemsa. Phải đọc ít nhất 2 tiêu bản (xem toàn bộ tiêu bản) mới đủ kết luận. Cách trả lời kết quả tốt nhất là có hay không thấy tế bào Hargrave? Nếu có thì mỗi tiêu bản có bao nhiêu tế bào Hargrave (tính trung bình).

TÌM KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT

I. CĂN CỨ ĐỂ CHẨN ĐOÁN SỐT RÉT

1. Dịch tễ

Bệnh nhân có ở vùng sốt rét lưu hành hay không ?

2. Triệu chứng lâm sàng

- Bệnh nhân có:
- + Sốt cao
- + Nhức đầu
- + Rét run
- + Ớn lạnh
- + Vã mồ hôi
- + Đau toàn thân

- Côn sốt rét điển hình thường gặp ở người chưa có miễn dịch hoặc miễn dịch yếu
- Côn sốt rét không điển hình thường gặp ở người có miễn dịch hoặc là dân sống ở vùng sốt rét lưu hành

3. Xét nghiệm máu tìm ký sinh trùng sốt rét (KSTSR)

Là yếu tố quan trọng nhất. Khi KSTSR được người xét nghiệm tìm thấy trong máu, lúc đó mới khẳng định là bệnh nhân mắc sốt rét

- Ưu điểm:
 - + Nhanh, chính xác, phân loại được KST
 - + Đơn giản, rẻ tiền
- Nhược điểm:
 - + Bệnh nhân ít KSTSR thì khó phát hiện
 - + Bệnh nhân đã điều trị sốt rét nên không điển hình
 - + Phụ thuộc khả năng chẩn đoán của người xét nghiệm

4. Các kỹ thuật miễn dịch

Khắc phục được nhược điểm trên nhưng đòi hỏi những trang thiết bị hiện đại, đắt tiền.

II. KỸ THUẬT TÌM KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT TRONG MÁU

1. Phương tiện dụng cụ

- Lam kính khô, sạch.
- Bút chì ghi tiêu bản.
- Kim chích máu.
- Dụng cụ sát khuẩn: bông, cồn.
- Giá để tiêu bản.
- Kính hiển vi quang học.
- Dầu soi kính.
- Giemsa, ống đông, đĩa thủy tinh, pipette nhỏ dung dịch.
- Cồn tuyệt đối.
- Nước cất pha dung dịch Giemsa pH trung tính.

2. Quy trình kỹ thuật

2.1. Có hai loại tiêu bản máu để xét nghiệm ký sinh trùng sốt rét

- Tiêu bản giọt dày (giọt đặc): gồm nhiều lớp hồng cầu nên KST có mặt sẽ tập trung trên một diện nhỏ hơn và như vậy sẽ tìm thấy KST nhanh hơn qua kính hiển vi.

– Tiêu bản máu đàn (giọt mỏng): thường gồm một lớp hồng cầu, sau khi đã tìm thấy KST sốt rét ở giọt dày thì xem tiêu bản giọt đàn để phân loại KST SR.

Có thể làm cả giọt dày và máu đàn trên cùng một tiêu bản, hai giọt cách nhau khoảng 0,5 cm.

2.2. Các bước kỹ thuật: Có thể lấy từ ống máu có chống đông hoặc lấy trực tiếp máu mao mạch:

– Sát khuẩn đầu ngón tay (thường lấy máu ở ngón nhẫn, trẻ nhỏ có thể lấy ở gót chân hoặc ngón chân cái).

– Dùng kim chích sâu đúng cỡ quy định.

– Bóp nhẹ cho máu chảy rồi chấm lên phiến kính 1 giọt khoảng 3 - 5 μ l, làm tiêu bản máu đàn.

– Chấm một giọt máu lên một phiến kính khác làm tiêu bản giọt đặc.

– Để tiêu bản khô tự nhiên. Ghi tên bệnh nhân vào đầu tiêu bản.

– Cố định tiêu bản máu đàn bằng cồn tuyệt đối. Không cố định tiêu bản giọt đặc.

– Để khô tự nhiên rồi nhuộm Giemsa 3 % - 4% trong 45 phút.

– Rửa sạch bằng nước thường. Chú ý: để nguyên Giemsa, cho nước chảy nhẹ vào góc trên tiêu bản để không làm bong máu. Dựng tiêu bản lên giá.

– Để khô tự nhiên.

* Có thể nhuộm nhanh bằng cách pha dung dịch Giemsa 10% để trong 10 - 15 phút. Rửa sạch và làm khô nhanh bằng máy sấy tóc hoặc đèn.

3. Đọc kết quả

Dựa vào hình thái của ký sinh trùng sốt rét trong hồng cầu (nếu có) để kết luận.

3.1. Hình thái các giai đoạn phát triển của KSTSR (xem hình 1.4; 1.5; 1.6)

3.2. Phân loại KSTSR: có 4 loại

– *Plasmodium falciparum* : Thường gặp nhất ở Việt Nam

– *Plasmodium vivax* : Thường gặp

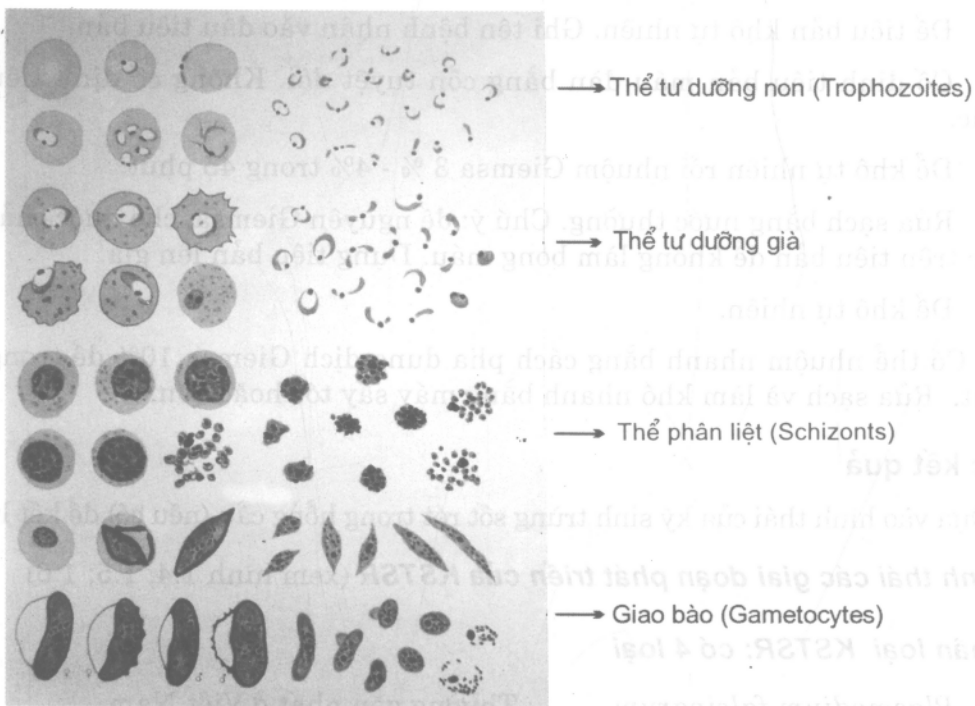
– *Plasmodium malariae* : Ít gặp

– *Plasmodium ovale* : Hiếm gặp

Sau đây là một số đặc điểm của hai thể KSTSR thường gặp nhất ở nước ta (*falciparum*)

Bảng 1.4: Một số đặc điểm ký sinh trùng *P. falciparum* và *P. vivax*:

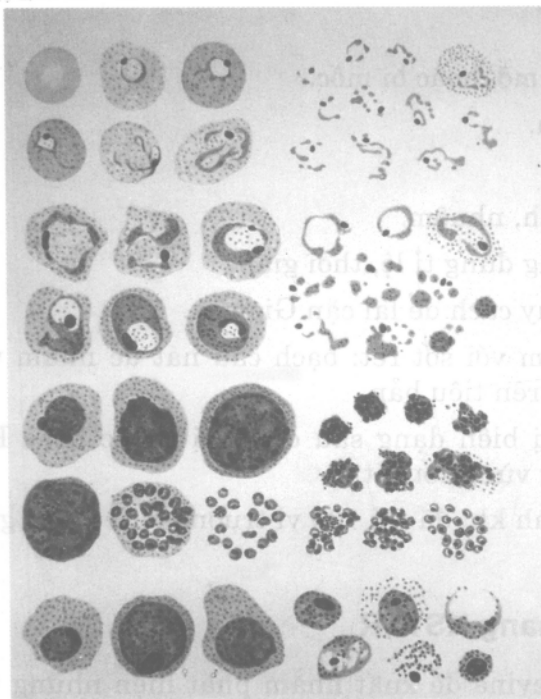
Thể	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>
1. Tư dưỡng	Hình nhẵn, dấu phẩy, chấm than Nhân mảnh, nhỏ, có thể có 2 nhân Nguyên sinh chất đồng đều	Hình nhẵn, méo mó, đa dạng Nhân thô, to Nguyên sinh chất dày, đứt đoạn
2. Hoa thị 3. Giao bào	Ít gặp ở máu ngoại vi Hình quả chuối, hình liềm Nhiều sắc tố hình que đen hoặc tảng đen	Hay gặp ở máu ngoại vi Hình to tròn Có nhiều sắc tố vàng phủ lên NSC màu xanh
4. Hồng cầu vật chủ	Không thay đổi, số ít co nhỏ Có hạt Maurer nhỏ mịn	Trương to Có hạt Schuffner thô, to
5. Sắc tố	Hình que, đen	Hình trứng, nâu vàng



Hình 1.4: Hình thái các giai đoạn phát triển của *Plasmodium falciparum* trên tiêu bản giọt đàn, giọt dầy

3.3. Sơ bộ đánh giá kết quả

- (+): có 1 - 10 KST SR/100 vi trường ở tiêu bản giọt đặc
- (++) : 11 - 100 KST SR/100 vi trường ở tiêu bản giọt đặc
- (+++) : 1 - 10 KST SR / 1 vi trường ở tiêu bản giọt đặc
- (++++): trên 10 KST SR / 1 vi trường ở tiêu bản giọt đặc



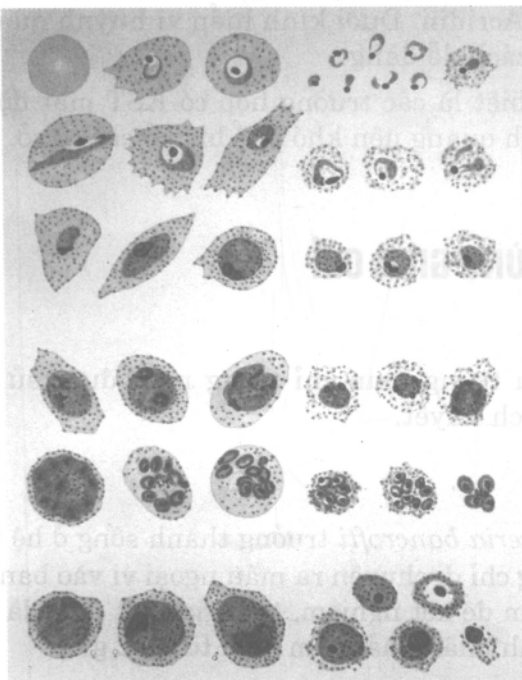
→ Thể tư dưỡng non (Trophozoites)

→ Thể tư dưỡng già

→ Thể phân liệt (Schizonts)

→ Giao bào (Gametocytes)

Hình 1.5: Hình thái các giai đoạn phát triển của *Plasmodium vivax* trên tiêu bản giọt đàn, giọt dầy



→ Thể tư dưỡng non (Trophozoites)

→ Thể tư dưỡng già

→ Thể phân liệt (Schizonts)

→ Giao bào (Gametocytes)

Hình 1.6: Hình thái các giai đoạn phát triển của *Plasmodium ovale* trên tiêu bản giọt đàn, giọt dầy

4. Những sai sót thường gặp

- Phiến kính không sạch, còn mỡ, hoặc bị mốc.
- Phiến kính cũ, bị xước nhiều.
- Tiêu bản bị bẩn.
- Tiêu bản chưa khô đã cố định, nhuộm.
- Pha và nhuộm Giemsa không đúng tỉ lệ, thời gian.
- Rửa tiêu bản không đúng quy cách để lại cặn Giemsa.
- Những hình giả có thể nhầm với sốt rét: bạch cầu nát dễ nhầm với thể hoa thị, tiểu cầu, cặn Giemsa, nấm trên tiêu bản.
- Khó nhận biết vì KSTSR bị biến dạng sau điều trị thuốc hoặc KSTSR kháng thuốc, ở người sống lâu trong vùng sốt rét.

* **Chú ý:** Chỉ kết luận là âm tính khi đã soi 100 vi trường ở tiêu bản giọt đặc mà không tìm thấy KSTSR.

5. Kỹ thuật tập trung hồng cầu mang KSTSR

Là kỹ thuật do Wardlaw và Levine đề xuất nhằm phát hiện những trường hợp ít KST trong máu.

Nguyên lý: Dùng ống mao dẫn có thuốc nhuộm Acridin màu vàng cam để lấy máu bệnh nhân. Sau khi lấy đủ máu thì đập nắp và gắn ống vào phao chất dẻo rất nhỏ. Đem quay ly tâm sẽ thấy chia thành 10 lớp. Lớp hồng cầu được tập trung cao và hồng cầu có KST được nhuộm bằng Acridin. Dưới kính hiển vi huỳnh quang sẽ thấy được KSTSR trong hồng cầu một cách dễ dàng.

Phương pháp này nhạy hơn, đặc biệt là các trường hợp có KST mật độ thấp nhưng đòi hỏi phải có kính hiển vi huỳnh quang nên khó phổ biến ở các cơ sở.

TÌM ẤU TRÙNG GIUN CHỈ

Hiện nay, kỹ thuật phát hiện ấu trùng giun chỉ trong máu được sử dụng rộng rãi để chẩn đoán bệnh giun chỉ bạch huyết.

1. Nguyên tắc

Giun chỉ *Brugia malayi* và *Wuchereria bancrofti* trưởng thành sống ở hệ thống bạch huyết và sinh ra ấu trùng. Ấu trùng chỉ di chuyển ra máu ngoại vi vào ban đêm. Do đó phải lấy máu ngoại vi vào ban đêm để xét nghiệm, thời gian tốt nhất là từ 20 giờ tới 2 giờ sáng. Trước khi lấy máu, bệnh nhân phải nằm nghỉ từ 1 - 2 giờ.

2. Phương tiện và dụng cụ

- Kính hiển vi

- Bông, cồn sát trùng
- Kim chích máu
- Phiến kính khô sạch
- Giemsa, cồn cố định

3. Quy trình kỹ thuật

- Bệnh phẩm là máu tĩnh mạch có chống đông.
- Có thể là máu mao mạch lấy ở đầu ngón tay. Mùa lạnh, nhúng tay vào chậu nước nóng có thể làm tăng lượng ấu trùng trong máu. Sát khuẩn đầu ngón tay bằng cồn 70°. Dùng kim chích cho máu chảy ra. Chấm 3 giọt cách đều nhau lên phiến kính. Dùng góc của một phiến kính khác, đánh 3 giọt máu trên thành 3 giọt đặc, tròn, đường kính khoảng 1,5 cm. Khoảng cách giữa các giọt không xa quá và cũng không dính vào nhau. Để tiêu bản khô tự nhiên, không nên hơi nóng hoặc phơi nắng (sẽ làm ấu trùng co lại hoặc biến dạng hình thể ấu trùng).

Tiêu bản có thể soi tươi trên kính hiển vi bằng vật kính nhỏ x 10 hoặc nhuộm Giemsa 10% trong 10 phút, rửa nhẹ nhàng bằng nước thường. Để khô tự nhiên. Soi bằng vật kính dầu x 100.

Ấu trùng bắt màu tím trên nền màu hồng nhạt, các hạt nhiễm sắc và nhân bắt màu rõ.

XÉT NGHIỆM TẾ BÀO TRONG DỊCH NÃO TUỖ

1. Nguyên lý

Bình thường dịch não tủy trong suốt, có ít tế bào. Số lượng và thành phần tế bào trong dịch não tủy tăng lên ở một số bệnh. Khi đó xét nghiệm tế bào dịch não tủy có thể có giá trị trong chẩn đoán.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Kính hiển vi quang học.
- Buồng đếm.
- Phiến kính khô sạch.
- Pipette Pasteur.
- Dung dịch Giemsa.
- Dung dịch phá vỡ hồng cầu gồm:
 - + Acid acetic : 5 ml
 - + Nước cất vừa đủ: 100 ml
- Dầu soi kính.
- Dụng cụ để lập công thức tế bào.

3. Quy trình kỹ thuật

Lắc nhẹ bệnh phẩm (dịch não tủy), cho vào 2 ống nghiệm, mỗi ống 1 - 2 ml.

3.1. Đếm số lượng bạch cầu

– Nhỏ vào ống thứ nhất 2 - 3 giọt dung dịch phá vỡ hồng cầu, lắc đều. Sau đó, lấy một giọt cho vào buồng đếm, để lắng 5 phút rồi đếm số lượng bạch cầu trên kính hiển vi.

– Với buồng đếm Nageotte: loại buồng đếm để đếm tế bào trong dịch não tủy có thể tích chung 50 mm^3 . Chia làm 40 băng kẻ theo chiều ngang buồng đếm, mỗi băng có thể tích = $1,25 \text{ mm}^3$. Đếm số bạch cầu trên 4 băng được bao nhiêu chia cho 5 để có số lượng bạch cầu trong 1 mm^3 .

– Với buồng đếm Goriacep: đếm số lượng bạch cầu trong các khu vực dùng đếm bạch cầu, được bao nhiêu nhân với 62,5 rồi chia cho 25, sẽ có số lượng bạch cầu trong 1 mm^3 .

– Đếm bằng buồng đếm Neubauer: đếm số bạch cầu ở khu vực dùng để đếm bạch cầu được bao nhiêu nhân 10 chia 4, được số bạch cầu trong 1 mm^3 .

– Kết quả:

- + Bình thường trong nước não tủy có ít tế bào (không quá 1 tế bào/ 1 mm^3)
- + Tăng ít: có 3 - 10 bạch cầu / 1 mm^3
- + Tăng vừa: trên 10 bạch cầu / 1 mm^3
- + Tăng cao: trên 100 bạch cầu / 1 mm^3

3.2. Phân loại bạch cầu: Khi có trên 10 bạch cầu / mm^3

Ly tâm ống nghiệm thứ 2 tốc độ 200 vòng/phút trong 30 phút. Đổ nước trong ở trên, lấy cặn làm tiêu bản giọt dày, đường kính khoảng 2 cm. Để khô, cố định bằng cồn tuyệt đối, để khô rồi nhuộm Giemsa 1/ 12 trong 10 phút, rửa bằng nước thường (chú ý không dội trực tiếp vào phần bệnh phẩm tránh làm bong). Để khô và đọc kết quả bằng vật kính dầu, đếm 100 tế bào để phân loại.

4. Nhận xét kết quả

– Tỷ lệ bạch cầu hạt tăng cao (thường trên 75%) gặp trong viêm màng não mủ do tụ cầu, phế cầu, não mô cầu.

– Tỷ lệ lymphocyt tăng cao (thường trên 75%) gặp trong viêm màng não do lao, virus, giang mai..

– Khi thấy nhiều hồng cầu thì có thể do xuất huyết não, chấn thương sọ não..

– Ngoài ra còn có thể gặp những tế bào thâm nhiễm như tế bào của các bệnh máu ác tính, một số tế bào biểu mô, nấm, hoặc một số tinh thể.

Lưu ý: Khi dịch não tủy có hồng cầu thì có thể do chảy máu hoặc do thủ thuật chọc chạm mạch máu, trong kết quả xét nghiệm cần ghi rõ nếu có hồng cầu.

Dịch não tủy rất dễ bị nhiễm khuẩn nên ống bệnh phẩm phải đậy nút kín và đưa đến phòng xét nghiệm soi ngay.

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Nhầm bệnh phẩm, nhầm giấy xét nghiệm
- Nước não tuỷ sau khi chọc không gửi ngay đi xét nghiệm
- Không lắc đều bệnh phẩm trước khi đếm số lượng
- Làm tiêu bản không đúng kỹ thuật: quá dày hoặc quá mỏng, rửa mạnh quá làm bong bệnh phẩm, nhuộm quá đậm hoặc quá nhạt nên không nhận định đúng tế bào.

XÉT NGHIỆM TẾ BÀO TRONG DỊCH MÀNG PHỔI

1. Nguyên lý

Dịch màng phổi xuất hiện trong các trường hợp bệnh lý như: viêm phổi, viêm màng phổi, viêm gan, ung thư phổi hoặc do nguyên nhân cơ học trong các bệnh tim, gan, thận. Mỗi bệnh, đặc điểm tế bào trong dịch có khác nhau. Xét nghiệm tế bào trong dịch màng phổi giúp cho việc chẩn đoán bệnh.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Kính hiển vi quang học.
- Máy ly tâm.
- Ống nghiệm.
- Lam kính khô sạch.
- Pipette Pasteur.
- Giemsa, cồn cố định.

3. Quy trình kỹ thuật

Ly tâm ống bệnh phẩm 3000 vòng/phút trong 30 phút. Lấy cặn, làm tiêu bản giọt dây, đường kính khoảng 2 cm. Để khô tự nhiên, cố định bằng cồn tuyệt đối. Để khô. Nhuộm Giemsa pha tỷ lệ 1/10, để 5 - 7 phút. Rửa sạch bằng nước thường, rửa nhẹ nhàng vì tiêu bản rất dễ bong. Để khô tự nhiên. Đọc tiêu bản trên kính hiển vi, đầu tiên quan sát bằng vật kính nhỏ (x10), sau chuyển sang vật kính dầu để xem chi tiết.

4. Nhận định kết quả

4.1. Dịch thanh tở huyết (màu vàng chanh)

4.1.1. Trờn dịch cấp tính

- Do lao, giang mai, bệnh tim: thấy nhiều lymphocyt, tế bào biểu mô và một ít hồng cầu.

- Do bệnh tim, thận: thấy nhiều tế bào biểu mô, một ít tế bào lymphocyt và hồng cầu.
- Do viêm màng phổi: thấy nhiều bạch cầu đoạn trung tính chưa thoái hoá.
- Do lao màng phổi cấp, viêm màng phổi thứ phát của giang mai, thấp khớp cấp, gặp nhiều bạch cầu đoạn ưa acid.

4.4.2. *Tràn dịch mạn tính*

- Do lao màng phổi tiếp theo tổn thương phổi: thấy nhiều lymphocyt và tế bào biểu mô.
- Do ung thư phổi và màng phổi thấy nhiều tế bào biểu mô, hồng cầu và tế bào ung thư.
- Do bệnh tim, phổi: thấy nhiều tế bào biểu mô, ít hồng cầu, ít tế bào lymphocyt.

4.2. Dịch mủ (màu đục): gặp trong bệnh viêm màng phổi do vi khuẩn, trong lao phổi, có nhiều bạch cầu trung tính thoái hoá.

4.3. Dịch máu (màu đỏ hồng) thường gặp trong các bệnh sau:

- Chấn thương phổi, màng phổi.
- Lao hoặc các bệnh gây xuất huyết.
- Ung thư phổi hoặc màng phổi.

4.4. Dịch đường chấp (màu trắng đục)

- Do vỡ ống ngực.
 - Do thoái hóa các tế bào trong môi trường không bị nhiễm khuẩn.
- Trên tiêu bản thấy nhiều hạt mỡ và các mảnh tế bào.

XÉT NGHIỆM TẾ BÀO TRONG DỊCH MÀNG BỤNG

1. Nguyên lý

Dịch màng bụng còn gọi là nước báng, chỉ gặp trong bệnh lý, trong đó một số trường hợp có xuất hiện tế bào. Vì vậy xét nghiệm tế bào dịch màng bụng có thể giúp cho chẩn đoán.

2. Dụng cụ, hoá chất

Giống như làm xét nghiệm dịch màng phổi.

3. Quy trình kỹ thuật

Giống như làm xét nghiệm dịch màng phổi.

4. Nhận định kết quả

Có hai loại:

- Nếu có ít tế bào: thường là dịch thấm.
- Nếu nhiều tế bào: thường là dịch tiết do viêm, nhiễm khuẩn (gặp trong lao phúc mạc, ung thư...).
- + Nhiều bạch cầu đoạn trung tính gặp trong ổ áp xe vỡ, viêm phúc mạc do nhiễm khuẩn.
- + Nhiều hồng cầu và tế bào biểu mô, có thể có tế bào ung thư gặp trong ung thư một số tạng.

*** Chú ý:**

- Có thể xét nghiệm nhiều lần để so sánh đối chiếu kết quả (khi cần thiết).
- Phân biệt với những tế bào trong dịch u nang buồng trứng: tế bào hình trụ, kích thước to, đầu có lông.
- Khi chọc hút nước màng bụng cần lưu ý có thể gây nhiễm khuẩn thứ phát và chảy máu, dịch thấm sẽ trở thành dịch tiết, kết quả xét nghiệm sẽ thay đổi. Ống đựng bệnh phẩm phải được nút kín và mang đi xét nghiệm ngay.

XÉT NGHIỆM TẾ BÀO TRONG DỊCH KHỚP VÀ BAO KHỚP

1. Nguyên tắc

Dịch sau khi chọc hút phải được nút kín và đưa đến ngay phòng xét nghiệm.

2. Phương tiện - dụng cụ

Như làm xét nghiệm các dịch màng bụng, màng phổi ...

3. Tiến hành

Như làm xét nghiệm các dịch màng bụng, màng phổi ...

4. Nhận xét kết quả

4.1. Dịch thanh sợi huyết

- Trong thấp khớp: gặp nhiều bạch cầu đoạn trung tính, một số monocyte, tế bào biểu mô, tế bào lympho, tế bào quả nho (ragocyte).
- Trong lao phổi: thấy nhiều bạch cầu lymphocyte và tế bào trung tính thoái hóa.
- Trong giang mai: thấy nhiều tế bào biểu mô, một số bạch cầu đoạn trung tính.

4.2. Dịch mủ (màu trắng đục)

- Do lao: thấy nhiều bạch cầu đoạn trung tính và tế bào lymphocyt.
- Do nhiễm khuẩn não mô cầu: gặp nhiều bạch cầu đoạn trung tính thoái hoá.

4.3. Dịch máu (màu đỏ hồng)

- Do chấn thương gây xuất huyết trong khớp và bao khớp. Ngoài hồng cầu còn thấy bạch cầu và tế bào biểu mô.
- Dịch dưỡng chấp (màu trắng như nước gạo): thường do giun chỉ gây ra, cần kiểm tra thêm xét nghiệm máu.

XÉT NGHIỆM TẾ BÀO TRONG NƯỚC TIỂU

1. Nguyên lý

Nước tiểu bình thường chỉ có một số tế bào biểu mô, tinh thể. Khi thấy xuất hiện nhiều hồng cầu, bạch cầu, trụ là bệnh lý.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Kính hiển vi.
- Máy ly tâm.
- Pipette Pasteur.
- Lam kính, lá kính.

3. Quy trình kỹ thuật

- Thường lấy nước tiểu vào buổi sáng sau khi bỏ phần đầu.
- Lắc đều ống nước tiểu, cho vào ống khoảng 5 ml, ly tâm 2000 vòng/phút trong 15 phút. Nếu không ly tâm thì để lắng 1- 2 giờ.
- Đổ phần trên, hút một giọt cặn, nhỏ lên lam kính. Đậy lá kính lên giọt cặn cho lan đều.
- Đặt lên kính hiển vi đọc bằng vật kính x 10 hoặc x 40.
- Kiểm tra khoảng 20 - 30 vi trường. Số vi trường kiểm tra không được ít hơn 10.

4. Nhận xét kết quả

4.1. Tế bào

- Hồng cầu
Ít : dưới 5 HC / vi trường

- + : 5- 10 HC/ vi trường
- ++ : 10 - 20 HC /vi trường
- +++ : trên 20 HC /vi trường
- Bạch cầu
 - Ít: dưới 10 BC / vi trường
 - +: 10 - 20 BC/ vi trường
 - ++: trên 20 BC/ vi trường
 - +++ : trên 50 BC/ vi trường
- Tinh trùng
- Tế bào biểu mô niệu đạo: tế bào to hình đa diện, nhân rõ.
- Tế bào biểu mô bàng quang: tế bào to hình vệt, nhân rõ.
- Tế bào biểu mô thận: tế bào to trung bình, hình bầu dục, nhân tròn rõ.

4.2. *Trichomonas*

4.3. Trụ niệu: Cấu tạo bởi chất nhầy, tế bào của máu khi qua ống thận, đọng lại và mang khuôn của ống thận. Dựa vào thành phần cấu tạo người ta chia hai loại trụ

4.3.1. Trụ không có tế bào

- Trụ trong: còn gọi là trụ thấu quang, hình dài, bờ nhẵn, trong suốt. Nước tiểu bình thường thải ra 3000 trụ trong vòng 12 giờ. Trụ này tăng khi lao động nặng, sốt, sau gây mê bằng ether. Gặp nhiều có thể nghĩ do viêm thận.

- Trụ sáp (trụ keo): ngắn và to hơn trụ trong, óng ánh do chiết quang nhiều, màu xám, thường có vết nứt. Người ta cho rằng do nằm lâu trong ống thận nên bị khô và tạo thành trụ sáp.

- Trụ xơ: màu vàng nhạt, trông như có nhiều sợi ghép lại và kéo dài, thường gặp trong viêm thận cấp.

- Trụ mỡ: do bào tương tế bào thoái hóa, hoặc do mỡ trong máu bài tiết ra tạo thành. Các hạt mỡ hiện rõ trên thân trụ, thường gặp trong thận nhiễm mỡ.

4.3.2. Trụ có tế bào: thường gặp trong viêm cầu thận

- Trụ hạt: giống như trụ trong nhưng trên mặt có những hạt to nhỏ bám lên, do các tế bào hoặc các hạt cholesterol của các tế bào thoái hóa tạo thành. Thường gặp trong viêm thận cấp.

- Trụ biểu mô: còn gọi là trụ liên bào gồm những tế bào ở ống thận tạo thành.

- Trụ mũ hay trụ bạch cầu: do bạch cầu hạt thoái hóa tạo thành, thường đứt thành đoạn ngắn.

- Trụ hồng cầu còn gọi là trụ máu, do hồng cầu kết tụ, bờ trụ thường lờm chờm không đều.

- Trụ vi khuẩn (ít gặp): do vi khuẩn tạo nên.

Khi đọc bằng vật kính x 10, trụ được đánh giá như sau:

- : Không có trụ
- + : 1 trụ / 100 vi trường
- ++ : 1 trụ / 1 vi trường
- +++ : 10 trụ / 1 vi trường
- ++++ : 100 trụ / 1 vi trường

4.4. Cặn tinh thể

- Sulfat calci: hình kim dài, hoa thị, không màu.
- Oxalat calci: hình phong bì, bánh quy, kích thước 10 - 20 μm , hình củ lạc khoảng 50 μm , chiết quang.
- Carbonat calci: hình cầu, tan trong acid.
- Cặn phosphat: hình chữ nhật, lá dương xỉ, hình sao. Kích thước 30 - 150 μm . Không màu, chiết quang.
- Acid uric: hình thoi, mũi giáo, hoa thị cánh nhọn, hình ngôi sao, màu vàng hay nâu đỏ.
- Amoni urat: hình cầu gai, xương rồng, hình bó kim, kích thước 20 μm , màu vàng, chiết quang.
- Phosphat tricalci: hạt nhỏ, không có hình thù nhất định, tan trong acid.
- Sulfa diazin: hình bó mạ, hình chổi.
- Sulfa thiazon: hình lục lăng.
- Sulfa pyridin: hình lá đu đủ.
- Cholesterol: là những bản mỏng manh, không màu trong suốt, chồng lên nhau.
- Phosphat dicalci: hình tam giác, góc nhọn, chụm thành hình hoa thị.

4.5. Các tạp chất khác

- Do lấy nước tiểu không đúng kỹ thuật.
- Dụng cụ bẩn, tiêu bản bẩn.
- Sợi chất nhầy.
- Lông, sợi bông, bọt khí.

5. Những điều cần chú ý

- Phải ghi rõ ràng loại mẫu, cách lấy mẫu: mẫu lấy tự nhiên, mẫu lấy qua đặt sonde, mẫu lấy đầu, giữa hay cuối bãi, mẫu lấy sau khi phẫu thuật đường tiết niệu...
- Vệ sinh sạch sẽ trước khi lấy mẫu nước tiểu.
- Dụng cụ lấy mẫu phải đảm bảo khô, sạch.

- Mẫu xét nghiệm phải được đưa ngay đến labo sau khi lấy, nếu để lâu hồng cầu, bạch cầu, tế bào biểu mô và trụ sẽ giảm trong khi vi khuẩn và men tăng. Tốt nhất là trong vòng 2 giờ.

- Luôn luôn nhớ điều tra về kinh nguyệt vì có thể gây sai sót nghiêm trọng do hồng cầu, bạch cầu, tế bào biểu mô và vi khuẩn có thể ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm trong và sau hành kinh vài ngày.

- Ống nước tiểu phải đậy nút kín để tránh đổ vãi và lẫn thêm tạp khuẩn.

XÉT NGHIỆM CẶN ADDIS

1. Nguyên lý

Định lượng nước tiểu trong một thời gian nhất định và tiến hành đếm tế bào cho phép xác định số lượng tế bào nước tiểu trong một phút giúp cho chẩn đoán, theo dõi và điều trị một số bệnh hệ tiết niệu

2. Cách lấy bệnh phẩm

Buổi sáng bệnh nhân dậy sớm đi tiểu hết, sau đó uống 300 ml nước đun sôi để nguội và nằm nghỉ. Trong 3 giờ đi tiểu bình thường vào một cái xô sạch và đo được bao nhiêu mililit thì ghi vào giấy xét nghiệm. Lắc đều toàn bộ nước tiểu và lấy 10ml đem đến phòng xét nghiệm.

3. Dụng cụ, hoá chất

- Máy ly tâm
- Buồng đếm Nageotte
- Pipette Pasteur
- Kính hiển vi

4. Quy trình kỹ thuật

Dem 10 ml nước tiểu ly tâm 1500 - 2000 vòng/ phút trong 5 phút. Bỏ 9 ml ở phần trên. Lấy 1 ml cặn lắc đều và nhỏ lên buồng đếm Nageotte.

Đếm số lượng tế bào ở các ô quy định, từ đó tính ra số lượng tế bào hồng cầu và bạch cầu trong một phút.

Thí dụ:

Trong 3 giờ (180 phút) bệnh nhân đi tiểu được 360 ml .

Trong 1 mm³ đếm được 5 bạch cầu.

Cách tính như sau:

$$N \times a \times 1000 / 10 \text{ hay } N \times a \times 100 = 5 \times 360 / 180 \times 1000 / 10 = 1000$$

- Trong đó:
- N là số lượng tế bào đếm được trong 1 mm^3 .
 - $a = V/t$. V là lượng nước tiểu thu được
. t là thời gian 180 phút
 - 10 là 10 ml nước tiểu đem ly tâm
 - 1000 là $1000 \text{ mm}^3 = 1 \text{ ml}$

Như vậy trong một phút có 1000 bạch cầu trong nước tiểu

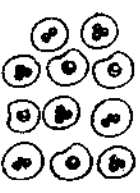
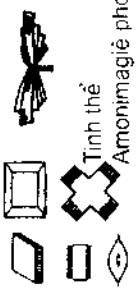
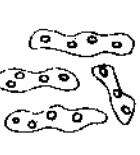
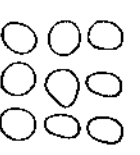
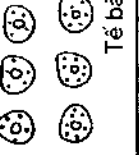
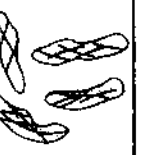
5. Nhận xét kết quả

Phương pháp này có giá trị về chẩn đoán và điều trị đặc biệt trong viêm thận:

- Nếu hồng cầu dưới 3000
bạch cầu dưới 2500 | giai đoạn ổn định
- Nếu hồng cầu trên 3000
bạch cầu trên 2500 | giai đoạn tiến triển
- Nếu hồng cầu và bạch cầu trên 100 000: nghi sỏi thận
- Nếu hồng cầu tăng nhiều, bạch cầu tăng ít nghi viêm bể thận hoặc bàng quang.

6. Các yếu tố ảnh hưởng

- Cách lấy bệnh phẩm không đúng
- Đo lượng nước tiểu không chính xác
- Không lắc đều nước tiểu trước khi lấy làm xét nghiệm
- Tính toán sai.

TẾ BÀO		TINH THỂ	
 Trụ trong	 Hồng cầu	 Tinh thể carbonat calci	 Tinh thể Sulfadiazin
 Trụ bạch cầu	 Bạch cầu	 Tinh thể Amonimagiê phosphat	 Tinh thể Sulfapyridin
 Trụ mỡ	 Hạt mỡ	 Tinh thể Dicalci phosphat	 Tinh thể Sulfapyridin
 Trụ hạt	 Tế bào biểu mô thận	 Tinh thể Tricalci phosphat	 Tinh thể Acetyl sulfanilamid
 Trụ xơ	 Tế bào biểu mô bàng quang	 Tinh thể Oxalat calci	 Tinh thể Amoni urat
 Tinh trùng	 Tế bào biểu mô niệu đạo	 Tinh thể Calci sulfat	

Hình 1.7. Hình ảnh tế bào nước tiểu

Chương 2

ĐÔNG MÁU - CẦM MÁU

NGUYÊN TẮC LẤY BỆNH PHẨM XÉT NGHIỆM ĐÔNG MÁU

Kết quả của các xét nghiệm đông máu phụ thuộc rất nhiều vào cách lấy bệnh phẩm. Để tiến hành tốt các kỹ thuật xét nghiệm đông máu, cần tuân thủ một số nguyên tắc cơ bản sau đây trong khâu lấy bệnh phẩm:

- Trước khi lấy máu, cần nắm được chính xác tiền sử gia đình, tiền sử bản thân bệnh nhân về chảy máu. Hiện tại hoặc trong thời gian gần đây nhất có được điều trị các thuốc có ảnh hưởng đến hệ thống đông máu như aspirin, heparin, dẫn xuất coumarin v.v... hay không ?

- Bệnh nhân không được ăn chất béo trong vòng 12 giờ trước khi lấy máu nhằm tránh sai lệch kết quả xét nghiệm do huyết tương bị đục.

- Trừ những trường hợp cấp cứu, bệnh nhân nên được nghỉ ngơi trước khi lấy máu vì mọi sự vận động mạnh đều gây tình trạng tăng nồng độ các yếu tố đông máu trong huyết tương. Đối với phụ nữ, nên tránh xét nghiệm đông máu trong những ngày đang hành kinh.

- Tốt nhất là lấy máu tĩnh mạch, chỉ lấy máu động mạch, mao mạch trong những trường hợp không thể lấy được máu tĩnh mạch.

- Lấy máu phải đảm bảo hạn chế đến mức tối đa sự khởi động đường đông máu nội sinh: cần sử dụng bơm tiêm nhựa hoặc tráng silicon. Tránh khởi động đường đông máu ngoại sinh: dùng kim sắc cỡ 21, chọc trúng tĩnh mạch, không được chọc vào nơi có tụ máu hoặc vết chọc trước.

- Máu lấy ra cho vào ống nhựa có chứa chống đông (loại chống đông, tỷ lệ chống đông tùy theo từng xét nghiệm) tránh tạo bọt, đẩy nút nhựa hoặc bịt bằng giấy paraffin, trộn đều máu và chống đông một cách nhẹ nhàng, không lắc ngang tránh tan máu.

- Các xét nghiệm cần được tiến hành trong khoảng thời gian 4 giờ kể từ khi lấy máu. Bảo quản mẫu máu ở 4°C (trường hợp mẫu xét nghiệm là huyết tương giàu tiểu cầu thì bảo quản ở 22°C).

- Nói chung, kết quả của các xét nghiệm đông máu không phản ánh chính xác lượng các yếu tố đông máu trong mẫu kiểm tra mà chỉ là tỷ lệ phần trăm so với mẫu chứng (bình thường). Trong khi đó nồng độ các yếu tố đông máu ở người bình thường dao động trong một khoảng khá rộng (ví dụ yếu tố VIII: 50-200%). Vì

vậy mẫu máu chúng phải là mẫu máu trộn của nhiều người (pool), một pool tốt nhất là lấy từ 15 người bình thường và tối thiểu cũng phải từ 5 người bình thường. Mẫu chúng luôn phải đảm bảo lấy cùng thời điểm với mẫu bệnh hoặc được đông khô và bảo quản trong những điều kiện chuẩn. Mẫu chúng và mẫu bệnh luôn được tiến hành cùng kỹ thuật, cùng điều kiện và cùng do một người thực hiện.

DẤU HIỆU DÂY THẮT

1. Nguyên lý

Đánh giá sức bền mao mạch qua các nốt xuất huyết dưới da sau khi tăng áp lực của máu trong mao mạch bằng cách tạo ra một sự ứ đọng tĩnh mạch.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Máy đo huyết áp.
- Đồng hồ.

3. Tiến hành kỹ thuật

- Kiểm tra nốt xuất huyết trên tay bệnh nhân (nếu có, cần ghi rõ để phân biệt với nốt xuất huyết mới xuất hiện sau khi tiến hành kỹ thuật).
- Đo huyết áp bệnh nhân.
- Duy trì áp lực bằng máy đo huyết áp ở trị số trung bình giữa huyết áp tối đa và tối thiểu trong 10 phút.
- Tháo nhanh máy đo huyết áp, gờ cao tay bệnh nhân để máu lưu thông bình thường.
- Đọc kết quả bằng cách đếm các nốt xuất huyết mới ở vùng dưới dải quần đo huyết áp.

4. Kết quả

- Bình thường không có nốt xuất huyết mới. Khi có hơn 10 nốt xuất huyết mới trên diện tích 10 cm^2 , dấu hiệu dây thắt được gọi là dương tính và tùy theo số nốt xuất huyết xuất hiện mà kết quả được biểu thị +, ++, +++.

Dấu hiệu dây thắt dương tính thể hiện tình trạng sức bền thành mạch kém, thường gặp trong các bệnh về thành mạch: thiếu vitamin C, viêm mao mạch, bệnh về số lượng và chất lượng tiểu cầu.

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Nhầm với nốt xuất huyết cũ, do không kiểm tra hoặc kiểm tra không kỹ.
- Tạo áp lực quá cao hoặc quá thấp.
- Không đảm bảo thời gian tăng áp lực.

THỜI GIAN MÁU CHẢY

Có hai phương pháp thông dụng hiện nay: phương pháp Duke và phương pháp Ivy.

1. Thời gian máu chảy (Phương pháp Duke)

1.1. Nguyên lý

Đo thời gian từ lúc tạo một vết chích nằm ngang ở vùng giữa dải tai đến khi máu ngừng chảy.

1.2. Dụng cụ, hoá chất

- Kim chích (blood lancet)
- Đồng hồ bấm giây, giấy thấm
- Bông thấm, dung dịch sát trùng (ether, cồn)

1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Dùng ether sát trùng nhẹ nhàng vùng dải tai. Đợi 1-2 phút cho ether bay hơi.
- Dùng kim chích chọc dứt khoát vào vùng giữa dải tai tạo một vết thương dài 5mm sâu 2mm. Khởi động đồng hồ bấm giây.
- Cứ 30 giây một lần, dùng giấy thấm các giọt máu chảy ra từ vết chích cho đến khi máu ngừng chảy, bấm đồng hồ ngừng lại.

1.4. Kết quả

- Thời gian máu chảy thường dưới 5 phút. Trị số này có thể thay đổi tùy phòng xét nghiệm.
- Khi thời gian máu chảy kéo dài trên 5 phút, nên kiểm tra ở tai đối diện hoặc tốt nhất nên tiến hành theo phương pháp Ivy.
- Thời gian máu chảy kéo dài trong các bệnh lý về thành mạch (thiếu vitamin C ...), bệnh lý về số lượng, chất lượng tiểu cầu (xuất huyết giảm tiểu cầu, Glanzmann...).

1.5. Nguyên nhân sai lầm

- Kích thước vết chích không đạt tiêu chuẩn: quá nông hoặc quá sâu.
- Động tác thấm máu từ vết chích quá mạnh gây bong nút tiểu cầu vừa mới hình thành.
- Có bất thường mạch máu vùng dải tai.

2. Thời gian máu chảy (Phương pháp Ivy)

2.1. Nguyên lý

Dưới áp lực dương, máu tự chảy qua vết thương thành mạch cho đến khi tạo thành nút cầm máu. Dựa vào hiện tượng này, phương pháp xét nghiệm thời gian máu chảy Ivy tiến hành ở vùng cẳng tay.

2.2. Dụng cụ, hoá chất

- Máy đo huyết áp.
- Kim chích, bông cotton hoặc ether.
- Đồng hồ bấm giây (3 chiếc).

2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Dùng máy đo huyết áp bơm ở áp lực 40mmHg và giữ ổn định.
- Chọn một vùng ở mặt trước cẳng tay không có lông, không nhìn thấy mạch máu, sát trùng bằng ether.
- Đợi 1-2 phút cho ether bay hơi, tạo 3 vết chích có kích thước như nhau cách nhau khoảng 2cm và có độ sâu khoảng 3mm. Khởi động đồng hồ ngay khi tạo các vết thương. Cứ 30 giây một lần, dùng giấy thấm, thấm nhẹ nhàng máu rỉ ra từ các vết thương tương tự như phương pháp Duke. Ghi thời gian máu chảy của từng vết thương.

2.4. Kết quả

Thời gian máu chảy trong trường hợp này là thời gian trung bình của cả 3 vết thương. Tuy nhiên cũng có phòng xét nghiệm ghi riêng rẽ thời gian máu chảy của từng vết thương. Thời gian máu chảy theo phương pháp Ivy thường dưới 5 phút.

2.5. Nguyên nhân sai lầm

Những nguyên nhân gây nên sai lầm trong phương pháp Duke cũng làm sai lệch kết quả thời gian máu chảy theo phương pháp Ivy. Ngoài ra cần lưu ý tránh chọc phải một mạch máu nằm khá sâu sẽ làm cho thời gian máu chảy kéo dài. Trường hợp này được phát hiện nếu thời gian máu chảy của hai vết thương kia trong thời hạn bình thường.

THỜI GIAN MÁU ĐÔNG **(Phương pháp Lee - White)**

1. Nguyên lý

Thời gian từ khi máu tiếp xúc với bề mặt ống nghiệm đến khi hình thành cục đông là thời gian đông máu.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Bơm tiêm nhựa loại 5ml kim cỡ 21.
- Ống nghiệm sạch, khô, kích thước 75 x 9,5mm.
- Bình cách thuỷ 37°C.
- Đồng hồ bấm giây.

3. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị 2 ống nghiệm cho mỗi bệnh nhân, ghi tên, tuổi, khoa, phòng.
- Dùng bơm tiêm nhựa lấy 2-3ml máu tĩnh mạch (yêu cầu động tác nhanh, gọn, chọc chính xác, không luồn lách kim, không chọc đi chọc lại).
- Phân phối đều vào 2 ống nghiệm đã chuẩn bị. Mỗi ống 1-1,5ml, lưu ý tránh làm nổi bọt khi cho máu vào ống nghiệm. Khởi động đồng hồ bấm giây ngay khi máu tiếp xúc với thành ống nghiệm.
- Để 2 ống máu vào bình cách thuỷ 37°C.
- Sau 3 phút, cứ 30 giây nghiêng nhẹ nhàng ống 1 để kiểm tra cho đến khi máu đông.
- Tiếp tục kiểm tra ống thứ hai như ống thứ nhất. Bấm đồng hồ dừng lại khi máu ở ống thứ hai đông chặt. Thời gian đông máu là thời gian đến khi máu ở ống thứ hai đông.

4. Kết quả

- Bình thường thời gian đông của ống 1 từ 6-8 phút và của ống 2 từ 8-10 phút. Sự chênh lệch thời gian đông giữa ống 2 và ống 1 từ 2 phút - 2 phút 30 giây. Tuy nhiên trị số bình thường của thời gian máu đông phụ thuộc nhiều vào từng điều kiện kỹ thuật, động tác của kỹ thuật viên, vì vậy mỗi phòng xét nghiệm nên có một trị số riêng của mình.
- Thời gian máu đông kéo dài thường gặp trong các trường hợp rối loạn đường đông máu nội sinh như hemophilia, điều trị heparin v.v...
- Đây là một xét nghiệm thô, đơn giản nên độ chính xác bị hạn chế ngay cả khi đã tuân thủ nghiêm ngặt các điều kiện kỹ thuật. Vì vậy thời gian máu đông bình thường không có nghĩa là hệ thống đông máu bình thường.
- Thời gian máu đông có thể vẫn bình thường ở bệnh nhân có số lượng tiểu cầu giảm nặng và ngay cả ở bệnh nhân hemophilia.

5. Nguyên nhân sai lầm

- Ống nghiệm không sạch, kích thước không đảm bảo (quá lớn hoặc quá nhỏ).
- Nhiệt độ ở bình cách thuỷ không đảm bảo 37°C.
- Kỹ thuật lấy máu sai: kim không sắc, kim quá to hoặc phải chọc nhiều lần mới lấy được máu, chọc vào nơi tụ máu cũ v.v...

- Lượng máu lấy quá nhiều hoặc quá ít.
- Kỹ thuật nghiêng kiểm tra không đảm bảo, khoảng cách giữa các lần nghiêng không đạt 30 giây.

CO CỤC MÁU

(Phương pháp Budtz-Olsen)

1. Nguyên lý

Quá trình đông máu là quá trình hình thành sợi huyết. Sau đó sợi huyết sẽ co lại, tạo nên sự co của cục đông. Mức độ co của cục đông phụ thuộc vào vai trò của tiểu cầu và sợi huyết.

2. Dụng cụ, thuốc thử

- Bình cách thuỷ 37°C.
- Ống nghiệm sạch kích thước 75 x 9,5mm.
- Bơm kim tiêm nhựa, bông, cồn sát trùng.

3. Tiến hành kỹ thuật

- Lấy 3ml máu tĩnh mạch, phân phối đều vào 2 ống nghiệm (có thể sử dụng luôn 2 ống máu đông làm theo phương pháp Lee - White).
- Để vào bình cách thuỷ 37°C.
- Sau 2-4 giờ đọc kết quả.

4. Kết quả

Có hai cách để đánh giá kết quả:

- Dựa vào mức độ co của cục đông (co hoàn toàn, co không hoàn toàn, không co, cục đông bị tan).
 - + Cục máu co hoàn toàn: tạo cục máu bờ rõ ràng, phần huyết thanh còn lại chiếm khoảng 50 đến 65% thể tích máu ban đầu, không có hồng cầu tự do.
 - + Cục máu co không hoàn toàn: tạo cục máu, phần huyết thanh còn lại ít (dưới 40% thể tích máu ban đầu) hoặc còn hồng cầu tự do.
 - + Cục máu không co: không tạo riêng phần huyết thanh.
 - + Cục máu bị nát: hầu hết hồng cầu tự do trong huyết thanh.
- Hoặc dựa vào lượng hồng cầu tự do còn lại dưới đáy ống sau khi co và chia làm các mức độ: +, ++, +++.

Tuỳ theo mức độ bệnh lý số lượng, chất lượng tiểu cầu hoặc sợi huyết sẽ gây nên tình trạng cục máu không co, co không hoàn toàn hoặc bị tan.

5. Nguyên nhân sai lầm

- Lượng máu lấy quá nhiều hoặc quá ít.
- Ống nghiệm bẩn, kích thước không đảm bảo.
- Nhiệt độ bình cách thuỷ.
- Những trường hợp đa hồng cầu hoặc thiếu máu đều ảnh hưởng đến kết quả co cục máu.

THỜI GIAN HOWELL (Thời gian phục hồi calci)

1. Nguyên lý

Chống đông bằng natri citrat sẽ làm ngừng quá trình đông máu ở giai đoạn cần ion calci. Khi hồi phục calci, quá trình đông máu sẽ tiếp tục. Dựa vào đặc tính này, người ta khảo sát thời gian đông của huyết tương sau khi cho thừa calci để đánh giá đường đông máu nội sinh với sự có mặt của tiểu cầu.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Bình cách thuỷ 37°C.
- CaCl_2 M/40.
- Ống nghiệm kích thước 75 x 9,5mm.
- Pipette.
- Đồng hồ bấm giây.

3. Tiến hành kỹ thuật

– Máu chứng và máu bệnh nhân chống đông bằng natri citrat 3,8% hoặc 3,2% với tỷ lệ 9 thể tích máu 1 thể tích chống đông. Thu huyết tương giàu tiểu cầu bằng li tâm nhẹ (500 vòng/phút trong 5 phút) hoặc để tự lắng.

– Phân phối 0,2ml huyết tương giàu tiểu cầu của bệnh nhân và máu chứng vào mỗi ống nghiệm.

– Để vào bình cách thuỷ 37°C trong 5 phút.

– Cho thêm 0,2ml CaCl_2 M/40. Trộn đều, khởi động đồng hồ ngay khi cho calci vào. Để yên ở bình cách thuỷ 37°C.

– Từ 1 phút 15 giây bắt đầu nghiêng nhẹ kiểm tra đông cứ 15 giây một lần cho đến khi đông chặt. Bấm đồng hồ dừng lại và ghi thời gian đông.

Lập lại tương tự với ống thứ hai của mẫu kiểm tra.

Tiến hành tương tự với ống máu chứng (một ngày có thể chỉ làm một lần).

4. Kết quả

- Thời gian Howell là kết quả trung bình của 2 ống.
- Bình thường từ 1 phút 15 giây đến 2 phút 30 giây. Trị số này có thể thay đổi tùy từng phòng xét nghiệm.
- Nếu thời gian Howell của ống chứng nằm ngoài giá trị trên thì phải kiểm tra lại thuốc thử, kỹ thuật và mẫu chứng.
- Thời gian Howell kéo dài trong các trường hợp bệnh lý có rối loạn đường đông máu nội sinh do thiếu hụt các yếu tố đông máu (bệnh hemophilia) hoặc do có kháng đông lưu hành, do điều trị chống đông dạng heparin.
- Thời gian Howell là một xét nghiệm đơn giản để đánh giá đường đông máu nội sinh nên độ chính xác không cao vì vậy hiện nay nhiều phòng xét nghiệm đã áp dụng xét nghiệm APTT thay cho thời gian Howell.

5. Nguyên nhân sai lầm

- Ống nghiệm bẩn, không đúng kích thước.
- Nhiệt độ bình cách thuỷ không đảm bảo 37°C.
- Chất lượng CaCl_2 M/40.
- Mẫu huyết tương kiểm tra được chuẩn bị sai quy cách: không đúng chất chống đông, tỷ lệ chống đông, ly tâm mạnh làm mất tiểu cầu.

THỜI GIAN PROTHROMBIN (Thời gian Quick)

1. Nguyên lý

Máu chống đông bằng natri citrat sẽ được phát động quá trình đông máu theo con đường ngoại sinh khi hồi phục calci và có mặt thromboplastin. Dựa vào đặc tính này, người ta khảo sát thời gian đông của huyết tương sau khi cho thừa thromboplastin calci để đánh giá các yếu tố đông máu đường ngoại sinh (phức hệ prothombin: II, V, VII, X).

2. Dụng cụ, hoá chất

- Bình cách thuỷ 37°C.
- Ống nghiệm kích thước 75 x 9,5mm.
- Đồng hồ bấm giây.
- Pipette.
- CaCl_2 M/40.

- Thromboplastin calci.
- Trường hợp sử dụng thromboplastin calci dạng đông khô: pha nước cất theo chỉ dẫn ở nhãn lọ, nghiêng nhẹ nhàng cho tan hết (tránh tạo bọt), sau 30 phút tiến hành kỹ thuật.
- Trường hợp sử dụng thromboplastin bột: cứ 50mg thromboplastin bột, cho vào 1ml NaCl 0,9%, trộn đều và ủ ở bình cách thuỷ 37°C trong 15 phút. Sau đó trộn với CaCl₂ M/40 tỷ lệ 1/1, để lắng, gạn lấy phần trong ở trên. Đây chính là thromboplastin calci sẵn sàng để làm xét nghiệm.

3. Tiến hành kỹ thuật

- Máu chống đông bằng citrat natri 3,2% hoặc 3,8% theo tỷ lệ 9 thể tích máu 1 thể tích chống đông. Ly tâm 2000 vòng trong 10 phút, tách lấy huyết tương làm xét nghiệm.
- Mẫu huyết tương được bảo quản ở 4°C hoặc nhiệt độ phòng và tiến hành xét nghiệm trong vòng 4 giờ kể từ khi lấy máu. Trường hợp cần kéo dài thời gian bảo quản, mẫu huyết tương cần phải được để ở -20°C hoặc lạnh hơn.
- Phân phối 0,1 ml huyết tương của mẫu cần kiểm tra vào ống nghiệm. Để ở bình cách thuỷ 37°C trong 5 phút.
- Cho vào 0,2 ml thromboplastin calci. Khởi động đồng hồ ngay. Trộn đều ở bình cách thuỷ 37°C trong 9 giây.
- Sau 9 giây, bắt đầu đảo nhẹ và quan sát, đến khi xuất hiện màng đông, bấm dừng đồng hồ lại.
- Lặp lại tương tự với ống thứ 2 của mẫu kiểm tra và kết quả được tính là trị số trung bình của 2 lần này.
- Hàng ngày trước khi tiến hành xét nghiệm, phải tiến hành kỹ thuật với máu chứng trước để lấy thông số chuẩn và kiểm tra hoá chất, sinh vật phẩm.

4. Kết quả

- Tuỳ theo loại thromboplastin sử dụng mà mỗi phòng xét nghiệm có trị số bình thường khác nhau. Thời gian Quick bình thường khi sử dụng thromboplastin có hoạt tính đầy đủ thường từ 11 đến 13 giây.
- Kết quả của xét nghiệm này có thể biểu thị bằng thời gian (giây) hoặc bằng phần trăm. Ngày nay, để tránh những sai sót kết quả gây ra do sử dụng các loại thromboplastin khác nhau, Ủy ban chuẩn hoá quốc tế của Tổ chức Y tế thế giới yêu cầu mỗi loại thromboplastin phải ghi rõ I.S.I (chỉ số độ nhạy quốc tế).
- Cách tính tỷ lệ prothrombin từ thời gian Quick:
 - + Trường hợp có bảng tính sẵn kèm theo với lô thromboplastin sử dụng: việc tính sẽ đơn giản sau khi xác định thời gian Quick của chứng và bệnh.
 - + Trường hợp không có bảng kèm theo: sử dụng công thức:

$$(T'' + T') \times 100 / \{T_{\text{bệnh}} - [T' - (T'' - T')]\} = \% \text{ prothrombin}$$

Trong đó: T⁵⁰: thời gian đông của chứng 50%

T¹⁰⁰: thời gian đông của chứng 100%

- Cách tính INR (International Normalized Ratio):

$$INR = PTR = \left(\frac{PT \text{ bệnh}}{PT \text{ chứng}} \right)^{I.S.I}$$

- Thời gian Quick kéo dài trong các trường hợp rối loạn đường đông máu ngoại sinh (giảm nồng độ các yếu tố phức hệ prothrombin do: suy chức năng gan hoặc thiếu vitamin K, điều trị chống đông bằng dẫn xuất coumarin).

- Xét nghiệm này nhạy nhất với sự thiếu hụt prothrombin.

5. Nguyên nhân sai lầm

- Do mẫu huyết tương kiểm tra: đông dây, sai tỷ lệ chống đông
- Do kỹ thuật: tiến hành kỹ thuật sau 4 giờ kể từ khi lấy máu với mẫu máu được bảo quản ở nhiệt độ phòng.
- Do mẫu huyết tương chứng: không lấy pool hoặc lấy pool từ một lượng ít hơn 5 người.
- Do chất lượng thromboplastin không đảm bảo hoặc sử dụng thromboplastin đã bảo quản lâu sau khi chuẩn bị.

THỜI GIAN THROMBOPLASTIN TỪNG PHẦN HOÁ (APTT: *activated partial thromboplastin time*) (Thời gian Cephalin - Kaolin)

1. Nguyên lý

Thời gian phục hồi calci của huyết tương citrat hoá sau khi ủ với một lượng thừa kaolin (hoạt hoá yếu tố tiếp xúc) và cephalin (thay thế yếu tố 3 tiểu cầu) giúp đánh giá chính xác các yếu tố khác của đường đông máu nội sinh. Với xét nghiệm này, điều kiện hoạt hoá yếu tố tiếp xúc cũng như số lượng, chất lượng tiểu cầu trong mẫu kiểm tra không ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Bình cách thuỷ 37°C.
- Ống nghiệm kích thước 75 x 9,5mm.
- CaCl₂ M/40.
- Kaolin-cephalin thương phẩm đông khô: pha theo chỉ dẫn, nghiêng nhẹ đến khi tan hết, 20 phút sau sử dụng làm xét nghiệm.
- Kaolin-cephalin tự sản xuất: pha kaolin với NaCl 0,9% nồng độ 5mg/ml, pha cephalin nồng độ thích hợp (theo chỉ dẫn của nơi sản xuất). Trộn hỗn dịch kaolin - cephalin theo tỷ lệ 1/1.

3. Tiến hành kỹ thuật

- Lấy máu và tách huyết tương nghèo tiểu cầu của chứng và bệnh nhân như xét nghiệm thời gian Quick.
- Phân phối 0,1ml huyết tương nghèo tiểu cầu cần kiểm tra vào ống nghiệm, để vào bình cách thuỷ 37°C.
- Thêm vào 0,1ml hỗn dịch kaolin - cephalin. Trộn đều, ủ ở bình cách thuỷ 37°C trong 3 phút. Trong thời gian ủ, cứ 15 giây lắc trộn đều một lần.
- Cho vào 0,1ml CaCl_2 M/40, khởi động đồng hồ và theo dõi đến khi xuất hiện màng đông, bấm đồng hồ dừng lại. Ghi thời gian đông.
- Mỗi mẫu huyết tương cần được tiến hành 2 lần và kết quả chính là thời gian trung bình của 2 lần kiểm tra này.

Tiến hành tương tự với mẫu chứng.

4. Kết quả

Thời gian thromboplastin từng phần hoạt hoá của huyết tương bình thường thay đổi từ 30-35 giây tùy loại cephalin-kaolin, tùy kỹ thuật, tùy điều kiện kỹ thuật mà từng phòng xét nghiệm sử dụng.

Khi kết quả kéo dài trên 8 giây so với mẫu chứng được gọi là thời gian thromboplastin từng phần hoạt hoá kéo dài. Thường gặp trong tình trạng rối loạn đường đông máu nội sinh do thiếu hụt yếu tố đông máu (hemophilia...) hoặc do chống đông lưu hành (bệnh leukemia cấp, điều trị heparin...).

5. Nguyên nhân sai lầm

- Không tuân thủ thời gian ủ kaolin-cephalin với huyết tương hoặc thời gian ủ của chứng và bệnh không giống nhau.
- Không trộn đều hỗn dịch kaolin-cephalin trước khi cho vào huyết tương vì kaolin rất dễ lắng xuống đáy ống nghiệm.
- Mẫu huyết tương kiểm tra không được bảo quản đúng quy định.

THỜI GIAN THROMBIN

1. Nguyên lý

Đo thời gian đông của huyết tương khi cho thrombin vào. Xét nghiệm này đánh giá giai đoạn chuyển fibrinogen thành fibrin.

2. Dụng cụ, thuốc thử, hoá chất

- Ống nghiệm.
- Bình cách thuỷ 37°C.

- Đồng hồ bấm giây.
- Pipette.
- Thrombin pha loãng (bằng NaCl 0,9%) và bảo quản ở nước đá đang tan. Nồng độ pha loãng tùy theo loại thrombin. Thường với nồng độ thrombin 25 đơn vị/ml sẽ cho thời gian thrombin ở mẫu huyết tương chứng 15-20 giây.

3. Tiến hành kỹ thuật

- Lấy máu và tách huyết tương của mẫu chứng và bệnh nhân như kỹ thuật thời gian Quick.
- Phân phối 0,1ml huyết tương cần kiểm tra vào ống nghiệm.
- Cho thêm vào 0,1ml NaCl 0,9%, trộn đều, để ở bình cách thuỷ 37°C trong 30 phút.
- Cho thêm 0,1ml thrombin ở nồng độ thích hợp đã xác định. Khởi động đồng hồ.
- Quan sát sự xuất hiện cục đông. Bấm đồng hồ dừng lại. Mỗi mẫu kiểm tra 2 lần và thời gian đông trung bình của hai lần này chính là thời gian thrombin.
- Tiến hành tương tự với mẫu chứng.

4. Kết quả

Thời gian thrombin của mẫu kiểm tra được coi là kéo dài khi dài hơn thời gian thrombin của mẫu chứng trên 5 giây.

Thời gian thrombin kéo dài gặp trong các trường hợp thiếu hụt fibrinogen (dưới 1g/l), bất thường về cấu trúc phân tử fibrinogen, có mặt các chất ức chế thrombin (heparin) hoặc chất ức chế trùng phân fibrin (PDF, một số protein khác thường thấy trong bệnh đa u tuỷ).

5. Nguyên nhân sai lầm

- Sử dụng thrombin pha loãng với nồng độ không thích hợp (thời gian thrombin của huyết tương chứng ngắn hơn 15 giây) hoặc điều kiện bảo quản không đảm bảo vì thrombin sau khi pha loãng không bền vững.
- Pipette, ống nghiệm v.v... có heparin.

NGHIỆM PHÁP VON - KAULLA

1. Nguyên lý

Khi huyết tương được pha loãng và acid hoá sẽ làm tủa fibrinogen và các yếu tố hoạt hoá hệ thống tiêu sợi huyết (plasminogen hoạt hoá, plasminogen). Các chất ức chế tiêu sợi huyết và yếu tố VII có trong tủa rất ít. Do đó khi tủa này được

làm đông, thì cục đông sẽ bị tiêu nhanh hơn nhiều lần so với bình thường. Dựa vào tính chất này, người ta tiến hành theo dõi thời gian tiêu của tua được làm đông để đánh giá mức độ hoạt động của hệ thống tiêu sợi huyết.

2. Hoá chất, thuốc thử

- Đệm Michaelis pH 7,35
- CaCl_2 M / 10
- Acid acetic 2 %
- Chất chống đông natri citrat 3,8%

3. Tiến hành kỹ thuật

- Lấy máu và tách huyết tương: máu tĩnh mạch chống đông bằng citrat natri 3,8% với tỷ lệ: 1 thể tích chất chống đông/ 9 thể tích máu. Để tự lắng hoặc ly tâm 1500 vòng/phút trong 5 phút, lấy huyết tương.
- Trong ống nghiệm chứa 0,3 ml huyết tương của mẫu chứng hoặc của bệnh nhân, cho vào 3ml nước cất.
- Cho thêm vào mỗi ống 1 giọt acid acetic 2%, kiểm tra để có pH 5,2
- Ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút. Gạn bỏ nước trong, giữ lại phần tủa.
- Dùng giấy thấm, thấm khô thành ống.
- Cho vào mỗi ống 0,3 ml dung dịch đệm Michaelis pH 7,35 đã pha loãng 1/4 trong dung dịch NaCl 0,9 %, dùng que đánh tan tủa.
- Cho thêm vào mỗi ống 1 giọt CaCl_2 M/10, đặt ống nghiệm vào bình cách thủy 37°C , chờ đông. Bấm đồng hồ theo dõi thời gian tan hoàn toàn.

4. Kết quả

Tan hoàn toàn: Trước 15 phút: tiêu sợi huyết tối cấp

15 - 30 phút: tiêu sợi huyết cấp

30 - 45 phút: tiêu sợi huyết bán cấp

45 - 60 phút: tiêu sợi huyết tiềm tàng

Trên 60 phút: bình thường

5. Nguyên nhân sai lầm

- Không tạo được cục đông do: tiến hành sai kỹ thuật, lượng acid acetic cho không đúng, thấm ống nghiệm không khô.
- Chú ý: nếu lượng fibrinogen của huyết tương quá ít, cũng không tạo được cục đông, lúc đó phải làm lại xét nghiệm bằng cách bổ sung vào huyết tương người bệnh một lượng fibrinogen.

THỜI GIAN TIÊU EUGLOBULIN HUYẾT TƯƠNG

1. Nguyên lý

Dựa vào đặc tính tủa trong môi trường acid của các euglobulin huyết tương, người ta acid hoá huyết tương để thu những chất này và loại bỏ các chất ức chế tiêu sợi huyết. Sau đó làm đông euglobulin huyết tương và theo dõi thời gian tiêu đông, để đánh giá nhanh mức độ hoạt động của hệ thống tiêu sợi huyết.

2. Hoá chất và thuốc thử

- Huyết tương citrat chứng và bệnh
- CaCl_2 M / 40
- Acid acetic 1,6 % pha loãng thành 1/100 trong nước cất
- Dung dịch đệm borat pH 7,6

3. Tiến hành kỹ thuật

- Trong ống nghiệm kích thước 75 x 12 mm cho 0,5 ml huyết tương nghèo tiểu cầu, cho thêm 9,5 ml acid acetic đã được pha 1/100 trong nước cất.
- Đảo nhẹ ống trộn đều
- Để vào tủ lạnh 4°C trong 20 phút.
- Lấy ra chia đều sang 2 ống (mỗi ống 5 ml)
- Ly tâm 3000 vòng trong 10 phút
- Lấy ra gạn bỏ phần nước trong giữ lại tủa, dùng giấy lọc thấm khô thành ống.
- Cho vào mỗi ống 0,25 ml đệm borat và hoà tan tủa.
- Cho thêm vào mỗi ống 0,25 ml CaCl_2 M / 40 đặt vào bình cách thuỷ 37°C , theo dõi tới lúc đông và bấm đồng hồ theo dõi thời gian tan.

4. Kết quả

- Tan trước 10 phút: tiêu sợi huyết tối cấp, nặng
- Tan 10 - 30 phút: tiêu sợi huyết cấp
- Tan 30 - 60 phút: tiêu sợi huyết bán cấp
- Tan từ 60 - 120 phút: tiêu sợi huyết tiềm tàng
- Tan sau 120 phút: bình thường

5. Nguyên nhân sai lầm

- Trường hợp tiêu sợi huyết cấp, nặng và tiêu sợi huyết nghiêm trọng, dung dịch sẽ không đông được, cần cung cấp thêm fibrinogen cho mỗi ống để dung dịch có thể đông và theo dõi tan.

- Cần phân biệt giảm sợi huyết và tiêu sợi huyết khi theo dõi biến đổi của cục đông.

NGHIỆM PHÁP ETHANOL HOẶC PROTAMIN SULPHAT ĐỂ PHÁT HIỆN FIBRIN MONOMER

1. Nguyên lý

Khi thrombin tác động lên fibrinogen tạo fibrin, một ít fibrin không được polyme hoá sẽ hình thành phức hệ hoà tan với fibrinogen và FDP. Những phức hệ này có thể được phát hiện in vitro bởi ethanol hoặc protamin sulphat.

2. Thuốc thử, hoá chất

- Huyết tương citrat
- Protamin sulphat 1% hoặc ethanol 50% trong nước cất.
- Chứng dương: thêm 0,1 ml thrombin (0,2 đơn vị NIH /ml) vào 0,9 ml huyết tương citrat và ủ vào bình cách thuỷ 37°C trong 30 phút. Những sợi fibrin sẽ được hình thành trong thời gian ủ và sẽ được nhận thấy khi quay ly tâm.

3. Tiến hành kỹ thuật

3.1. *Nghiệm pháp protamin sulphat*

- Thêm 0,05 ml protamin sulphat vào ống nghiệm chứa 1 ml huyết tương bệnh và ống chứng dương.
- Để ống đứng trong bình cách thuỷ 3 phút.

Kết quả dương tính khi thấy hình thành lưới hoặc sợi fibrin. Nếu không thấy là kết quả âm tính.

3.2. *Nghiệm pháp ethanol*

- Trong ống nghiệm có 0,45 ml huyết tương citrat giàu tiểu cầu cho thêm 0,15 ml ethanol 50%, đậy nút kín, đặt ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút.
- Lấy ống nghiệm ra xem. Nếu có sự hình thành gel hoặc đông là kết quả dương tính. Nếu không có tủa vẫn trong là âm tính.

4. Nguyên nhân sai lầm

- Dụng cụ lấy máu không đúng quy cách (ống đựng bệnh phẩm phải là nhựa hoặc thuỷ tinh có tráng silicon).
- Mẫu máu xét nghiệm bị đông
- Dụng cụ làm xét nghiệm không sạch

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH FIBRINOGEN

1. Định lượng nhanh

1.1. Nguyên lý

Sau khi thêm thrombin vào huyết tương thì huyết tương sẽ bị đông. Thời gian đông phụ thuộc hàm lượng fibrinogen trong huyết tương. Dựa vào đó, người ta cho dư thrombin để đánh giá nồng độ fibrinogen.

1.2. Thuốc thử, hoá chất

- Thrombin: dung dịch thrombin 250 đơn vị NIH trong 1 ml NaCl 0,9%
- Đệm barbiton pH 7,4: Trước khi dùng pha với NaCl 0,9% theo tỷ lệ 1: 1
- Fibrinogen 0,4g/l: Fibrinogen người 40 mg/100 ml đệm barbiton.

1.3. Tiến hành kỹ thuật

- Lấy máu, tách huyết tương: tương tự tách huyết tương trong xét nghiệm thời gian Howell.
- Pha dung dịch fibrinogen để có nồng độ 0,1; 0,2; 0,3 g/l trong dung dịch đệm. Chuẩn bị 4 ống nghiệm, cho vào bể ấm 37°C .
- Cho vào mỗi ống 0,2 ml dung dịch fibrinogen theo các nồng độ đã pha.
- Thêm vào 0,2 ml dung dịch thrombin, bấm đồng hồ theo dõi thời gian đông (vừa lắc trộn vừa theo dõi đông). Vẽ đường thẳng chuẩn của thời gian đông và nồng độ fibrinogen trên giấy logarit kép.
- Pha loãng 1/10 huyết tương bệnh nhân trong đệm barbiton và tiến hành xét nghiệm như trên.

1.4. Kết quả

Thời gian đông được đối chiếu trên đường thẳng chuẩn. Sau đó nhân với 10 để có lượng fibrinogen trong huyết tương bệnh nhân. Nếu thời gian đông không nằm trong giới hạn đường thẳng chuẩn thì cần pha mẫu xét nghiệm ở các nồng độ khác cho thích hợp (đặc hay loãng hơn 1/10) và nhân theo tỷ lệ pha loãng mới này.

2. Bán định lượng

2.1. Nguyên lý

Các nồng độ pha loãng của huyết tương bình thường và mẫu xét nghiệm được làm đông bằng thrombin. So sánh hiện tượng đông ở những nồng độ pha loãng khác nhau để tính tỷ lệ fibrinogen trong mẫu xét nghiệm.

Các xét nghiệm được thực hiện với dung dịch pha loãng: (a) trong nước muối, (b) trong nước muối có chứa epsilon aminocaproic acid (EACA) để ngăn ngừa tiêu sợi huyết và (c) trong nước muối có chứa protamin sulphat để ngăn ngừa tác dụng ức chế của sản phẩm thoái hoá fibrinogen và fibrin nếu có. Trong những trường hợp cấp cứu chỉ những nồng độ pha loãng với nước muối có thể đã cho những thông tin cần thiết.

2.2. Thuốc thử, hoá chất

- Huyết tương citrat của bệnh nhân và người bình thường.
- Thrombin: pha 50 đơn vị NIH trong 2 ml dung dịch NaCl 0,9% ngay trước khi dùng.
- EACA: 1 mg/ ml dung dịch NaCl 0,9%.

2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị 3 bộ, mỗi bộ 7 ống nghiệm để xét nghiệm huyết tương bình thường và 3 bộ khác tương tự để xét nghiệm huyết tương bệnh nhân.
- Mỗi ống của bộ thứ nhất cho 0,5 ml nước muối.
- Mỗi ống của bộ thứ hai cho 0,5 ml EACA pha trong nước muối.
- Trong ống một của bộ thứ ba cho 0,5 ml protamin sulphat pha trong nước muối và 6 ống còn lại cho 0,5 ml nước muối.
- Thêm 0,5 ml huyết tương bình thường hoặc mẫu xét nghiệm vào ống đầu của mỗi bộ, trộn đều và chuyển 0,5 ml sang ống 2 và tiếp tục tương tự sang ống 3, 4...như vậy ta sẽ có nồng độ huyết tương từ 1/2 đến 1/128.
- Thêm 0,1 ml thrombin vào mỗi ống và trộn đều.
- Đặt các ống vào bình cách thuỷ 37°C và để yên 15 phút, sau đó kiểm tra xem có fibrin hay không (có đông hay không) ?

2.4. Kết quả

- Bình thường fibrin sẽ có ở trong tất cả các nồng độ pha loãng huyết tương từ 1 đến 1/128. Trong giảm fibrinogen nặng thì không thấy cục đông ở bất kỳ nồng độ nào, nếu giảm nhẹ thì sẽ có cục đông fibrin ở 1 - 3 ống đầu.
- Nếu thấy cục đông ở các ống có EACA pha loãng hơn so với ống chỉ có nước muối thì chứng tỏ tiêu sợi huyết nặng.
- Nếu thấy cục đông ở ống có protamin sulphat nồng độ pha loãng cao hơn so với ống chỉ có nước muối là có sản phẩm thoái hoá fibrinogen và fibrin trong huyết tương.
- Các ống nghiệm của bộ huyết tương bình thường dùng làm chứng dương.

ĐỊNH LƯỢNG CÁC YẾU TỐ DỰA TRÊN CƠ SỞ XÉT NGHIỆM THỜI GIAN PROTHROMBIN (Prothrombin, yếu tố V, VII và X)

1. Nguyên lý chung

– Thời gian prothrombin của huyết tương biểu hiện nồng độ các yếu tố V, VII, X, fibrinogen và prothrombin. Muốn định lượng một trong các yếu tố, người ta theo dõi thời gian prothrombin của huyết tương với thuốc thử có dư các yếu tố khác.

– Thuốc thử đó là các mẫu đông khô của huyết tương người không có prothrombin hoặc yếu tố V hoặc yếu tố VII được bán sẵn. Những sản phẩm này chứa hoạt tính yếu tố cần định lượng không quá 1% nhưng có đủ các yếu tố khác cần thiết cho xét nghiệm thời gian prothrombin.

– Định lượng dựa trên sự so sánh mức độ điều chỉnh thời gian prothrombin của huyết tương thiếu hụt yếu tố đã biết sau khi thêm vào các nồng độ pha loãng của huyết tương bệnh và sau khi thêm vào các nồng độ pha loãng của huyết tương chứng.

– Thời gian prothrombin được đánh giá bằng cách dùng thromboplastin từ ốc động vật (thỏ) với CaCl_2 .

2. Định lượng yếu tố II, V, VII

2.1. Thuốc thử, hoá chất

- Huyết tương thiếu hụt yếu tố định kiểm tra.
- Đệm muối barbiton
- Thromboplastin từ ốc thỏ hoặc ốc người.
- CaCl_2 M / 40 (0,025 mol/l).
- Huyết tương chứng.

2.2. Tiến hành kỹ thuật

– Pha loãng huyết tương chứng và huyết tương cần kiểm tra ở 3 nồng độ: 1/10, 1/50, 1/100 trong đệm.

- Lấy 3 ống nghiệm, trong mỗi ống cho:
 - + 0,1 ml huyết tương chứng đã pha ở các nồng độ trên
 - + 0,1 ml huyết tương không có yếu tố kiểm tra (II hoặc V hoặc VII)
 - + 0,1 ml thromboplastin
- Để vào bình cách thuỷ 30 giây;

- Sau đó thêm vào mỗi ống 0,1 ml CaCl_2 , bấm đồng hồ theo dõi thời gian đông.
- Kẻ đường biểu diễn giữa thời gian đông với độ pha loãng trên giấy logarit kép.

- Tiếp tục làm như thế với huyết tương bệnh rồi đọc kết quả trên đồ thị.

Ghi chú: có thể chuẩn bị các huyết tương thiếu các yếu tố như sau:

- Huyết tương không có yếu tố V có thể được chuẩn bị bằng cách lấy huyết tương oxalat ủ ở 37°C trong 3 ngày trong điều kiện vô trùng (máu chống đông tỷ lệ 9: 1 với oxalat natri 14 g/l), bảo quản ở -20°C .

- Huyết tương không có yếu tố VII có thể chuẩn bị từ huyết tương bệnh nhân dùng Warfarin sau 48 giờ hoặc huyết tương của một loài chó có thiếu hụt yếu tố VII bẩm sinh.

- Nọc rắn Viper Đài Loan (*oxyuranus scutellatus*) có khả năng trực tiếp biến prothrombin thành thrombin trong sự vắng mặt của những yếu tố đông máu đã biết nào đó. Vì thế có thể dùng nó như một thuốc thử đặc hiệu để định lượng yếu tố II một thì.

- Bạch Quốc Tuyên và cộng sự đã sản xuất thuốc thử để định lượng yếu tố II từ huyết thanh oxalat hoá và huyết tương hút với tỷ lệ 1: 2.

- Thuốc thử để định lượng yếu tố VII được sản xuất từ huyết tương cừu chống đông bằng wintrobe, hút bằng bột silicagen G hoặc trên màng lọc amiăng 20%.

3. Định lượng yếu tố X

3.1. Nguyên lý

- Thay thế thromboplastin trong thời gian Quick bằng nọc rắn hổ mang Russell pha loãng ta sẽ có thời gian đông dài hơn. Nọc rắn hoạt hoá rất mạnh yếu tố X mà không cần sự tham gia của yếu tố VII.

- Để định lượng yếu tố X, người ta dùng một thuốc thử đó là huyết tương bò lọc qua than hoạt. Thuốc thử này thiếu hụt cả hai yếu tố VII và X. Nhưng nếu thay thromboplastin bằng nọc rắn Russell để xét nghiệm thời gian prothrombin, yếu tố VII thiếu hụt sẽ không ảnh hưởng đến kết quả.

- So sánh thời gian prothrombin với nọc rắn Russell của thuốc thử nhờ yếu tố X của huyết tương chứng và bệnh để biết nồng độ yếu tố X của bệnh nhân.

3.2. Thuốc thử, hoá chất

- Huyết tương bò lọc amiăng (không có yếu tố X)
- Dung dịch nọc rắn Russell 1/150000 pha với cephalin.
- Cephalin pha với đệm muối pH 7,4 để có nồng độ thích hợp.
- Huyết tương citrat của chứng và bệnh.
- CaCl_2 M/ 40
- Ống nghiệm, pipette, thùng cách thuỷ, đồng hồ bấm giây.

3.3. Tiến hành kỹ thuật

– Pha loãng huyết tương chứng và bệnh 1/10, 1/100, 1/1000 trong đệm muối pH 7,4.

– Cho vào mỗi ống nghiệm 0,1 ml huyết tương bò không có yếu tố X, 0,1 ml huyết tương chứng và bệnh pha loãng ở các nồng độ và 0,1 ml thuốc thử gồm nọc rắn với cephalin.

– Để vào thùng cách thủy.

– Sau đúng 30 giây cho thêm 0,1 ml CaCl_2 M/40, bấm đồng hồ theo dõi thời gian đông. Làm mỗi ống của mỗi nồng độ lặp lại 2 lần.

3.4. Kết quả

– Thời gian đông của các nồng độ huyết tương chứng sẽ được vẽ thành đường thẳng trên giấy logarit kép.

– Hoạt tính yếu tố X của bệnh có thể đọc trên đồ thị theo kết quả thời gian đông của ống có huyết tương bệnh pha loãng 1/10.

4. Nguyên nhân sai lầm

(của định lượng các yếu tố dựa trên cơ sở thời gian prothrombin).

Ngoài những nguyên nhân chung như lấy bệnh phẩm không chính xác, dụng cụ không sạch, ở đây cần chú ý đến chất lượng của thuốc thử: nếu trong đó còn nhiều yếu tố mà ta cần loại trừ, kết quả sẽ không chính xác.

ĐỊNH LƯỢNG CÁC YẾU TỐ DỰA TRÊN CƠ SỞ THỜI GIAN THROMBOPLASTIN TỪNG PHẦN (Yếu tố VIII, IX, XI và XII)

1. Nguyên lý

Thời gian thromboplastin từng phần của huyết tương người hay huyết tương bò không có một trong các yếu tố VIII, IX, XI và XII sẽ bị kéo dài. Thời gian này sẽ được điều chỉnh khi bổ sung huyết tương có yếu tố thiếu hụt đó. Mức độ điều chỉnh phụ thuộc nồng độ yếu tố thiếu hụt trong huyết tương bổ sung. Dựa vào đó, người ta pha loãng huyết tương cần xét nghiệm ra các nồng độ khác nhau và trộn với huyết tương không có yếu tố cần khảo sát (huyết tương thử) để theo dõi mức độ điều chỉnh và tính ra nồng độ yếu tố đông máu đó.

Ở đây chúng tôi mô tả phương pháp định lượng yếu tố VIII C một thì còn phương pháp định lượng các yếu tố IX, XI, XII cũng tương tự.

2. Kỹ thuật

2.1. Định lượng yếu tố VIII C

2.1.1. Dụng cụ, hoá chất

- Huyết tương thử: là huyết tương không có yếu tố VIII C, có thể dùng loại đông khô bán sẵn, có thể dùng huyết tương của bệnh nhân hemophilia A có hoạt tính yếu tố VIII C dưới 1% hoặc có thời gian sinh thromboplastin từng phần hoạt hoá trên 150 giây và không có kháng thể kháng yếu tố VIII C.

- Cephalin: có thể dùng loại đông khô bán sẵn hoặc tự sản xuất tại phòng thí nghiệm.

- CaCl_2 M/40.

- Kaolin: 5 g/l trong đệm.

- Huyết tương chứng: có thể dùng pool huyết tương của người bình thường, có thể dùng huyết tương đã biết trước hoạt tính yếu tố VIII C.

2.1.2. Quy trình kỹ thuật

- Lấy máu bệnh nhân tách huyết tương như xét nghiệm thời gian Howell.

- Pha loãng huyết tương

+ Pha loãng huyết tương chứng theo tỷ lệ: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 trong đệm Michaelis pH 7,3.

+ Pha loãng huyết tương bệnh nhân theo tỷ lệ 1/10 (nếu bệnh phẩm là mẫu yếu tố VIII cô đặc thì cần pha loãng hơn).

- Tiến hành xét nghiệm:

+ Xây dựng đồ thị chuẩn: trong một dãy ống nghiệm:

Mỗi ống cho 0,1 ml huyết tương chứng ở mỗi nồng độ pha loãng,

0,1 ml huyết tương thử (không có yếu tố VIII C),

0,1 ml hỗn dịch cephalin-kaolin

Ủ ở bình cách thuỷ 37°C trong 2 phút.

Sau đó thêm 0,1 ml CaCl_2 M/40 .

Bấm đồng hồ, theo dõi thời gian đông.

Dựa vào thời gian đông ở các độ pha loãng, ta dựng một đồ thị trong đó trục tung là thời gian đông của các độ pha loãng, trục hoành là hoạt tính của yếu tố VIII C. Đồ thị sẽ là một đường thẳng.

+ Xét nghiệm mẫu kiểm tra: các bước tiến hành như đối với huyết tương chứng.

Dựa vào đồ thị ta tính được nồng độ yếu tố VIII C.

- Hoạt tính yếu tố VIII C của người bình thường là 50 - 200%.

2.1.3. Nguyên nhân sai lầm

- Huyết tương thử chưa đúng tiêu chuẩn (còn hoạt tính VIII C trên 1%).

- Kết quả thời gian đông của các nồng độ pha loãng huyết tương chứng không chính xác nên đồ thị không phải là một đường thẳng.

- Một số nguyên nhân chung: dụng cụ làm xét nghiệm không sạch, lấy bệnh phẩm không chuẩn.

Lưu ý: Ngoài sử dụng huyết tương chứng, người ta còn dùng huyết tương chuẩn để kiểm tra, quy trình giống như đối với huyết tương chứng và đồ thị là một đường thẳng song song với đường thẳng của huyết tương chứng.

2.2. Định lượng các yếu tố khác

Các bước tiến hành tương tự định lượng yếu tố VIII C, ở đây chỉ trình bày cách chuẩn bị huyết tương thử.

2.2.1. Định lượng yếu tố IX

Huyết thanh không có yếu tố IX:

- Lấy 3 ml máu bệnh nhân bị bệnh hemophilia B cho vào ống nghiệm nhỏ
- Cho thêm vào 3 giọt thromboplastin đã pha loãng 1/10 trong dung dịch NaCl 0,9% hoặc dung dịch đệm Michelis pH 7,3.
- Để đông ở thùng cách thuỷ 37°C trong 4 giờ cho cục máu co hoàn toàn, quay ly tâm tách huyết thanh.

2.2.2. Định lượng yếu tố XI

Huyết tương không có yếu tố XI:

- Lấy máu chống đông bằng citrat
- Ly tâm mạnh tách lấy huyết tương nghèo tiểu cầu
- Hoạt hoá yếu tố XII bằng Celit
- Để ở bình cách thuỷ 37°C trong 6 giờ để tiêu thụ hết yếu tố XI.
- Thử lại thời gian APTT, chỉ sử dụng làm huyết tương thử khi thời gian APTT từ 150 giây trở lên.

Lưu ý:

Máu của bệnh nhân hemophilia dùng sản xuất thuốc thử phải không có kháng thể kháng yếu tố đó (IX, XI).

ĐỊNH LƯỢNG YẾU TỐ XIII

1. Nguyên lý

Yếu tố XIII được hoạt hoá trong quá trình đông máu nhờ ion calci và thrombin. Yếu tố XIII hoạt hoá làm ổn định cục fibrin.

Khi có đủ yếu tố XIII cục fibrin sẽ không hoà tan trong dung dịch urê 5mol/l, còn cục fibrin được tạo từ huyết tương thiếu yếu tố XIII sẽ bị tan.

2. Thuốc thử, hoá chất

- Huyết tương citrat của bệnh và của chứng.
- CaCl_2 M/40
- Urê 5 mol/l (300 g/l)

3. Tiến hành kỹ thuật

- Chuẩn bị 2 ống nghiệm thuỷ tinh kích thước 75 x12 mm
- Cho 0,2 ml huyết tương chứng hoặc bệnh vào mỗi ống
- Cho thêm 0,2 ml CaCl_2 M/40 vào từng ống
- Ủ ở thùng cách thuỷ 37°C trong 30 phút, sau đó thêm 3 ml dung dịch urê 5 mol/l.
- Lắc cục đông trong dung dịch urê. Để ống nghiệm ở nhiệt độ phòng qua đêm và kiểm tra cục đông vào hôm sau.

4. Kết quả

- Nếu yếu tố XIII có trong huyết tương thì cục đông vẫn còn.
- Phương pháp này thường chỉ dùng để chẩn đoán thiếu yếu tố XIII bẩm sinh và những trường hợp yếu tố XIII < 1%.

Lưu ý:

- Để biết khả năng làm tan cục fibrin của dung dịch urê, người ta tiến hành làm xét nghiệm với ống chứng dương như sau: trong ống nghiệm cho 0,2 ml huyết tương citrat, 0,2ml thrombin, sau đó cho dung dịch urê như trên. Cục đông sẽ tan trong urê vì yếu tố XIII không hoạt hoá do thiếu Ca^{++} .
- Có thể thay dung dịch urê 5 mol /l bằng acid monochloracetic 2%.

ĐỊNH LƯỢNG SẢN PHẨM THOẢI HOÁ FIBRINOGEN VÀ FIBRIN (*Fibrinogen and fibrin degradation products - FDP*)

- FDP có mặt nhanh chóng trong máu ở cả hai trường hợp: tiêu sợi huyết toàn thể và tiêu sợi huyết cục bộ kết hợp với sự lắng đọng fibrin trong lòng mạch (có đông máu trong lòng mạch).
- Trong máu người bình thường có thể có FDP dưới dạng vết, đó là kết quả của tiêu sợi huyết sinh lý. FDP cao hơn trong thời kỳ kinh nguyệt, đặc biệt ở người rong kinh. FDP cũng tăng ở người xơ gan, tắc mạch, nhồi máu phổi và trong bệnh nhân ghép thận. Ở bệnh nhân ghép thận, tăng FDP trong nước tiểu là biểu hiện của tình trạng thải ghép.

– FDP cản trở phản ứng thrombin - fibrinogen, làm kéo dài thời gian thrombin huyết tương. Huyết thanh có FDP sẽ làm tăng nhanh sự kết tụ của tiểu cầu.

– Phương pháp miễn dịch là phương pháp nhạy nhất để xác định FDP.

1. Định lượng FDP dựa vào phương pháp miễn dịch ức chế ngưng kết hồng cầu của Merskey

1.1 Nguyên lý

FDP có tính kháng nguyên, sẽ phản ứng với kháng thể kháng fibrinogen người. Khi cho vào huyết thanh có FDP, kháng thể kháng fibrinogen người sẽ bị trung hoà và do đó giảm khả năng ngưng kết hồng cầu được gắn fibrinogen (ức chế ngưng kết hồng cầu).

1.2. Chuẩn bị thuốc thử, hoá chất và dụng cụ

1.2.1. Thuốc thử

- Dung dịch đệm pH 7,2
- + KH_2PO_4 0,15 M 23,9 ml
- + Na_2HPO_4 0,15 M 76 ml
- + NaCl 0,85 % 100 ml
- Dung dịch đệm phosphat citrat pH 6,4
- + 0,35 thể tích Na_2HPO_4 0,15 M
- + 0,65 thể tích KH_2PO_4 0,25 M
- + 1 thể tích natri citrat 0,1 M

1.2.2. Huyết thanh người bình thường và huyết thanh bệnh

- Lấy 3 ml máu không chống đông vào ống nghiệm có sẵn 10 mg chất ức chế: acid amino caproic (hoặc chất ức chế Kuniet).
- Để ở thùng cách thuỷ 37°C trong 3 giờ.
- Quay ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút, tách lấy huyết thanh.

1.2.3. Huyết tương chứng

- Trộn huyết tương citrat của những người bình thường cùng nhóm hồng cầu hệ ABO.
- Ly tâm mạnh 3000-5000 vòng/phút trong 20 phút. Bỏ cặn, định lượng fibrinogen trong huyết tương đó.

1.2.4. Huyết thanh chống fibrinogen người

- Tiêm fibrinogen người cho thỏ tạo kháng thể. Khi có hiệu giá cao đạt yêu cầu thì lấy máu thỏ không chống đông, thu huyết thanh, kiểm tra bằng điện di miễn dịch và hiệu giá kháng thể trước khi lưu trữ.

1.2.5. Hồng cầu người nhóm O hoặc hồng cầu cừu

- Lấy 20ml máu, chống đông bằng 3 ml ACD hoặc citrat, máu để lưu trữ 2 ngày trước khi cảm nhiễm.
- Xử lý hồng cầu với acid tanic 1/200.000:
- + Rửa hồng cầu 7 lần bằng đệm pH 7,2.
- + Pha hồng cầu 5% trong đệm pH 7,2
- + Xử lý với acid tanic: 1 thể tích hồng cầu 5 % với 1 thể tích acid tanic 1/200.000, để ở nhiệt độ phòng (có thể trong giới hạn 22- 37°C) trong 20 phút.
- Rửa hồng cầu 3 lần bằng đệm pH 7,2 và cuối cùng pha thành hồng cầu 5 % trong đệm.

1.2.6. Dụng cụ vi ngưng kết, khay nhựa nhiều hàng lỗ

1.3. Tiến hành kỹ thuật

1.3.1. Hiệu giá kháng thể

- Cảm nhiễm hồng cầu
- + Hồng cầu 5% tiếp xúc với huyết tương người pha loãng 1/250 trong dung dịch đệm pH 7,2.
- + Hồng cầu 5% tiếp xúc với huyết thanh pha loãng 1/250
(1 thể tích hồng cầu, 1 thể tích huyết tương hoặc huyết thanh pha loãng 1/250 ủ ở 37°C trong 30 phút).
- + Rửa hồng cầu 3 lần rồi pha lại 5%.
- Chọn nồng độ kháng huyết thanh
- + Pha loãng kháng huyết thanh bằng dung dịch đệm pH 7,2 có chứa 1% gelatin trên hai hàng lỗ.
- + Hàng lỗ 1 sẽ có thêm hồng cầu 5% đã tiếp xúc với huyết tương pha 1/250
- + Hàng lỗ 2 có thêm hồng cầu đã tiếp xúc với huyết thanh pha 1/250
- + Để ở nhiệt độ phòng, sau 1-2 giờ đọc ngưng kết
- + Nồng độ kháng huyết thanh được dùng là nồng độ lớn hơn 2 độ pha loãng so với độ pha loãng cuối cùng còn ngưng kết.

1.3.2. Định lượng FDP

- Pha loãng huyết tương chuẩn (Pool đã được định lượng fibrinogen) trong đệm pH 7,2 có 1 % gelatin với nồng độ: 1/30, 1/90, 1/270, 1/540.
(Với các mẫu kiểm tra và huyết thanh bình thường (có chất ức chế) thì pha 1/3, 1/9, 1/27...).
- Cho 0,05 ml huyết thanh ở hiệu giá đã chọn vào mỗi lỗ ủ 10-30 phút ở 4°C, thêm vào mỗi lỗ 0,05 ml hồng cầu 5% đã cảm nhiễm để nhiệt độ phòng 2 giờ.

1.4. Kết quả

- Chứng dương là hàng có huyết tương chuẩn.
- Chứng âm là hàng có huyết thanh người bình thường.
- Mức độ ngưng kết ở độ pha loãng của mẫu cần kiểm tra được so sánh với huyết tương chuẩn.

Thí dụ; huyết tương chuẩn có chứa 300mg/l, fibrinogen ức chế độ ngưng kết ở 1/600 thì mỗi độ pha loãng sẽ là:

$$300 \times \frac{1000}{100} \times \frac{1}{6000} = 0,5\mu\text{g/ml}$$

Nếu ức chế ngưng kết xảy ra ở 1/80 của hàng mẫu cần kiểm tra thì trong mẫu sẽ có $0,5\mu\text{g/ml} \times 80/1 = 40\mu\text{g/ml}$ FDP.

Bình thường trong huyết thanh có từ 0-5 $\mu\text{g/ml}$.

1.5. Nguyên nhân sai lầm

- Nồng độ acid tanic không thích hợp để xử lý hồng cầu
- Kháng huyết thanh không đảm bảo chất lượng.

2. Định lượng FDP bằng phương pháp ngưng kết latex

2.1. Nguyên lý

Khi trộn huyết thanh hoặc nước tiểu với dịch treo có hạt latex đã gắn kháng thể đặc hiệu chống FDP, nếu có hiện tượng ngưng kết, nghĩa là trong huyết thanh hoặc nước tiểu có FDP. Phương pháp bán định lượng được tiến hành bằng cách pha loãng mẫu xét nghiệm ở các nồng độ khác nhau.

2.2 Thuốc thử, hoá chất

Dùng thrombo-wellcotest kit (Wellcome reagents LTD. Beckenham, Kent).

2.3. Tiến hành kỹ thuật

- Tách huyết thanh:
 - + Lấy 2ml máu vào một ống nghiệm chuyên dụng cho xét nghiệm FDP (có chứa thrombin và chất ức chế tiêu diệt để máu đông nhanh và ngăn ngừa tiêu sợi huyết invitro).
 - + Để ống máu vào thùng cách thuỷ 37°C cho đến khi cục máu bắt đầu co, quay ly tâm tách lấy huyết thanh để làm xét nghiệm.
- Thực hiện phản ứng:
 - + Pha loãng huyết thanh 1/5, 1/20 với đệm glycin có trong bộ kit.
 - + Lấy một giọt hỗn dịch ở mỗi độ pha loãng của huyết thanh nhỏ vào phiến kính với một giọt dịch treo latex. Lắc phiến kính nhẹ nhàng cho đến khi nhìn thấy ngưng kết các hạt latex bằng mắt thường (thời gian không quá 2 phút).

– Nếu chất xét nghiệm là nước tiểu cũng làm tương tự như huyết thanh: cho 2 ml nước tiểu vào ống chuyên dụng, đặt vào thùng cách thuỷ 37°C khoảng 30 phút, sau đó lọc nước tiểu qua giấy lọc hình đĩa (Whatman GF/B). Thực hiện phản ứng với nước tiểu không pha loãng và pha loãng 1/5.

2.4. Kết quả

– Huyết thanh: nếu xuất hiện ngưng kết ở độ pha loãng 1/5 thì lượng FDP trong huyết thanh không quá 10 µg/ml, nếu ngưng kết ở độ pha loãng 1/20 thì lượng FDP trong huyết thanh không quá 40 µg/ml.

– Nước tiểu: Nếu ngưng kết ở nước tiểu không pha loãng thì FDP không quá 2 µg/ml, nếu ngưng kết ở độ pha loãng 1/5 thì FDP không quá 10 mg/ml nước tiểu.

– Kết quả của phương pháp dùng latex tương tự với phương pháp dùng hồng cầu xử lý bằng acid tanic nhưng nó cho kết quả nhanh và tiện cho những phòng xét nghiệm không làm thường xuyên.

HOẠT TÍNH YẾU TỔ 3 TIỂU CẦU (Phương pháp Rabiner và Hrodek)

1. Nguyên lý

Hoạt tính yếu tố 3 tiểu cầu xác định bằng sự khác nhau của thời gian được phục hồi calci của huyết tương sau khi được hoạt hóa bởi kaolin trước và sau khi loại bỏ tiểu cầu. Bán định lượng được đánh giá qua đường biểu diễn thời gian đông của huyết tương bình thường với số lượng tiểu cầu $50 \times 10^9/l$, $25 \times 10^9/l$, $12,5 \times 10^9/l$.

2. Thuốc thử, hoá chất

– Máu chống đông bằng citrat natri 3,8% tỉ lệ 1/10 trong ống nghiệm nhựa hoặc thủy tinh tráng silicon. Quay li tâm để có huyết tương giàu tiểu cầu và nghèo tiểu cầu.

– Dùng huyết tương nghèo tiểu cầu để pha loãng huyết tương giàu tiểu cầu, để có 50×10^9 và $12,5 \times 10^9/l$, có thể dùng pool huyết tương nghèo tiểu cầu của người bình thường nhưng để lâu.

– Dùng pool huyết tương nghèo tiểu cầu bình thường pha huyết tương giàu tiểu cầu để có số lượng tiểu cầu 50×10^9 , 25×10^9 và $12,5 \times 10^9/l$.

– CaCl_2 M/40

– Kaolin 5mg/ml hoặc celit 15mg/ml.

– Đệm Michalis pH 7,3

3. Tiến hành kỹ thuật

– Trong các ống nghiệm chứa 0,1ml huyết tương có chứa số lượng tiểu cầu khác nhau: 50×10^9 , 25×10^9 và $12,5 \times 10^9/l$ và nghèo tiểu cầu chứng, 50×10^9 , 25×10^9 ; và nghèo tiểu cầu bệnh.

– Đặt vào thùng cách thuỷ 37°C , cho thêm 0,1ml hỗn dịch kaolin 5mg/ml hay celit 15mg/ml lắc đều. Đứng 2 phút sau cho thêm 0,1ml CaCl M/40 bấm đồng hồ theo dõi thời gian đông.

4. Kết quả

– Sự khác nhau giữa thời gian đông của ống huyết tương giàu và nghèo tiểu cầu nói lên hoạt tính yếu tố 3 tiểu cầu.

– Qua thời gian đông của các ống huyết tương chứng, vẽ đường thang thẳng chuẩn trên giấy logarit kép với trục tung là thời gian đông, trục hoành là các nồng độ tiểu cầu ($50 \times 10^9/l$ tương đương 100%, $25 \times 10^9/l$ tương đương 50%...). Từ đồ thị này tính được hoạt tính yếu tố 3 tiểu cầu của bệnh nhân qua thời gian đông.

5. Nguyên nhân sai lầm

- Máu lấy để lâu quá 3 giờ mới làm xét nghiệm
- Pha loãng tiểu cầu không chính xác

XÉT NGHIỆM ĐO ĐỘ NGỪNG TẬP TIỂU CẦU

Có hai phương pháp chính được sử dụng để đánh giá độ ngưng tập tiểu cầu: Đo độ ngưng tập tiểu cầu tự phát và đo độ sau khi cho chất kích tập vào.

1. Nguyên lý: Kỹ thuật đo ngưng tập tiểu cầu bằng máy đo ngưng tập tiểu cầu tự động khi cho chất kích tập từ ngoài vào:

Khi cho chất kích tập (ADP, collagen...), tiểu cầu sẽ ngưng tập không hồi phục và làm thay đổi mật độ quang hoặc độ trở kháng của dòng điện. Mức độ thay đổi ngưng tập được phản ánh qua mức độ thay đổi mật độ quang hoặc độ trở kháng.

2. Hoá chất, phương tiện, dụng cụ

- Máy đo ngưng tập tiểu cầu tự động
- Chất kích tập: ADP, collagen..., với nồng độ thích hợp
- Mẫu máu: máu tĩnh mạch, lấy bằng bơm tiêm nhựa, ống nhựa, chống đông bằng citrat natri 3,8% (hoặc 3,4%) theo tỷ lệ 1 thể tích chống đông trộn với 9 thể tích máu. Ly tâm thu huyết tương giàu tiểu cầu và huyết tương nghèo tiểu cầu. Trong một số trường hợp, có thể sử dụng máu toàn phần để làm xét nghiệm.

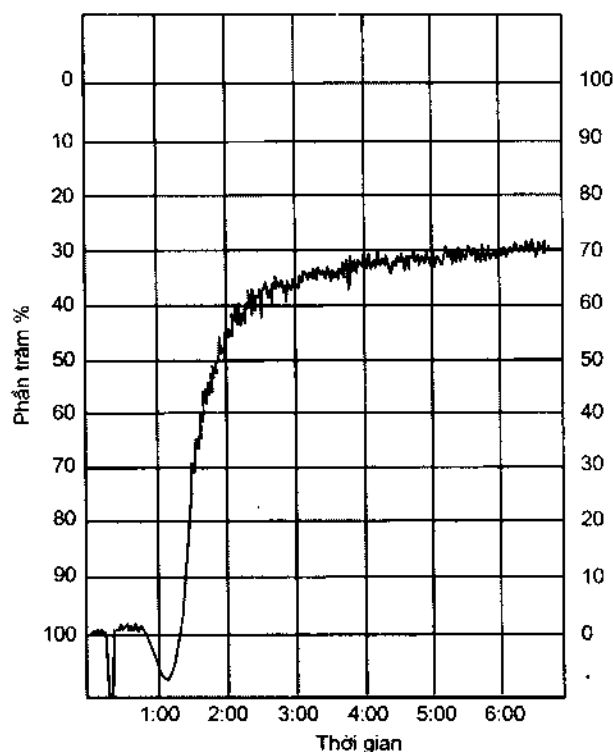
3. Quy trình kỹ thuật

- Phân phối huyết tương giàu tiểu cầu và nghèo tiểu cầu vào các ống (lượng huyết tương tùy theo từng máy) và đặt vào các vị trí quy định trên máy.
- Tiến hành các bước theo tuần tự quy định (phụ thuộc từng loại máy).

4. Kết quả và đánh giá

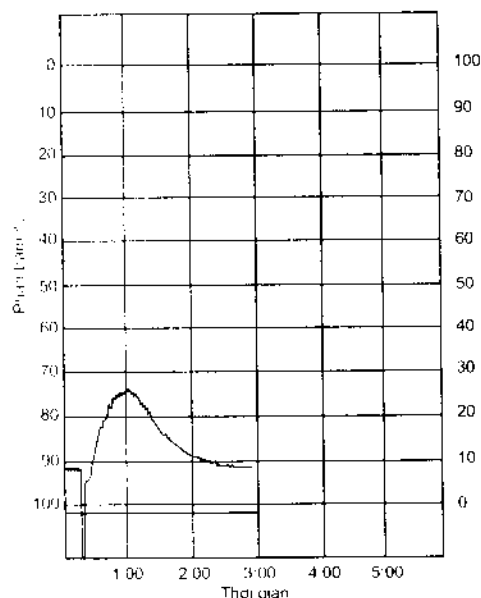
Kết quả ngưng tập tiểu cầu được thể hiện bằng: độ ngưng tập tối đa, độ dốc của đường cong ngưng tập, thời gian xuất hiện ngưng tập, thời gian kể từ khi xuất hiện ngưng tập đến khi đạt ngưng tập tối đa. Kết quả ngưng tập tiểu cầu thể hiện bằng độ ngưng tập tối đa thường được sử dụng nhất.

Trị số bình thường của ngưng tập tiểu cầu tùy thuộc vào từng loại máy, tùy thuộc vào loại, nồng độ chất kích tập. Mỗi phòng xét nghiệm nên có trị số bình thường của riêng mình.



Hình 2.1: Đường biểu diễn ngưng tập tiểu cầu với ADP ở người bình thường

Ngưng tập tiểu cầu giảm trong các bệnh lý giảm chức năng tiểu cầu bẩm sinh hoặc mắc phải. Tùy từng loại bệnh mà ngưng tập tiểu cầu giảm với các chất kích tập khác nhau.



Hình 2.2: Đường biểu diễn ngưng tập tiểu cầu với ADP ở người độ ngưng tập tiểu cầu giảm

Ngưng tập tiểu cầu tăng trong những trường hợp tăng hoạt hoá tiểu cầu: phụ nữ có thai, phẫu thuật, một số bệnh lý tim mạch.

5. Những lưu ý khi tiến hành kỹ thuật

- Đối với những trường hợp sử dụng máy đo độ ngưng tập bằng nguyên lý thay đổi mật độ quang, bệnh nhân cần nhịn ăn trong vòng 12 giờ trước khi lấy máu.
- Kết quả ngưng tập tiểu cầu ở những mẫu huyết tương giàu tiểu cầu có số lượng tiểu cầu $< 200.10^9/l$ hoặc $> 400.10^9/l$ ít có giá trị trong đánh giá chất lượng tiểu cầu.
- Đối với những trường hợp sử dụng máu toàn phần để đo ngưng tập tiểu cầu: kết quả bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, đặc biệt là hematocrit.

XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH SỰ CÓ MẶT CỦA CÁC CHẤT KHÁNG ĐÔNG LƯU HÀNH

1. Nguyên lý

Thời gian một xét nghiệm đông máu kéo dài do: hoặc thiếu hụt một hay nhiều yếu tố đông máu hoặc sự có mặt của chất kháng đông lưu hành. Nguyên lý phát hiện kháng đông lưu hành dựa vào khả năng bù của các yếu tố đông máu. Thời gian đông của hỗn hợp 1 thể tích huyết tương bình thường và 1 thể tích huyết tương của bệnh nhân thiếu hụt 1 hay nhiều yếu tố đông máu sẽ gần bằng thời gian đông của huyết tương bình thường. Trái lại, thời gian đông của hỗn hợp

1 thể tích huyết tương bình thường và 1 thể tích huyết tương của bệnh nhân có chất kháng đông lưu hành sẽ kéo dài gần bằng thời gian đông của huyết tương bệnh nhân.

2. Dụng cụ, thuốc thử, hoá chất

- Bình cách thuỷ 37°C.
- Ống nghiệm kích thước 75x9,5mm.
- Đồng hồ bấm giây.
- Huyết tương chứng.
- Tuỳ theo loại xét nghiệm cần tiến hành (thời gian prothrombin hay thời gian kaolin-cephalin hoạt hoá v.v...) mà chuẩn bị thuốc thử.

3. Tiến hành kỹ thuật

- Lấy máu tách huyết tương: như xét nghiệm thời gian Howell.
- Tiến hành xét nghiệm đồng thời với 3 mẫu huyết tương trong cùng điều kiện:
 - + Mẫu huyết tương chứng.
 - + Mẫu huyết tương bệnh.
 - + Mẫu huyết tương hỗn hợp chứng và bệnh theo tỷ lệ 1/1.
- Ghi thời gian đông của cả 3 mẫu.

Trong một số trường hợp, tiến hành lại xét nghiệm với cả 3 mẫu sau khi ủ 2 giờ ở bình cách thuỷ 37°C.

4. Kết quả

Thời gian đông của mẫu huyết tương hỗn hợp chứng và bệnh tỷ lệ 1/1 kéo dài gần với thời gian đông của huyết tương bệnh chứng tỏ sự có mặt của kháng đông lưu hành. Cần tiến hành xác định bản chất của kháng đông lưu hành này.

Thời gian cephalin - kaolin	Thời gian prothrombin	Thời gian thrombin	Chất kháng đông lưu hành
Kéo dài	Bình thường	Bình thường	XII, IX, XI, VIII
Bình thường	Kéo dài	Bình thường	VII _a - thromboplastin tổ chức.
Kéo dài	Kéo dài	Bình thường	X, V, II
Kéo dài	Kéo dài	Kéo dài	Thrombin

Chỉ số Rosner:

$$\frac{\text{APTT (bệnh + chứng)} - \text{APTT (chứng)}}{\text{APTT (bệnh)}} \times 100$$

Kết quả chỉ số:

- < 12: Kháng đông nội sinh (-)
- >12 - <15: Kháng đông nội sinh nghi ngờ (±)
- > 15: Kháng đông nội sinh (+)

XÉT NGHIỆM CÁC YẾU TỐ KHÁNG ĐÔNG MÁU (ANTI - COAGUBATION): PROTEIN C, PROTEIN S, ANTITHROMBIN III

Các chất kháng đông sinh lý bao gồm: Protein C (Pc), protein S (Ps) và antithrombin III (AT III), khi bị thiếu hụt (gặp trong các bệnh nhân bị bệnh di truyền bẩm sinh) hoặc giảm sút về hàm lượng và hoạt tính (gặp trong các bệnh nhân bị rối loạn đông máu theo hướng tăng đông) có nguy cơ dẫn đến huyết khối và tắc mạch. Cho nên việc xét nghiệm các yếu tố này rất cần cho chẩn đoán và tiên lượng bệnh.

1. Xét nghiệm protein C và protein S

Ở các bệnh nhân thiếu hụt Pc, Ps các xét nghiệm APTT, PT bình thường, vì vậy việc xác định nồng độ và hoạt tính của Pc, Ps ở các bệnh nhân này có giá trị chẩn đoán cao.

- Protein C: Nguyên lý kỹ thuật: vì Pc là 1 kháng nguyên, nên xu hướng dùng phương pháp miễn dịch như điện di miễn dịch, phóng xạ miễn dịch, miễn dịch gắn men (ELISA) dùng kháng thể đơn dòng đặc hiệu Pc đang được chú ý phát triển. kỹ thuật quang học so màu dùng kit STA - Staclot - Pc cũng được áp dụng. Ở người lớn mức độ Pc > 70%, ở trẻ em thấp hơn.

- Protein S: Do hàm lượng protein s phức tạp hơn vì có 2 thành phần: Protein S tự do và Ps kết hợp gắn với C4b. Thiếu hụt Ps có thể phát hiện qua 2 dạng: giảm Ps toàn phần và giảm Ps tự do. Thông thường các kỹ thuật miễn dịch hướng phát hiện Ps tự do, tương tự như kỹ thuật ELISA phát hiện Pc. Cũng có thể dùng kỹ thuật điện di miễn dịch chéo (Crossed Immunophoresis) phát hiện có tính chất định tính Ps tự do và protein s liên hợp.

2. Xét nghiệm Anti - thrombin III (AT III)

AT III là chất kháng đông quan trọng, cùng với Pc, Ps đóng vai trò là các yếu tố nguy cơ gây huyết khối, tắc mạch. Ở lâm sàng có thể gặp hai thể: bẩm sinh di truyền và mắc phải, cả hai đều có thể gây hậu rối loạn đông máu theo hướng tăng đông gây huyết khối (Thrombosis).

Nguyên lý kỹ thuật xác định AT III: AT III là 1 protein chúng là 1 kháng nguyên, nên phương pháp miễn dịch được coi là phương pháp ưu tiên phát triển. Tuy nhiên, cũng như Pc, Ps việc chiết tách Pc, Ps, AT III tạo kháng thể đơn dòng là công việc phức tạp. Có hai nhóm kỹ thuật: kỹ thuật theo đường chức năng và kỹ thuật theo đường miễn dịch.

Các kỹ thuật miễn dịch được sử dụng để xác định AT III, các kỹ thuật này bao gồm:

- Điện di miễn dịch (Immunophoresis)

- Miễn dịch khuếch tán (Immunodiffusion)
- Phóng xạ miễn dịch (Radio - Immunoassay)
- Miễn dịch gắn men (Enzym litted Immunoassay = ELISA)

Trong đó kỹ thuật ELISA sử dụng kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies) đặc hiệu AT III được quan tâm phát triển nhất.

Ở nước ta, các xét nghiệm về các chất kháng đông sinh lý trên tới nay chưa được phát triển rộng trong chẩn đoán và tiên lượng, các yếu tố gây huyết khối, tắc mạch. Nhưng trong thời gian không xa do sự gia tăng các tai biến về tim mạch, sản khoa v.v... đòi hỏi áp dụng các kỹ thuật định hướng các yếu tố kháng đông góp phần chẩn đoán và tiên lượng huyết khối và tắc mạch do vai trò của Pc, Ps, AT III hoặc bẩm sinh hoặc mắc phải gây nên.

Chương 3

DI TRUYỀN HUYẾT HỌC

CÂY MÁU NGOẠI VI PHÂN TÍCH NHIỄM SẮC THỂ

1. Nguyên lý

Các tế bào lympho máu ngoại vi khi tiếp xúc với chất gây phân bào (mitogene) có khả năng chuyển dạng thành tế bào non và phân chia. Lợi dụng khả năng đó, người ta nuôi cấy máu ngoại vi trong môi trường có chất kích thích phân bào và sau đó làm ngừng phân bào ở kỳ giữa - giai đoạn có hình dạng nhiễm sắc thể (NST) điển hình để làm tiêu bản quan sát NST. Phân tích NST tế bào máu ngoại vi cho phép chẩn đoán các hội chứng di truyền do bất thường NST, xác định NST giới của cá thể hoặc phát hiện một số tổn thương NST.

2. Dụng cụ, hoá chất

2.1. Hoá chất

1. Heparin 5000 UI/ ml. Lọ 5 ml.
2. Môi trường nuôi cấy tế bào: TC 199, RPMI hoặc môi trường MEM.
3. Chất kích thích phân bào (PHA = Phytohemagglutinine).
4. Huyết thanh nhóm máu AB.
5. Dung dịch colcemid 0,004 ‰ (4 µg/ml)
6. Chuẩn bị dung dịch nhuộm tương
 - Hoặc dung dịch KCl 0,075M
 - Hoặc dung dịch huyết thanh AB pha loãng 1/6 trong nước cất
7. Chuẩn bị dung dịch cố định
 - Dung dịch Carnoy I
 - + Cồn ethylic 99° : 6 thể tích.
 - + Acid acetic đặc : 1 thể tích.
 - + Chlorofoor : 3 thể tích.
 - Dung dịch Carnoy II
 - Cồn ethylic 99° : 3 thể tích.
 - + Acid acetic : 1 thể tích.

2.2. Chuẩn bị dụng cụ

- Bơm tiêm vô khuẩn.
- Lọ cấy vô trùng có dung tích 15 - 30 ml.
- Pipette các loại.
- Ống ly tâm nhọn đáy dung tích 10 - 15ml.
- Lam kính sạch.
- Tủ ấm 37°C.
- Tủ lạnh.
- Máy ly tâm quay ngang.
- Buồng cấy vô khuẩn.
- Kính hiển vi.

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Nuôi cấy

- Lấy máu tĩnh mạch vào bơm tiêm có tráng heparin, lượng máu lấy từ 1-2ml.
- Trong mỗi lọ cấy cho: 6,5 ml dung dịch nuôi cấy.

1 ml huyết thanh AB.

0,1 ml PHA.

0,4 ml máu.

Lắc nhẹ lọ cấy, để tủ ấm 37°C có 5% CO₂ (có thể đậy nút lọ cấy và để tủ ấm thường 37°C) trong thời gian 72 giờ, hàng ngày lắc nhẹ 1-2 lần.

Sau 72 giờ ủ ở tủ ấm, cho vào mỗi lọ cấy 0,1 ml dung dịch colcemid 0,004‰ lắc đều, đặt lại tủ ấm tiếp 2 giờ.

3.2. Làm tiêu bản NST

3.2.1. Nhuộm tương

- Chuyển toàn bộ hỗn dịch ở lọ cấy sau khi ủ 2 giờ với colcemid vào ống ly tâm nhọn đáy, ly tâm ở máy ly tâm ngang 5 phút x 1000 vòng/ phút.
- Sau ly tâm, hút bỏ phần dịch trong ở trên, để lại cặn tế bào (chỉ hút đến cách mặt trên cặn tế bào khoảng 3 mm).
- Cho thêm vào ống ly tâm 8 ml dung dịch nhuộm tương đã để ấm 37°C trước, 0,1ml dung dịch EDTA 40 mg/ml, trộn đều và đặt lại vào tủ ấm 37°C trong thời gian 10-12 phút.

3.2.2. Cố định

- Lần 1: Sau khi ủ với dung dịch nhuộm tương, lấy ống ly tâm ra, cho thêm vào mỗi ống 0,2ml dung dịch Carnoy II, dùng pipette Pasteur trộn đều, rồi lại ly

tâm lấy cặn như trên, sau khi hút bỏ dung dịch trong ở phía trên, cho thêm vào mỗi ống 5-7 ml dung dịch Carnoy I, trộn đều, để ở nhiệt độ phòng trong thời gian 15 phút.

- Lần 2: Sau 15 phút lại ly tâm và hút bỏ phần trên, thêm vào mỗi ống 5-7ml dung dịch Carnoy II, dùng pipette Pasteur trộn đều, để ở nhiệt độ phòng 10 phút.

3.2.3. Nhỏ tiêu bản

- Các phiến kính sạch, rửa qua với nước cất, để trên giá lam và giá lam được đặt trong ngăn đá tủ lạnh khoảng 10-15 phút, sau đó lấy ra để phẳng trên giấy thấm.

- Các ống ly tâm sau 10 phút ủ với dung dịch Carnoy II, được ly tâm 1000 vòng/phút trong 5 phút, lấy ra hút bỏ dung dịch trong trên. Dùng pipette Pasteur trộn đều cặn tế bào và lấy hỗn dịch cặn này nhỏ lên các phiến kính. Chú ý khi nhỏ tiêu bản, để đầu pipette cao hơn mặt phiến kính từ 10-20 cm.

3.2.4. Để tiêu bản khô tự nhiên và tiến hành nhuộm Giemsa hoặc các kỹ thuật nhuộm khác

Nhuộm Giemsa:

- Pha Giemsa tỷ lệ 1/10 trong đệm có pH = 6,8.
- Đánh dấu tiêu bản và đặt vào bể nhuộm 10 phút
- Rửa bằng nước máy và để khô, đọc kết quả.

3.3. Phân tích kết quả

- Soi tiêu bản sau khi được nhuộm với các kỹ thuật nhuộm Giemsa hoặc nhuộm băng dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 10 để tìm cụm NST dàn đều, chuyển sang vật kính x 100 để phân tích chi tiết.

- Đếm số lượng từng cụm NST.
- Tạm xếp công thức NST.
- Chụp ảnh, làm ảnh NST.
- Cắt NST rời từng chiếc và xếp theo danh pháp quốc tế.
- Đánh giá các bất thường nếu có: cần phân tích đủ số lượng cụm NST vì nhiều khi bệnh nhân có dạng khảm NST.

4. Các yếu tố ảnh hưởng

4.1. Cây không kết quả do tế bào không phân chia

- Tủ ấm không đảm bảo nhiệt độ
- Môi trường nuôi cấy: pH quá kiềm hay acid, nhiễm trùng, quá hạn
- PHA không đảm bảo chất lượng

4.2. Tế bào phân chia nhưng hình ảnh cụm NST xấu

- pH của môi trường không phù hợp

- Nhiệt độ ủ ấm không ổn định
- Các dung dịch sử dụng khi chuẩn bị tiêu bản không đúng quy cách.
- Tiến hành sai kỹ thuật.

LÀM TIÊU BẢN VÀ PHÂN TÍCH NHIỆM SẮC THỂ TẾ BÀO TỦY XƯƠNG

1. Nguyên lý

Bình thường ở tủy xương, các tế bào tạo máu liên tục tăng sinh và trưởng thành do vậy quá trình phân chia diễn ra một cách tự nhiên. Dựa vào tính chất này có thể làm tiêu bản NST tế bào tủy xương trực tiếp hoặc sau khi nuôi cấy trong môi trường nhân tạo để phân tích NST.

2. Dụng cụ, hoá chất

2.1. Hoá chất

- Heparin 5000 UI/ml.
- Môi trường nuôi cấy: RPMI 1640, Parker 199...
- Huyết thanh AB.
- Dung dịch colcemid 0,004⁰/₁₀₀ (4 µg/ml).
- Các dung dịch nhuộm tương và dung dịch cố định giống như chuẩn bị cho cấy máu ngoại vi.
- Dung dịch đếm bạch cầu.

2.2. Dụng cụ

- Giống như chuẩn bị dụng cụ cấy máu ngoại vi.
- Ngoài ra thêm bộ dụng cụ đếm bạch cầu.
- Chuẩn bị ống nghiệm vô trùng có nút kín, đựng khoảng 2 ml môi trường để ấm 37°C khoảng 15 phút để lấy tủy.

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Làm tiêu bản NST trực tiếp

3.1.1. Lấy tủy và ức chế phân bào

- Lấy 0,5 ml dịch tủy vào bơm tiêm vô trùng có tráng heparin 5000 UI/ml lắc nhẹ.
- Bơm ngay dịch tủy vào ống nghiệm có chứa khoảng 2 ml môi trường nuôi cấy đã để ấm trước, trộn đều, đếm số lượng tế bào tủy trong hỗn dịch bằng buồng đếm bạch cầu.

- Trong ống ly tâm nhọn đáy cho:
- + 8 ml môi trường đã để ấm 37°C .
- + 0,1 ml dung dịch colcemid $0,004\%$.
- + Lượng hỗn dịch tủy chứa $4-8 \cdot 10^6$ tế bào.
- Ủ ở tủ ấm 37°C trong thời gian 1 giờ.

3.1.2. Làm tiêu bản

Sau khi ủ 1 giờ, tiến hành các bước như làm tiêu bản NST máu ngoại vi.

3.2. Cấy tủy ngắn hạn không dùng chất kích thích phân bào

3.2.1. Lấy tủy xương và nuôi cấy

- Lấy 0,5 ml dịch tủy vào bơm tiêm đã tráng heparin 5000 UI/ ml và cho vào ống nghiệm vô trùng có chứa 2 ml môi trường nuôi cấy, trộn đều và đếm tế bào tủy trong hỗn dịch.

- Trong mỗi lọ nuôi cấy cho:
- + 6 ml môi trường nuôi cấy.
- + 1,6 ml huyết thanh AB.
- + Lượng hỗn dịch tủy chứa từ $4-6 \cdot 10^6$ tế bào. Lắc nhẹ lọ cấy và để tủ ấm 37°C trong 24 giờ.
- Sau 24 giờ, cho vào mỗi lọ 0,1 ml dung dịch colcemid $0,004\%$ ($4\text{ }\mu\text{g/ml}$) để lại tủ ấm 1 giờ.

3.3.2. Làm tiêu bản

Tuân tự các bước nhuộm tương, cố định và nhuộm tiêu bản giống như làm tiêu bản NST máu ngoại vi.

4. Phân tích kết quả

Phân tích kết quả NST tế bào tủy xương tương tự với máu ngoại vi. Song cần lưu ý là phương pháp này được sử dụng chủ yếu để nghiên cứu bệnh ác tính cơ quan tạo máu, trên cùng một tiêu bản có thể vừa có cụm NST bất thường, vừa có cụm NST bình thường nên cần phân tích chi tiết cả các cụm NST có hình ảnh không đẹp vì các bất thường NST thường thấy ở loại “cụm” này.

Sau khi chụp ảnh các cụm NST điển hình, cắt và xếp NST theo danh pháp quốc tế. Các bất thường về số lượng và cấu trúc được đánh giá:

- Thừa NST: thấy ở tối thiểu 2 cụm NST.
- Thiếu NST: thấy ở tối thiểu 3 cụm NST.
- Bất thường cấu trúc: ở tối thiểu 2 cụm NST.

5. Các yếu tố ảnh hưởng

5.1. Không có cụm phân bào

- Môi trường nuôi cấy bị hỏng.

- Chọc không đúng tuỷ.
- Tuỷ xương bị suy, không còn tế bào phân chia.

5.2. Cụm phân bào xấu

- Môi trường kém chất lượng.
- Kỹ thuật tiến hành chưa đạt.

CÁCH MÔ TẢ CÔNG THỨC NHIỄM SẮC THỂ

1. Danh pháp quốc tế về tế bào di truyền người năm 1995

Trong tế bào thân của người bình thường có 46 NST chứa toàn bộ thông tin di truyền của cá thể. Phương pháp dùng các kỹ thuật để quan sát và nghiên cứu NST gọi là phương pháp tế bào di truyền học.

Từ năm 1960 các nhà tế bào di truyền trên thế giới đã họp tại Denver để thống nhất tên gọi và cách trình bày NST bình thường cũng như các bất thường (Danh pháp NST). Kết quả sắp xếp bộ NST của tế bào gọi là công thức NST hay công thức nhân (karyotype). Nhờ sự tiến bộ của kỹ thuật, người ta có thể phân tích chi tiết hơn các bất thường NST nên đòi hỏi phải bổ sung danh pháp thường xuyên. Đã có nhiều hội nghị về danh pháp được tổ chức. Hội nghị gần đây nhất năm 1994 tại Memphis và 1 năm sau đó, Ủy ban danh pháp của Hội nghị đã công bố danh pháp quốc tế về tế bào di truyền người 1995 (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 1995) mà nội dung cơ bản dựa trên các quy tắc công bố trước, có bổ sung.

1.1. Số lượng và hình dạng NST

Trong công thức NST, các NST thường được đánh số từ 1 - 22 theo thứ tự giảm dần của chiều dài. Căn cứ vào chiều dài và vị trí tâm của NST người ta chia các NST ra 7 nhóm (A - G).

- Nhóm A (gồm NST 1 - 3) là các NST lớn tâm giữa.
- Nhóm B (gồm NST 4 - 5) là các NST lớn tâm gần giữa.
- Nhóm C (gồm NST 6 - 12) NST kích thước trung bình, tâm giữa hoặc gần giữa, NST X gần giống NST lớn trong nhóm này.
- Nhóm D (gồm các NST 13 - 15) các NST tâm cuối, kích thước trung bình có thể có vệ tinh.
- Nhóm E (gồm các NST 16 - 18): NST khá nhỏ, tâm giữa hoặc gần giữa.
- Nhóm F (gồm các NST 19-20): NST nhỏ tâm giữa.
- Nhóm G (gồm các NST 21-22): NST nhỏ, tâm cuối, có thể có vệ tinh.

1.2. Vùng, băng và dưới băng của NST

Các kỹ thuật nhuộm băng (băng G, băng R, băng Q) tạo nên hình ảnh các băng đậm nhạt xen kẽ và liên tiếp theo chiều dọc của NST. Các băng này đặc hiệu cho từng NST, dựa vào đó người ta chia NST ra nhiều vùng, mỗi vùng có các băng, mỗi băng lại chia thành dưới băng.

Ký hiệu p và q là chỉ cánh ngắn và cánh dài của NST. Số của vùng, băng, dưới băng được đánh số từ phía tâm ra, bắt đầu là số 1. Để xác định một băng nhất định người ta dùng 4 ký tự liên tục không có dấu ngăn cách: số NST, ký hiệu cánh, số của vùng, số của băng trong vùng; Ví dụ: 1p31 chỉ NST số 1, cánh ngắn, vùng 3, băng 1. Khi phân tích chi tiết thêm các dưới băng cũng được đánh số từ phía tâm ra ngoài và được thể hiện sau ký tự chỉ băng, có ngăn cách bằng dấu chấm (.). Ví dụ băng 1p31 chia thành 3 dưới băng 1p31.1, 1p31.2, 1p31.3 thì dưới băng 1p31.1 ở phía gần tâm nhất và 1p31.3 xa tâm nhất. Nếu lại chia nhỏ tiếp thì thêm ký tự nhưng không cần dấu.

2. Mô tả công thức NST

2.1. Nguyên tắc chung

Để trình bày công thức NST, đầu tiên là viết tổng số NST (gồm cả NST giới) tiếp là dấu (.) rồi đến NST giới, sau đó là các bất thường nếu có. Như vậy, công thức NST bình thường của nữ là 46, XX, của nam là 46, XY.

2.2. Mô tả các bất thường

Sau NST giới là dấu phẩy rồi đến các ký hiệu và NST bất thường. Nếu có nhiều bất thường thì bất thường của NST giới viết trước rồi đến NST thường, theo thứ tự số từ bé đến lớn. Mỗi bất thường cách một dấu phẩy. Khi bất thường cấu trúc chỉ liên quan đến 1 NST thì số NST đi ngay sau ký hiệu chỉ bất thường và để trong ngoặc đơn. Nếu có từ 2 NST tham gia bất thường thì dùng dấu chấm phẩy (;) để ngăn cách giữa các NST.

2.2.1. Bất thường số lượng

Dấu cộng (+) hay dấu trừ (-) để trước NST nói lên thêm hoặc mất NST, trừ bất thường bẩm sinh NST giới.

Ví dụ 47,XX, + 21 tức là: có 3 NST 21

Bất thường bẩm sinh NST giới viết theo nguyên tắc chung, Ví dụ: 47,XXX tức là thừa một NST X bẩm sinh. Bất thường mắc phải NST giới được mô tả như NST thường.

2.2.2. Bất thường cấu trúc

- Dấu cộng (+) hay trừ (-) để sau ký hiệu cánh NST nói lên thêm đoạn hay mất đoạn cánh đó.

- add (addition): Thêm đoạn NST nhưng không biết nguồn gốc đoạn thêm.

Ví dụ 46,XX, add (19) (p13) tức là thêm một phần vật liệu di truyền vào cánh ngắn NST 19 từ đoạn p13.

- del (deletion): Mất đoạn.
- der (derivative): NST bất thường được hình thành do tổn thương từ 2 NST hoặc hơn.
- dic (dicentric): NST hai tâm.
- dup (duplication): nhân đoạn NST: một đoạn NST nhân lên hai hay nhiều lần.
- ins (insertion): xen đoạn NST. Khi có bất thường xen đoạn liên quan đến 2 NST thì NST nhận đoạn viết trước.

Ví dụ: 46,XX, ins (5;2) (p14; q32 q22)

- inv (inversions): đảo đoạn: có thể đảo đoạn ngoài tâm (khi 2 điểm gãy ở trên một cánh NST) và đảo đoạn quanh tâm (khi hai điểm gãy ở trên hai cánh NST).
- i (isochromosome): đẳng NST: NST có hai cánh hoàn toàn giống nhau

Ví dụ: 46,XX, i(17) (q10)

Ở đây NST có hai cánh đều là cánh dài.

- mar (marker chromosome): NST đánh dấu là NST có bất thường cấu trúc mà không biết nguồn gốc.
- r (ring chromosome) NST vòng.
- t (translocation) chuyển đoạn: khi trình bày thì NST giới hoặc NST có số nhỏ viết trước. Trong trường hợp 3 hay 4 NST tham gia chuyển đoạn thì: đầu tiên là NST giới hay NST có số nhỏ, tiếp đến là NST nhận đoạn của NST đầu, rồi cuối cùng là NST cho đoạn NST đầu.

2.3. Dạng khám NST

Khi phân tích công thức NST thấy có 2 hay nhiều dòng tế bào có công thức khác nhau thì phân cách bằng dấu gạch chéo (/) và số tế bào phân tích được ở mỗi dòng để trong dấu [].

Ví dụ: 46,X X [13]/45,X [16]

Có nghĩa: đã phân tích được 29 cụm NST, trong đó 13 cụm có công thức NST nữ bình thường, 16 cụm có 45NST và chỉ có một NST giới là X.

CÁC KỸ THUẬT NHUỘM NHIỄM SẮC THỂ

1. Kỹ thuật nhuộm Giemsa thông thường

1.1. Nguyên lý

Nhiễm sắc thể (NST) là phần bắt màu rõ nhất của tế bào với thuốc nhuộm Giemsa nên sau khi nhuộm, NST có màu đồng nhất (Hình 3.1).

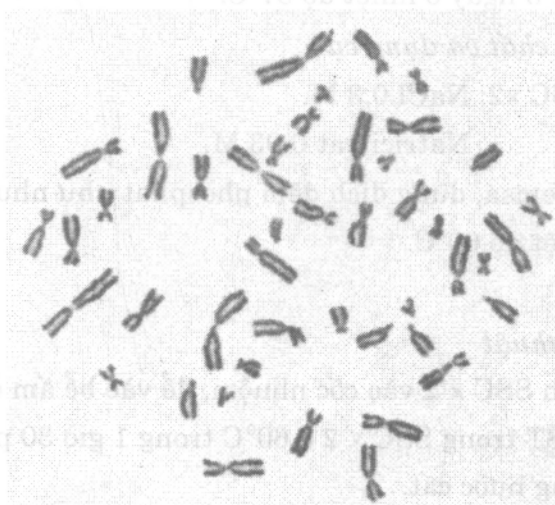
1.2. Chuẩn bị thuốc nhuộm và dung dịch đệm

- Dung dịch Giemsa mẹ: Pha thông thường và để sẵn.
- Dung dịch đệm pha sẵn:
 - + Dung dịch 1: NaHPO_4 0,07 M.
 - + Dung dịch 2: KH_2PO_4 0,07 M.
- Dung dịch đệm sử dụng: Pha trộn dung dịch 1 và dung dịch 2 với tỷ lệ 1:1 về thể tích.

1.3 Quy trình kỹ thuật

- Pha Giemsa trong đệm với tỷ lệ 3,5%, cho vào cốc nhuộm, dùng giấy thấm, thấm bọt ở bề mặt.
- Tiêu bản NST đã chuẩn bị để khô, nhúng qua nước cất 3- 5 giây.
- Để đứng tiêu bản 10 phút trong cốc nhuộm, cho đầu có chữ lên trên.
- Rửa bằng nước máy, tráng lại bằng nước cất, để khô và đọc kết quả.

Nhuộm Giemsa thông thường cho hình ảnh NST rõ, được sử dụng để đánh giá số lượng và tìm các tổn thương như đứt, gãy hoặc các tổn thương cấu trúc khác. Nhưng NST bắt màu đồng nhất nên rất khó khăn trong việc xác định cụ thể từng NST cũng như những thay đổi nhỏ như chuyển đoạn, đảo đoạn. Vì vậy người ta sử dụng kỹ thuật nhuộm băng NST.



Hình 3.1: Hình ảnh NST nhuộm Giemsa

2. Các kỹ thuật nhuộm băng NST

Hiện nay nhiều kỹ thuật nhuộm băng NST được sử dụng: băng Q, băng G, băng R, băng C, băng T. Việc nhuộm băng nào là tùy thuộc mục đích xét nghiệm và khả năng của từng phòng xét nghiệm.

2.1 Nguyên lý

Xử lý tiêu bản NST bằng men tiêu protein hoặc trong môi trường muối ở nhiệt độ cao. Do cấu trúc NST có từng đoạn ADN giàu A,T (adenin và thymidin) đặc trưng cho từng cặp NST, vì vậy phân bố các loại protein cũng đặc trưng dọc theo chiều dài của mỗi NST. Mức độ tác động của men tiêu protein và nhiệt lên các đoạn NST sẽ khác nhau, do đó sau khi xử lý và nhuộm sẽ có hình ảnh từng đoạn đậm- nhạt xen kẽ nhau dọc theo chiều dài NST. Độ dài, vị trí, số lượng các đoạn đậm nhạt vì vậy cũng đặc trưng cho từng đôi NST, qua đó có thể xác định chính xác từng NST và phát hiện được các tổn thương mà bằng kỹ thuật nhuộm thông thường không phát hiện được.

Mỗi phòng xét nghiệm tế bào di truyền có thể lựa chọn và ứng dụng cho riêng mình một kỹ thuật, các kỹ thuật có thể thay đổi ở một số bước. Chúng tôi giới thiệu ở đây các bước cơ bản của các kỹ thuật được sử dụng rộng rãi hiện nay.

2.2. Kỹ thuật nhuộm băng G

NST được xử lý với men trypsin hoặc xử lý nhiệt độ trong muối citrat, sau đó nhuộm Giemsa, các băng đậm tương ứng với những đoạn chứa nhiều A và T.

2.2.1. Băng G xử lý nhiệt: AS G (Acetic-Saline- Giemsa)

Summer và cộng sự sử dụng đầu tiên vào năm 1971, nay đã có nhiều thay đổi.

a. Chuẩn bị tiêu bản: Các tiêu bản NST sau khi chuẩn bị, để khoảng 1 tuần ở nhiệt độ phòng hoặc 3 ngày ở nhiệt độ 37°C.

b. Chuẩn bị hoá chất và dụng cụ

– Dung dịch SSC ×2: NaCl 0,3 M.

Natricitrat 0,03 M.

– Dung dịch Giemsa, dung dịch đệm phosphat như nhuộm thông thường.

– Bể ấm để nhiệt độ 60°C.

– Cốc nhuộm.

c. Tiến hành kỹ thuật

– Cho dung dịch SSC × 2 vào cốc nhuộm, để vào bể ấm ở 60°C trong 15 phút

– Ủ tiêu bản NST trong SSC × 2 ở 60°C trong 1 giờ 30 phút.

– Rửa ngay bằng nước cất.

– Nhuộm 30 phút ở dung dịch Giemsa 2% trong đệm phosphat.

– Để khô và đọc kết quả.

2.2.2. Nhuộm băng G xử lý với men trypsin

a. Hoá chất, dụng cụ cần thiết

– Trypsin: lọ trypsin Diffco 1: 250.

– Huyết thanh thai bê.

- Dung dịch đệm phosphat pH = 6,8 (như trên).
- Dung dịch đẳng trương (nước muối sinh lý).
- Nước cất khử ion.
- Cốc nhuộm.

b. Pha hoá chất

- Dung dịch trypsin (0,025%):
- + Trypsin (1: 250) Diffco 0,05g.
- + Nước muối đẳng trương 200ml.
- Dung dịch huyết thanh thai bê:
- + Huyết thanh thai bê 4ml.
- + Nước muối sinh lý 200ml.
- Dung dịch nhuộm
- + Dung dịch Giemsa mẹ 4ml.
- + Đệm phosphat 200ml.
- Nước muối sinh lý 2 cốc x 200 ml.
- Dung dịch đệm phosphat 2 cốc x 200 ml.
- Nước cất khử ion 2 cốc x 200 ml.

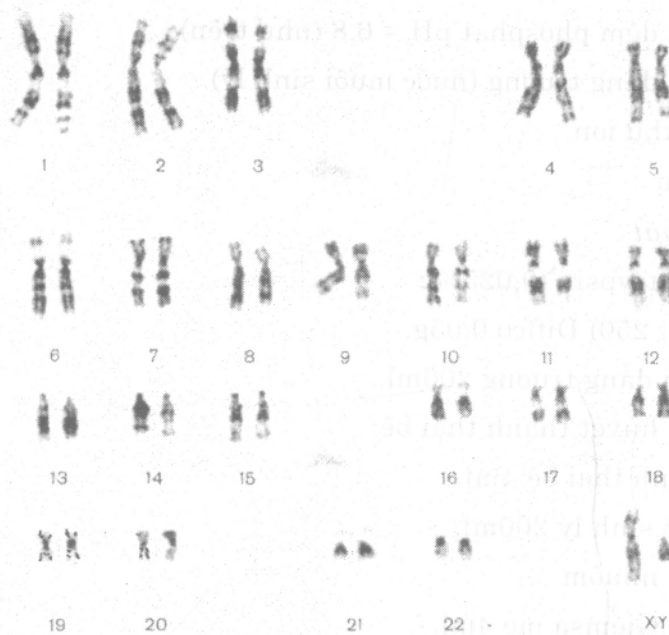
c. Quy trình kỹ thuật

- Ủ tiêu bản trong dung dịch trypsin 0,025%.
- Thời gian ủ tùy tuổi (số ngày từ khi cố định) của tiêu bản và tùy loại NST.
NST máu, tổ chức ủ khoảng 12 - 18 giây cho tiêu bản đã làm 1 tuần.
NST nước ối 12 - 16 giây.
NST tuỷ 4 - 6 giây.

Tiêu bản mới chuẩn bị thời gian ủ phải lâu hơn.

Thời gian này cần điều chỉnh theo từng phòng xét nghiệm

- Cho tiêu bản vào cốc đựng dung dịch huyết thanh thai bê hai lần, mỗi lần 5-10 giây.
- Cho tiêu bản vào cốc đựng nước muối sinh lý 2 lần, mỗi lần 5 - 10 giây
- Nhuộm 2- 3 phút trong dung dịch Giemsa. Thời gian có thể thay đổi tùy từng phòng xét nghiệm.
- Cho tiêu bản vào dung dịch đệm phosphat 2 lần, mỗi lần 5-10 giây.
- Rửa tiêu bản bằng cách nhúng vào cốc nước cất 2-3 lần.
- Để khô ở 50°C trong 15 phút và đọc kết quả, chụp ảnh, xếp công thức (Hình 3.2).



Hình 3.2: Hình ảnh NST nhuộm băng G

2.2.3 Đánh giá kết quả: Dựa vào hình ảnh mẫu của băng G để phân tích.

2.2.4 Các yếu tố ảnh hưởng: nhuộm thành công khi có các băng đậm nhạt xen kẽ nhau dọc chiều dài NST.

a. Kỹ thuật xử lý nhiệt

- Tiêu bản mới làm hoặc để quá lâu thường kết quả khó đẹp, tiêu bản được làm từ 1 tuần - 2 tháng thường cho kết quả tốt.
- Nhiệt độ bể ếm quá cao hoặc quá thấp.
- Thời gian ủ tiêu bản trong dung dịch SSC $\times 2$ quá lâu hay quá ngắn đều cho kết quả kém.

b. Kỹ thuật dùng men trypsin

- Tiêu bản mới làm thường khó đẹp.
- Nồng độ của men khi pha cao hoặc thấp quá.
- Thời gian ủ men ngắn hay dài quá đều có thể làm hỏng kết quả.

2.3. Kỹ thuật nhuộm băng R

Kỹ thuật nhuộm tạo nên các băng đậm nhạt ngược lại với băng G tức là vùng đậm ở băng G sẽ nhạt ở băng R và ngược lại nên gọi là băng ngược (Reverse band).

Có nhiều phương pháp nhuộm băng R, phương pháp đầu tiên là dùng môi trường muối xử lý tiêu bản NST ở nhiệt độ cao sau đó nhuộm Giemsa (R bands by heat using Giemsa = RHG). Ngoài ra các phương pháp khác có thể dùng acridin hoặc chất nhuộm màu fluor như chromomycin hay dùng chất thay thế thymidin (BrdU).

Chúng tôi trình bày ở đây phương pháp nhuộm nóng bằng R (RHG) do Dutrillaux và Lejeune mô tả 1971, có chỉnh lý.

2.3.1. Dụng cụ và hóa chất

- Bể ấm có thể để nhiệt độ 87°C.
- Cốc nhuộm và các cốc đựng nước cất.
- Đệm phosphat (như phần trên).
- Dung dịch nhuộm: Giemsa 3,5% trong đệm phosphat.
- Dung dịch Earle.
- + NaCl 6800 mg
- + KCl 400 mg
- + $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 140 mg
- + $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200 mg
- + Glucose 1000 mg
- + CaCl_2 100 mg
- + Nước cất vừa đủ 1000 ml.

Dung dịch Earle này có thể pha đặc 10 lần (dung dịch mẹ) và giữ ở 4°C, khi sử dụng pha loãng với nước cất. Chuẩn bị 2 cốc dung dịch Earle sử dụng, mỗi cốc khoảng 100ml.

- + Cốc 1: dùng Na_2HPO_4 điều chỉnh cho pH $\approx$ 5,3.
- + Cốc 2: dùng Na_2HPO_4 điều chỉnh cho pH $\approx$ 6,5.

2.3.2. Quy trình kỹ thuật

- Tiêu bản NST đã chuẩn bị để 2 - 3 ngày ở nhiệt độ phòng hoặc qua một đêm ở 37°C.

- Nhúng tiêu bản vào nước cất 1 - 2 phút.
- Đặt tiêu bản trong dung dịch Earle có pH = 5,3 ở 87°C
(Để cốc đựng Earle vào bể ấm 87°C trước 15 phút).

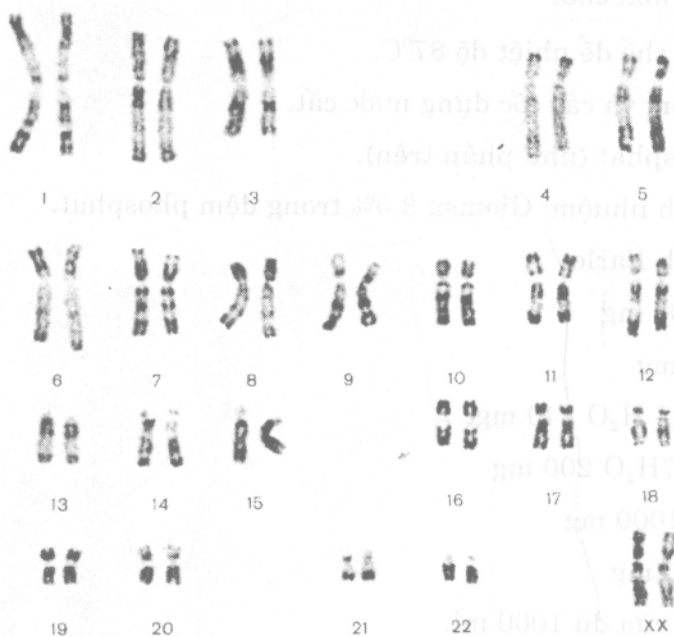
Thời gian khoảng 45 phút.

- Chuyển tiêu bản sang cốc đựng Earle có pH = 6,5 cũng ở 87°C trong thời gian 45 phút. (Thời gian ủ tiêu bản ở Earle có pH = 5,3 và 6,5 là bằng nhau và tùy thuộc tuổi của tiêu bản, nếu tiêu bản đã chuẩn bị trên 1 tuần thì thời gian này ngắn hơn).

- Chuyển tiêu bản vào cốc đựng nước cất ở nhiệt độ phòng và tráng rửa tiêu bản 3- 4 lần.

- Nhuộm trong dung dịch Giemsa trong 8 phút.

– Rửa tiêu bản bằng nước máy và tráng lại bằng nước cất, để khô và đọc kết quả, chọn các cụm kỳ giữa NST rõ chụp ảnh, xếp công thức NST và phân tích kết quả (Hình 3.3).



Hình 3.3: Hình ảnh NST nhuộm bằng R

2.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng

- Tiêu bản NST không đẹp, NST bị nát.
- Nhiệt độ bể ấm quá cao hoặc không đủ.
- pH của dung dịch Earle không đúng.
- Thời gian ủ ở Earle nhất là dung dịch Earle pH= 5,3 không phù hợp.
- Rửa tiêu bản trước khi nhuộm không kỹ.

2.4. Kỹ thuật nhuộm băng C

Khác với các kỹ thuật nhuộm băng khác, nhuộm băng C là kỹ thuật nhuộm các vùng dị nhiễm sắc, các vùng này thường nằm ở phần tâm của NST và cánh dài của NST Y. Người ta xử lý tiêu bản trong dung dịch kiềm: NaOH hay Ba(OH)₂ sau đó xử lý tiếp trong môi trường muối ở nhiệt độ cao và nhuộm với Giemsa. Chỉ có vùng dị nhiễm sắc bắt màu đậm còn lại màu nhạt. Chúng tôi giới thiệu kỹ thuật do Summer đưa ra 1972, có chỉnh lý.

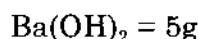
2.4.1. Hoá chất và dụng cụ

a. Dụng cụ

- Các loại cốc nhuộm.
- Bể ấm, có thể để nhiệt độ 65°C.

b. Hoá chất

- Dung dịch bari hydroxid 5%



Nước cất đủ 100ml

Hoà tan Ba(OH)_2 bằng máy khuấy từ, lọc, nên pha dung dịch này trước khi dùng (trong ngày).

- Dung dịch SSC $\times 2$
- + NaCl 17,5 g
- + Natricitrat ngậm 2 phân tử nước
($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) 8,8 g
- + Nước cất đủ 100ml.
- Dung dịch HCl 0,2N.
- Dung dịch nhuộm Giemsa 2%.
- + Đệm phosphat pH = 6,8 = 98 ml
- + Giemsa 2 ml
- Cồn tuyệt đối, cồn 80 độ, cồn 70 độ.

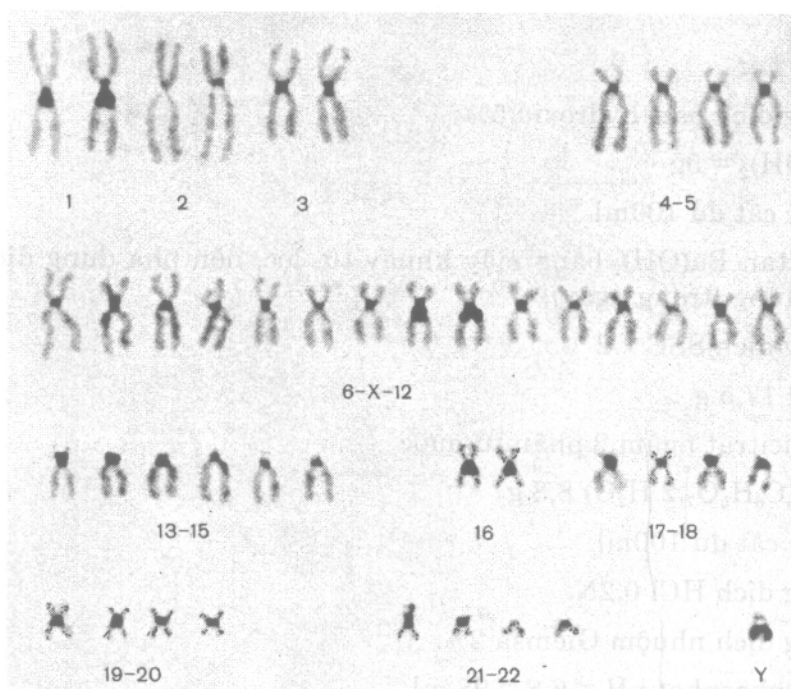
2.4.2. Quy trình kỹ thuật

- Ngâm tiêu bản 1 giờ trong dung dịch HCl 0,2 N.
- Rửa bằng nước khử ion và để khô.
- Ủ tiêu bản 45-60 phút trong Ba(OH)_2 5% ở nhiệt độ phòng.
- Rửa tiêu bản bằng cách nhúng vào nhiều cốc đựng nước khử ion; sau đó chuyển tiêu bản vào các cốc đựng cồn lần lượt 70 độ, 80 độ, tuyệt đối, thời gian nhúng tiêu bản ở mỗi cốc khoảng 15 - 20 giây. Để khô tiêu bản.
- Ủ tiêu bản 1 giờ 30 phút trong dung dịch $2 \times \text{SSC}$ ở 65°C.
- Rửa tiêu bản bằng nước khử ion và để khô.
- Nhuộm tiêu bản với thuốc nhuộm 2% (để phẳng tiêu bản và phủ thuốc nhuộm lên tiêu bản) trong thời gian 20- 25 phút. Rửa tiêu bản bằng nước khử ion, tráng bằng nước cất, để khô và đọc kết quả.

2.4.3. Các yếu tố ảnh hưởng

- Thời gian ngâm tiêu bản trong HCl 0,2N và Ba(OH)_2 quá ngắn hoặc quá lâu.
- Thời gian ủ tiêu bản trong dung dịch $2 \times \text{SSC}$ ở 65°C không đảm bảo.
- Nhuộm Giemsa đậm quá (sẽ làm mất băng).

2.4.4. Đánh giá kết quả: Nhuộm băng C sẽ cho hình ảnh đậm ở phần tâm của NST nhất là các NST 1, 9, 16 và cánh dài NST Y, các phần còn lại NST nhạt màu (hình 3.4).



Hình 3.4: Hình ảnh NST nhuộm bằng C

2.5. Kỹ thuật nhuộm bằng Q

Băng Q là băng được sử dụng sớm nhất, nhưng do phải dùng quinacrin, kính hiển vi huỳnh quang và cần đọc sớm sau khi nhuộm nên không được dùng hàng ngày. Tuy vậy cũng cần thiết để làm căn cứ đối chiếu hoặc cho các nghiên cứu về phân dị nhiễm sắc của NST.

2.5.1. Hoá chất

a. Đệm McIlvaine (pH = 5,4)

- Acid citric ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 2,1g
- Natri hydro phosphat (Na_2HPO_4) 3,9g
- Nước cất 500 ml.

b. Dung dịch nhuộm quinacrin

- Atabrin 1 viên hoặc 100 mg
- Đệm McIlvaine (pH = 5,4) 200 ml

Hoà tan và lọc, để ở 2- 5°C.

2.5.2. Quy trình kỹ thuật

- Nhuộm các tiêu bản 10- 15 phút trong dung dịch nhuộm quinacrin, trong buồng tối hoặc bọc giấy đen cố định nhuộm.

- Rửa dưới nước máy, loại hết quinacrin thừa.
- Đặt tiêu bản 1 phút trong đệm Mellvaine.
- Phủ đệm Mellvaine lên tiêu bản và thấm bột đệm thừa.
- Soi dưới kính hiển vi huỳnh quang, dùng bước sóng từ 450- 500 nm.

2.5.3. Đánh giá kết quả

Các NST sẽ thể hiện các đoạn sáng, tối dưới kính hiển vi huỳnh quang, vùng sáng tương ứng với phần NST chứa ADN giàu A và T. Chọn các cụm NST rõ, chụp ảnh để phân tích kết quả dựa trên phân bố băng chuẩn.

Các vùng đậm trên NST khi nhuộm băng G, vùng nhạt khi nhuộm băng R tương ứng với vùng sáng của băng Q.

Lưu ý kỹ thuật nhuộm băng Q với quinacrin phải đọc và chụp ảnh ngay sau khi nhuộm, để lâu sẽ không còn rõ các vùng băng.

NHUỘM PHÂN BIỆT NHIỄM SẮC TỬ CHỊ EM

1. Nguyên lý

Tế bào phân chia được là nhờ sự nhân đôi NST, do đó cần đến base nitơ. Người ta dùng chất tương tự thymidin (Bromodesoxy uridine = BrdU) để thay thế base nitơ này trong hai chu kỳ phân bào liên tiếp, sẽ tạo ra được một NST con (nhiễm sắc tử) có cả hai mạch ADN đều chứa BrdU. Khi nhuộm với fluorochrom hay Giemsa, nhiễm sắc tử này có màu khác nhiễm sắc tử còn lại. Qua đó có thể quan sát được các hình ảnh trao đổi giữa hai nhiễm sắc tử - trao đổi nhiễm sắc tử chị em (Sister chromatid exchanges: SCEs.)

Như vậy kỹ thuật này được tiến hành qua hai bước:

- Bước 1: Gắn BrdU vào ADN ở hai chu kỳ phân bào liên tiếp.
- Bước 2: Nhuộm phân biệt hai nhiễm sắc tử.

2. Quy trình kỹ thuật

2.1. Gắn BrdU vào nhiễm sắc thể

2.1.1. Hoá chất và dụng cụ cần thiết

Ngoài các dụng cụ, phương tiện hoá chất cần cho cấy máu ngoại vi, cần thêm dung dịch BrdU.

BrdU: 10 mg

Nước cất: 10 ml.

2.1.2. Các bước tiến hành

- Cấy lymphocyt bình thường, ủ ở 37°C trong 42 giờ.
- Sau 42 giờ thêm vào mỗi lọ cấy dung dịch BrdU để nồng độ cuối cùng là 10 µg/ml, ủ tiếp 30 giờ ở 37°C.
- Sau 30 giờ, ức chế bằng colcemid và làm tiêu bản bình thường.

2.2. Nhuộm phân biệt hai nhiễm sắc tử

2.2.1. Hoá chất và dụng cụ

- Dung dịch Hoechst 33258
Hoechst 33258: 1,5 mg
Nước cất 10 ml
Dung dịch này giữ trong tối, để đông lạnh, có thể dùng vài tháng.
- Dung dịch 2 × SCC
NaCl: 17,5 g.
Natri citrat ngậm 2 phân tử nước
($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 8,8 g.
Nước cất vừa đủ 1000 ml
Điều chỉnh pH 7,0 bằng NaOH 1N hay HCl 1N.
- Đệm Sorensen (pH 7.0):
 KH_2PO_4 : 5,26 g
 Na_3HPO_4 : 8,65 g
Nước cất: 1000 ml.
- Dung dịch nhuộm Giemsa 2%:
Đệm Sorensen: 49 ml
Giemsa: 1 ml.
- Bể ấm, các cốc nhuộm, cốc thuỷ tinh.
- Đèn cực tím: 1 bóng đèn cực tím.
- Kính hiển vi chụp ảnh.

2.2.2. Các bước tiến hành

- Nhỏ dung dịch Hoechst 33258 lên tiêu bản, đậy tiêu bản bằng đĩa thuỷ tinh (đĩa petri) trong 10-15 phút ở nhiệt độ phòng.
- Rửa tiêu bản bằng nước cất 3 lần, để khô.
- Phủ lên tiêu bản một lớp dung dịch 2 × SCC (pH 7.0) và đặt dưới đèn cực tím trong 1- 2 giờ. (Khoảng cách từ đèn đến tiêu bản khoảng 20 cm).
- Rửa lại tiêu bản bằng nước cất, để khô và nhuộm Giemsa 2% trong 15- 20 phút.
- Đọc kết quả dưới kính hiển vi quang học, chụp ảnh các cụm NST và phân tích.

3. Phân tích kết quả

Sau khi nhuộm phân biệt, nhiễm sắc tử có cả hai sợi ADN mới được tổng hợp sẽ bắt màu khác nhiễm sắc tử còn lại. Trong quá trình phân chia có thể có những trao đổi giữa các đoạn của hai nhiễm sắc tử chị em- dựa vào đó người ta có thể đánh giá các mức độ thay đổi. Kỹ thuật này được dùng để đánh giá tác nhân gây đột biến NST.

4. Những yếu tố ảnh hưởng

- Dung dịch pha không đảm bảo.
- Thời gian xử lý dưới đèn cực tím hay trong dung dịch quá lâu hoặc chưa đủ.

XÉT NGHIỆM VẬT THỂ BARR

Trong thực tế nhiều khi cần xác định giới nhanh, người ta có thể sử dụng kỹ thuật xét nghiệm vật thể giới. Tuy nhiên đây cũng chỉ là xét nghiệm sơ bộ, muốn chắc chắn cần phải phân tích NST.

1. Nguyên lý

Tế bào ở giai đoạn gian kỳ, chỉ có một NST X hoạt động, khi nhuộm Orcein hay carbofuchsin, chất nhuộm sắc ở NST X còn lại bắt màu đậm tạo nên vật thể Barr, bám vào màng nhân. Có thể chọn một trong hai kỹ thuật sau.

2. Quy trình kỹ thuật

2.1. Kỹ thuật nhuộm với orcein

2.1.1. Dụng cụ và hoá chất

- Phiến kính sạch, đèn lưới, bể ươm có lắc.
- Dung dịch Aceto- orcein 2%:
 - + Cho 40g orcein tổng hợp vào 200 ml acid acetic, lắc đều trong bể ươm có máy lắc.
 - + Thêm nước cất đủ 2 lít, lọc 3 lần bằng giấy lọc Whatman số 1, để chỗ tối hay bọc giấy đen.

2.1.2. Tiến hành

- Phết tiêu bản: Dùng đèn lưới lấy tế bào niêm mạc má, phết lên phiến kính, thường mỗi bên lấy một tiêu bản. Để khô tiêu bản ở nhiệt độ phòng.
- Nhỏ 3- 4 giọt dung dịch Aceto- orcein 2% lên tiêu bản, đậy bằng đĩa petri trong khoảng 15 phút.

– Đổ dung dịch orcein thừa, thấm khô, đọc kết quả ngay dưới kính hiển vi, đọc tối thiểu 100 tế bào và tính tỷ lệ phần trăm các tế bào có vật thể Barr.

2.2. Kỹ thuật nhuộm carbofuchsin

2.2.1. Hoá chất và dụng cụ

- Chuẩn bị dung dịch carbofuchsin III:
 - + Dung dịch I: Fuchsin basic 3 g
Cồn 70° : 100 ml
 - + Dung dịch II: Dung dịch I: 100 ml
Phenol 5%: 900 ml
 - + Dung dịch III: Dung dịch II: 120 ml
Acid acetic: 120 ml
Formaldehyd 34%: 120 ml
- Cồn 96°- 98°.
- Dung dịch HCl nồng độ 5 N.
- Cồn methanol.

2.2.2. Tiến hành

- Phết tiêu bản: Dùng đè lưới lấy tế bào niêm mạc má phết lên phiến kính, để khô.
 - Cố định ngay sau khi tiêu bản khô vào cồn 98° trong 30 phút sau đó để khô ở nhiệt độ phòng.
 - Nhúng tiêu bản vào dung dịch HCl 5N trong 5 - 6 phút.
 - Tráng tiêu bản bằng nước máy, để khô.
 - Nhuộm tiêu bản với carbofuchsin III trong 20 phút.
 - Rửa bỏ fuchsin thừa bằng methanol, để khô.
- Sau đó soi dưới kính hiển vi, tìm vật thể Barr trên 100 tế bào.

3. Đánh giá kết quả

Vật thể Barr bắt màu sẫm, hình thoi, tam giác hoặc bầu dục nằm bám vào màng nhân tế bào. Theo lý thuyết số lượng vật thể Barr trong tế bào bằng số lượng NST X trừ 1. Như vậy ở nam giới bình thường không có vật thể Barr, ở nữ bình thường có một vật thể Barr, người có 3 NST X (XXX) sẽ có 2 vật thể Barr.

Trong thực tế khi xét nghiệm tế bào niêm mạc má của nữ có khoảng 10 - 80% tế bào có vật thể Barr tùy theo giai đoạn phát triển và chu kỳ kinh nguyệt. Ở nam bình thường cũng có thể có vật thể Barr (nhưng dưới 5%).

4. Các sai số hay gặp

- Miệng bệnh nhân quá bẩn, lẫn nhiều vi khuẩn và vết bẩn khó đọc kết quả.

- Nhuộm quá lâu, dung dịch nhuộm quá đặc không phân biệt được vật thể Barr và phần chất nhân còn lại.
- Đọc ít tế bào chưa phát hiện được.

KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ ỨNG DỤNG TRONG Y HỌC

Cơ sở di truyền của cơ thể nằm trong các gen trên NST mà bản chất của nó là acid desoxy ribonucleic (ADN). Cấu trúc ADN là chuỗi xoắn kép các nucleotid mà mỗi mắt xích là một base nitơ (Adenin - A, Thymidin - T, Guanin - G, Cytosin - C). Hai sợi của chuỗi xoắn kép liên kết với nhau một cách không phải ngẫu nhiên mà có tính đặc trưng theo từng cặp base nitơ giữa sợi này với sợi kia theo cách A đi với T, G đi với C...

Khi phân chia tế bào, có quá trình nhân đôi ADN, lúc này các sợi tách nhau ra và mỗi sợi sẽ làm khuôn để tổng hợp nên một sợi bổ sung theo nguyên tắc cặp đôi (cơ chế nửa bảo tồn) tạo nên hai chuỗi ADN hoàn toàn giống nhau và giống chuỗi ban đầu.

Người khỏe mạnh có bộ gen bình thường, tức là trình tự các base nitơ trong các gen (đoạn ADN) bình thường. Cho đến nay người ta thấy toàn bộ các gen đã biết chức năng chỉ chiếm 10% lượng ADN của tế bào, còn lại 90% là những đoạn ADN có trình tự nucleotid lặp lại mà nay người ta chưa biết chức năng. Trừ hai anh chị em sinh đôi cùng trứng, thật khó tìm được hai cá thể có bộ gen giống nhau, cho nên xác định gen nói lên được tính chất đặc trưng của cá thể và nguồn gốc bố mẹ (một nửa bộ gen có nguồn gốc từ bố và một nửa từ mẹ).

Trình tự các base nitơ của gen bị thay đổi có thể gây nên bệnh di truyền. Người ta có thể dùng kỹ thuật sinh học phân tử để xác định những thay đổi đó và xác định nguyên nhân gây bệnh. Ngoài ra, cũng có thể sử dụng kỹ thuật này để xác định sớm sự có mặt của các virus, vi khuẩn gây bệnh.

KỸ THUẬT TÁCH CHIẾT ADN

Tùy theo mục đích của xét nghiệm và điều kiện thực tế, có thể tách ADN từ các nguồn khác nhau: bạch cầu máu ngoại vi, từ tổ chức, từ chân tóc, từ bệnh phẩm nghi có tác nhân gây bệnh (chất tiết, huyết thanh...). Ở đây chúng tôi giới thiệu kỹ thuật chiết tách ADN từ bạch cầu máu ngoại vi. Do dễ lấy mẫu nên kỹ thuật này thuận lợi cho các xét nghiệm tìm gen hay tìm đặc trưng cá thể.

1. Nguyên lý

ADN ở trong nhân tế bào cùng với các protein, ARN... nên quá trình tách và thu hoạch ADN dựa trên các bước: phá màng tế bào và màng nhân, loại bỏ ARN và protein, tập trung ADN.

2. Hóa chất và dụng cụ cần thiết

2.1. Dụng cụ

- Máy ly tâm thường và máy ly tâm lạnh có rotor dùng ly tâm ống Eppendorf.
- Máy lắc ống nghiệm.
- Máy điện di.
- Tủ ấm, bể ấm.
- Đèn Ultraviolet (UV)
- Máy chụp ảnh (UV)
- Pipette man (Micro pipette), ống Eppendorf.
- Các thiết bị lạnh -30°C , tủ lạnh -80°C .

2.2. Hoá chất

- Đệm PBS: pha sẵn để 4°C
- Đệm Tris1M: pha sẵn để 4°C
- EDTA 0, 5M: pha sẵn để 4°C
- NaCl 5M: pha sẵn để 4°C
- SDS 10%
- Cồn tuyệt đối và cồn 70°
- Đệm T.E
- Natri acetat 3M
- ARNase 10 mg/ml để -30°C
- Proteinase 10 mg/ml để -30°C
- Phenol bão hòa
- Chlorofoor
- Isoamyl alcohol
- Bromo phenol blue
- Dung dịch Ethidium bromic 1%; 5°_{∞}
- Đệm TBE $\times 10$
- + Tris base 108g
- + Acid boric 55g
- + EDTA pH = 8 0,5M
- + Nước cất đủ 1 lít

Dung dịch này sau pha để sẵn và khi dùng pha loãng 10 lần.

3. Quy trình kỹ thuật

1. Lấy 0,5 ml máu tĩnh mạch chống đông bằng heparin (tráng heparin vào bơm tiêm trước khi lấy), cho vào ống ly tâm Eppendorf vô trùng.

2. Rửa protein huyết tương

– Trộn PBS và máu tỉ lệ 1: 1 lắc đều, li tâm 15 phút, 6000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng.

– Rút bỏ phần trong trên (để lại khoảng 500 μ l)

3. Tẩy phá màng

Bổ sung Buffer cho đủ 1 ml (bổ sung 500 μ l)

– Tris 1M: 10 μ l

– EDTA 0,5M: 20 μ l

– NaCl 5M: 20 μ l

– SDS 10%: 200 μ l

– Nước cất khử ion đủ: 500 μ l

(Các thành phần có thể cho riêng vào ống chứa cặn tế bào cũng có thể pha sẵn rồi trộn vào).

4. Loại bỏ ARN

Cho 5 μ l ARNase 10mg/ml vào hỗn dịch trên, lắc đều, ủ ấm 37 °C trong 1 giờ.

5. Loại protein:

– Sau 1 giờ ủ với ARNase, lấy ra.

– Bổ sung 24 μ l proteinase 10mg/ml, lắc đều.

– Ủ 3 giờ ở 56 °C

(Để thuận lợi nên cắm ống nghiệm Eppendorf vào tấm bọt xốp mỏng thả trong nước ấm 56 °C).

– Sau ủ 3 giờ, lấy ra và để nguội: gọi là ống 1

* Cho phenol bão hoà vào ống 1 với tỷ lệ 1:1

+ Lắc bằng máy.

+ Li tâm 10000vòng/ phút trong 15 phút ở 24°C (Nhiệt độ phòng)

+ Hút lấy phần trên cho sang ống Eppendorf 2 (Chú ý hút từ trên mặt xuống bỏ lại màng trắng giữa và phần đen ở dưới).

* Cho tiếp phenol bão hoà vào ống 2 với tỷ lệ 1:1, lắc trộn, li tâm, hút phần trên cho vào ống Eppendorf 3.

* Cho vào ống 3 hỗn hợp phenol/chlorofoor 50/50 với tỷ lệ 1:1 (1 thể tích phenol, 1 chlorofoor, 2 hỗn dịch).

- + Trộn, lắc, li tâm 10 000 vòng/ phút trong 15 phút ở 24°C (Có thể dùng chlorofoor đã có sẵn 1/25 isoamyl alcohol).
- + Hút phần trên cho vào ống 4.
- * Cho vào ống 4 hỗn hợp như ống 3, lắc, li tâm, hút cho sang ống Eppendorf 5
- * Cho vào ống 5: 24 thể tích chlorofoor + 1 thể tích isoamyl alcohol + 25 thể tích chất tách, lắc, trộn, li tâm với tốc độ 14 000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Hút lấy phần trên cho vào ống 6 (Hút sẽ được khoảng 700µl).

6. Tủa ADN

- Cho thêm vào ống 6 đã có sẵn 700µl dịch tách:
- + Natri acetat 3M: 100µl
- + Cồn tuyệt đối: 1 ml
- Trộn đều bằng cách lắc ống nghiệm và xem tủa (ADN tủa thành “sợi” trắng lơ lửng).
- Ly tâm 15 phút, 14000 vòng/phút ở 4°C.
- Lấy ống ra đổ bỏ phần trên (cẩn thận để không đổ mất ADN - nên đổ vào một ống nghiệm khác và cất đi).
- Thêm vào ống 1,5ml cồn 70° và lắc nhẹ. Như vậy đã được ADN tinh sạch, ADN này có thể giữ ở - 20 °C, - 80 °C hoặc tiến hành các xét nghiệm khác.

7. Điện di ADN

Sau khi chiết tách ADN cần điện di để kiểm tra có thu hoạch được ADN hay không.

- *Chuẩn bị ADN*
 - Ly tâm ống 6 (ở trên) 14 000 vòng/ phút trong 15 phút ở 4°C
 - Đổ bỏ phần cồn 70°.
 - Sấy khô ADN trong buồng hút vô trùng (Hote vô trùng) thời gian 1 giờ.
 - Sau 1 giờ cho 50µl TE vào cạn khô và lắc.
 - Lấy 7µl hỗn dịch ADN trong TE trộn với 3µl bromophenol blue làm chất liệu chạy điện di.
- *Chuẩn bị gel (thạch Agarose 1% trong TBE)*
 - Pha agarose 0,8% vào cốc thủy tinh rồi đun sôi với bếp thường, hoặc pha 1% rồi đun bằng lò vi sóng; để nguội tự nhiên đến khoảng 50 - 60 °C.
 - Dùng lược tạo giếng cài vào giá gel (giá thạch).
 - Đổ từ từ thạch agarose lên giá đã cài lược (ước lượng để “giếng” có độ sâu khoảng 2 mm).
- *Tiến hành điện di:*
 - Cho dung dịch ADN đã trộn với thuốc nhuộm màu bromophenol blue vào mỗi giếng thạch 10 µl .

- Đặt thạch (gel) vào buồng điện di.
- Đổ TBE ngập gel, đến vạch quy định.
- Chạy điện di với dòng điện 50mA, 80V trong thời gian 30 phút

- **Nhuộm ADN**

- Sau điện di đặt gel thạch vào đĩa vuông
- Đổ dung dịch Ethidium bromic 5⁰/₁₀₀ trong TBE vào đĩa
- Lắc nhẹ khoảng 5 phút, lấy gel thạch ra
- Soi: đặt lên giá soi tử ngoại và chụp ảnh.

Có thể nhuộm bằng cách pha sẵn thuốc nhuộm 5⁰/₁₀₀ vào khi agarose đang ở 60 °C, trộn đều và đổ gel. Sau khi chạy điện di có thể soi ngay và chụp ảnh.

4. Đánh giá kết quả

ADN trên điện di sẽ thể hiện vạch phát sáng và màu trắng trên ảnh chụp.

5. Lưu ý

Vì mẫu xét nghiệm ít, kỹ thuật tiến hành qua nhiều bước nên yêu cầu thao tác hết sức cẩn thận, tránh nhiễm trùng và tránh hút hoặc đổ mất ADN.

KỸ THUẬT THẨM ADN VÀ LAI VỚI MẪU “DÒ”

Kỹ thuật thẩm ADN và lai là kỹ thuật sử dụng mẫu dò “probe” được đánh dấu để phát hiện vị trí đoạn ADN tương ứng trên điện di sau khi ADN được cắt bằng enzym hạn chế, qua đó xác định được sự có mặt các đột biến trong ADN. Hiện nay các kỹ thuật có thể có khác nhau ở các chi tiết song đều dựa trên nguyên tắc do Edward M. Southern đưa ra năm 1975.

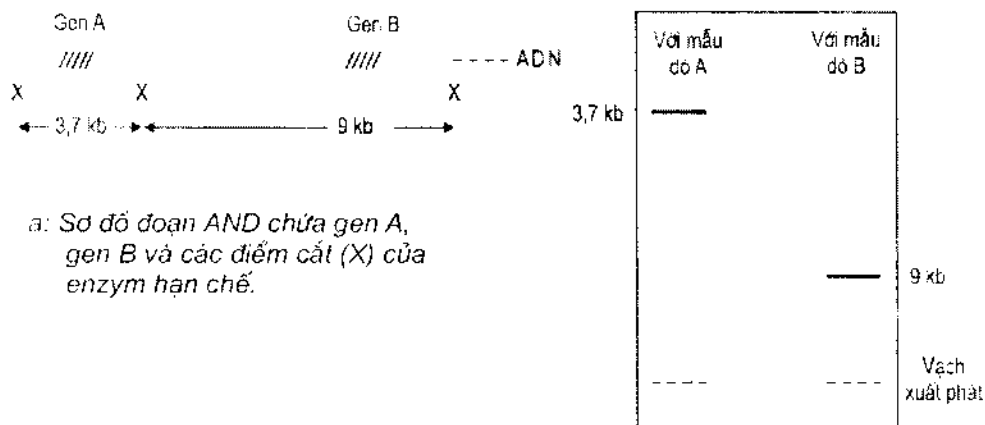
1. Nguyên lý

- Dựa vào đặc điểm của các enzym hạn chế là cắt ADN ở các vị trí lựa chọn đặc hiệu, do đó một enzym sẽ cắt ADN bộ gen người ra nhiều đoạn có độ dài khác nhau từ vài đôi base đến đoạn có hàng trăm kilo base (kb). Những đoạn này sau khi điện di trên gel agarose sẽ ở những vị trí nhất định theo độ dài của chúng.

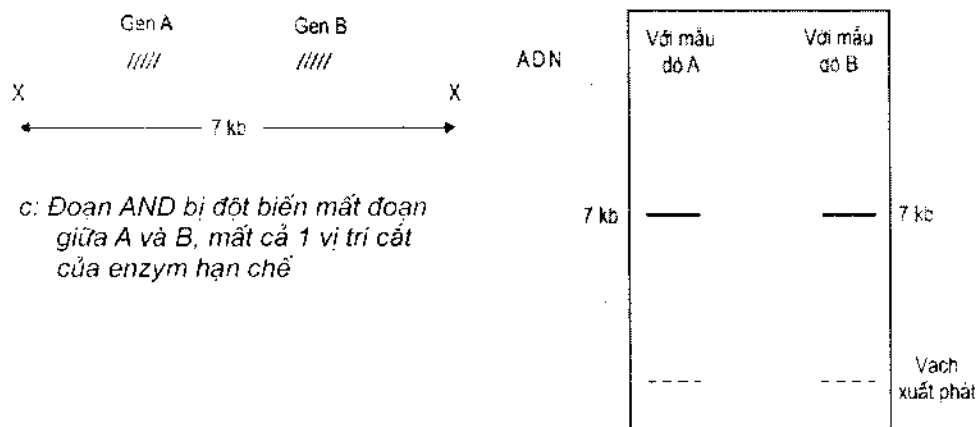
- Một đặc điểm nữa là ADN sẽ bị biến tính (hai sợi tách nhau ra) dưới tác dụng của dung dịch kiềm (NaOH) sau đó chuyển lên màng rắn với các vị trí tương ứng.

- Dựa trên nguyên tắc bổ sung của hai sợi ADN sau khi biến tính và trung hòa trở lại, người ta dùng các đoạn ADN dò (probe) có trình tự ADN biết trước để cho kết hợp “bổ sung” với ADN trên màng, qua đó phân tích và tìm ra đột biến. Hình 3.5 trình bày một đột biến do tái tổ hợp làm mất đoạn ADN giữa đoạn gen A và đoạn gen B:

- Bình thường enzym hạn chế cắt ở vị trí X tạo ra hai đoạn ADN:
- + Đoạn 3,7 kb có chứa phần gen A
- + Đoạn 9,0 kb có chứa phần gen B
- Khi đột biến (do tái tổ hợp hay chuyển đoạn, mất đoạn) enzym này cắt và tạo nên đoạn 7 kb chứa cả A và B (Hình 3.5c).
- Sau khi điện di, các đoạn 3,7 kb, 9kb, 7kb ở các vị trí khác nhau. Dùng mẫu dò (probe) A, hoặc probe B sẽ xác định được .



b: Sau điện di và lai



*d: Sau điện di và lai
với mẫu dò A, mẫu dò B*

Hình 3.5: Dùng mẫu dò (probe) phát hiện đột biến mất đoạn ADN

a, b : ở người bình thường; c, d : ở người mất đoạn gen

2. Hoá chất, dụng cụ

2.1. ADN: Do tách chiết ADN

2.2. Hoá chất

– Enzym (men) hạn chế: EC_{O} RI; Hind III; Pst I... Đa số là các enzym hexacutter (nhận biết đoạn 6 base nitơ), mỗi enzym có một đệm pha thích hợp, thường hoạt động ở 37°C.

- HCl 0,5M
- Agarose 1 % trong đệm TBE
- NaOH 0,5 M; NaOH 0,25 M
- NaCl 1,5 M; NaCl 0,5 M
- Dung dịch SSC x 20; Dung dịch SSC x 2
- Đệm TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,6)
- Màng lai (màng nitrocellulose hay màng nilon)
- Dịch lai và các sinh phẩm kèm theo
- Mẫu dò
- Dịch đánh dấu
- Glutaraldehyd
- Các chất hiện phim
- Nước cất

2.3. Dụng cụ

- Hộp lai thường là loại ECL
- Màng lai
- Giấy sắc ký, giấy whatman
- Giấy thấm
- Tủ ấm
- Tủ làm đá
- Bể ấm
- Dụng cụ điện di

3. Các bước tiến hành

3.1. Cắt ADN bằng enzym giới hạn

- Trong ống nghiệm Eppendorf cho:
 - + 10 µg ADN trong đệm TE
 - + 10 - 20 đơn vị enzym hạn chế (có thể cho 50 đơn vị) trong đệm tương ứng
 - + Nước cất đủ 50 µl

- Ủ qua đêm ở 37°C
- Lấy ra một phần cho chạy điện di trên gel agarose 1 %
- Nhuộm và chụp ảnh kiểm tra xem ADN đã được cắt phù hợp chưa

3.2. Thấm (Southern Blot)

3.2.1. Điện di

- Đổ gel agarose 1 % tạo giếng như đã nói ở trên
- Chạy điện di ADN đã cắt với dòng điện 1V / 1cm chiều dài gel, thời gian 10 - 12 giờ (qua đêm).

3.2.2. Xử lý gel (làm biến tính gel)

- Trong hộp thuỷ tinh cho 300 ml HCl 0,5 M
- Đặt gel vào và lắc khoảng 15 phút (chú ý quan sát khi màu của dung dịch trong hộp chuyển sang màu nâu là được).

Mục đích của bước này là làm mất purin (depurination) để cắt đứt những đoạn ADN quá dài thành nhiều mảnh (nhưng vẫn nằm yên một chỗ) tạo điều kiện dễ thấm.

3.2.3. Làm biến tính ADN (Denaturation)

- Cho gel agarose vào hộp đựng dung dịch I (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M)
- Lắc nhẹ trong 25 phút, (chú ý quan sát khi dịch chuyển từ màu nâu thành màu xanh là được).

Mục đích bước này là làm hai sợi trong chuỗi xoắn kép ADN tách ra

3.2.4. Trung hoà (Neutrolisation)

Nhấc gel ra và cho vào hộp đựng dung dịch II (NaCl 1,5 M ;NaOH 0,2 M), lắc nhẹ trong 15 phút.

3.2.5. Thấm ADN lên màng (màng nitrocellulose hay màng nilon)

- Cắt màng, giấy whatman, giấy lọc đúng bằng kích thước gel
- Dùng bể thấm, có thể thay bằng một khay nhựa hay khay thuỷ tinh, đặt tấm ngang trên thành khay.
- Cho dung dịch SSC x 20 vào trong bể (khay)
- Đặt thứ tự trên tấm chắn ngang từ dưới lên:
 1. Cầu giấy thấm
 2. Ba lớp giấy whatman
 3. Gel đã điện di (để úp)

4. Màng
 5. Ba lớp giấy whatman
 6. Nhiều lớp giấy thấm
 7. Vật nặng đè lên
- Để tự thấm qua đêm (khoảng 10 giờ) ở nhiệt độ phòng

3.2.6. Cố định ADN lên màng

- Sau khi thấm, lấy màng ra, rửa nhẹ bằng dung dịch SSC x 2
- Thấm khô dịch trên màng
- Đặt màng dưới đèn UV thời gian 5 phút (hoặc để màng giữa hai lớp giấy thấm 3 - 4 giờ) ở nhiệt độ phòng.

3.3. Lai ADN

3.3.1. Làm tiền lai

- Pha dịch lai: chuẩn bị 0,25 ml dịch lai/ 1 cm² màng gồm dịch lai, NaCl dư 0,5 M, và 5% sinh phẩm đi kèm.
- Cho dịch lai vào hộp kín
- Đặt màng vào từ từ, lắc nhẹ
- Đậy kín hộp cho vào bể ấm 42°C khoảng 1 giờ

3.3.2. Đánh dấu mẫu dò (probe)

- Cho 100 ng mẫu dò ADN vào ống Eppendorf
- Đun trong nước sôi 5 phút (cẩn thận tránh bật nút)
- Lấy ra cho ngay vào lạnh (đá vụn)
- Cho dịch đánh dấu (labelling reagent) với thể tích bằng thể tích mẫu dò, trộn đều.
- Thêm glutaraldehyd với thể tích bằng thể tích dịch đánh dấu
- Để ở 37°C từ 13 - 15 phút

3.3.3. Tiến hành lai

- Đưa mẫu dò đã đánh dấu từ từ vào hộp đã có sẵn dịch tiền lai và màng, tránh đổ thẳng lên màng.
- Trộn đều, để qua đêm ở 42°C

3.4. Phát hiện

3.4.1. Rửa màng lai: sau 12 đến 24 giờ ủ ở 42°C

- Lấy ra ngâm màng lai hai lần x 10 phút trong dung dịch I (SDS 0,4 % và SSC x 5) ở 55°C

- Rửa tiếp màng lại hai lần x 5 phút trong dung dịch II (SSC x 2) ở nhiệt độ phòng (mỗi lần chuyển dung dịch dùng giấy thấm khô màng).

3.4.2. Hiện màng

- Pha trộn thuốc hiện 1 và 2 (bán sẵn) với tỉ lệ 1: 1 lượng thuốc pha đủ 0,125 ml / cm² màng.

- Tráng lên màng
- Thấm khô và úp phim X quang lên màng, ủ 1 - 2 giờ
- Rửa và hiện phim

4. Đánh giá kết quả

Dựa vào thang chuẩn độ dài ADN, so sánh vị trí có probe để biết có đột biến hay không.

5. Lưu ý

Mẫu bệnh phẩm ít, kỹ thuật tiến hành qua nhiều bước nên yêu cầu hết sức cẩn thận trong các thao tác.

6. Các phương pháp khác

Nguyên tắc của “lai” là dùng các mẫu dò đặc hiệu để tìm đoạn ADN có trình tự nucleotid tương đồng nên có thể dùng trực tiếp lên NST hay sử dụng phương pháp lai Dot Blot là cho ADN lên màng, cố định không qua điện di sau đó dùng mẫu dò gắn, rửa và phát hiện nơi có mẫu dò. Ngoài ra có thể sử dụng kỹ thuật lai tại chỗ (FISH – Fluorescent Insitu Hybridization) để phát hiện các bất thường gen.

KỸ THUẬT PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Kỹ thuật PCR được Kary Mullis phát minh năm 1980 nhờ các thành tựu:

1. Phát hiện men tổng hợp ADN (ADN polymerase) có đặc điểm: tổng hợp tiếp tục đoạn ADN đang “dang dở” trên khuôn có sẵn.
2. Biết được trình tự các nucleotid ở nhiều đoạn gen người. Tổng hợp được một đoạn ADN bằng phương pháp hoá học (oligo polynucleotid) làm mồi (primer).
3. Ứng dụng tính chất bổ sung của sợi kép ADN và có thể cắt các liên kết hydro giữa hai sợi bằng nhiệt độ cao.

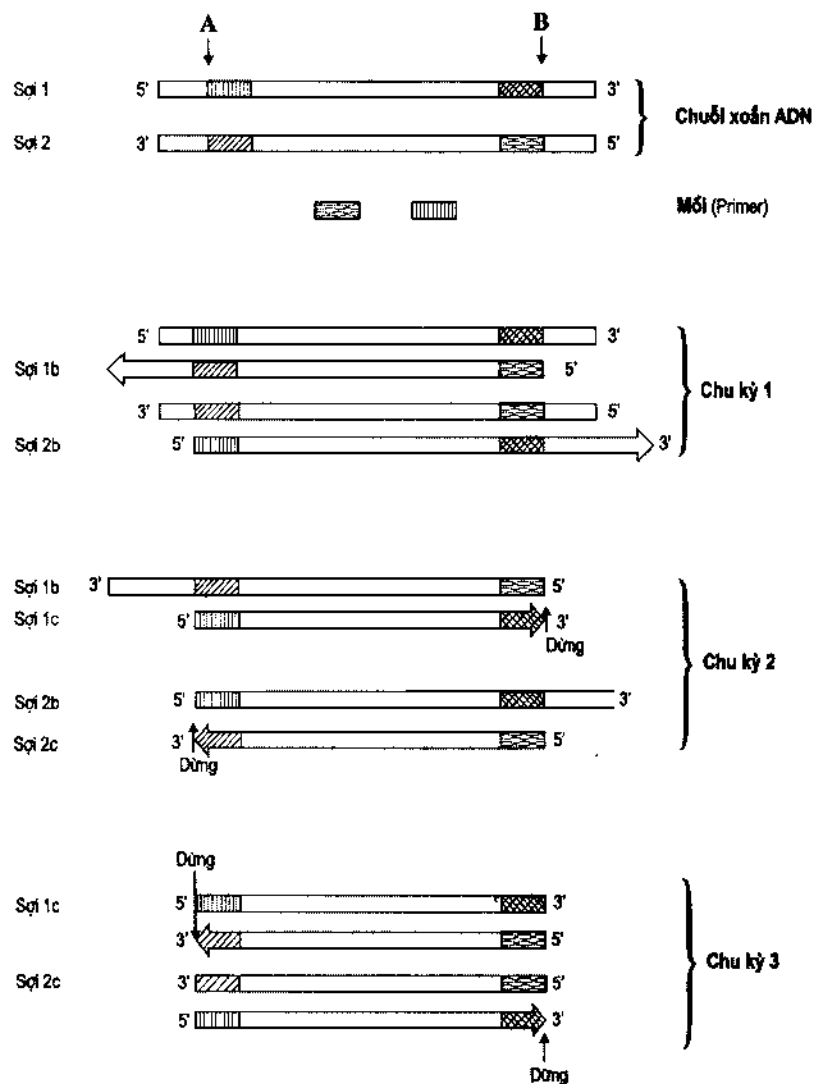
1. Nguyên lý

Người ta dùng nhiệt làm biến tính hai sợi của chuỗi xoắn kép ADN cho chúng tách ra, tạo nên hai sợi tự do có khả năng gắn với đoạn ADN có trình tự base nitơ bổ sung, sau đó lấy đoạn mồi (primer) là đoạn ADN ngắn cho gắn vào

ADN phân lập được ở vùng có trình tự bazơ nitơ tương đồng, rồi điều chỉnh nhiệt độ thích hợp cho hoạt động của enzym (với sự có mặt của các nucleotid hoạt hoá, đoạn mồi đã gắn lên ADN khuôn thì ở nhiệt độ thích hợp ADN polymerase sẽ tổng hợp tiếp ADN). Bằng nhiều lần như vậy, người ta đã tổng hợp được khối lượng lớn ADN trên khuôn có sẵn.

Để nhân lên một đoạn gen, người ta dùng hai mồi (cặp mồi) có trình tự nucleotid tương ứng với hai đầu của đoạn gen này.

Vì quá trình tổng hợp ADN luôn luôn được tiến hành theo chiều từ đầu 5' đến đầu 3', và với 2 mồi có trình tự nucleotid bổ trợ cho 2 sợi ADN ở 2 đầu (phía 3' của mỗi sợi), thì ở chu kỳ một sẽ tạo được 2 đoạn ADN mới dài hơn đoạn cần tìm nhưng mỗi đoạn có một đầu (đầu 5') bị giới hạn bởi mồi. Đến chu kỳ 2 sẽ tạo được 2 đoạn ADN có giới hạn hai đầu ở vị trí mà mồi "gắn" (Hình 3.6).



Hình 3.6: Sơ đồ phản ứng PCR tổng hợp đoạn ADN từ A → B

Nguyên lý hoạt động của máy PCR:

Thực chất của PCR là phản ứng enzym trong ống nghiệm dưới tác dụng của nhiệt. Máy PCR là máy điều khiển nhiệt độ theo chương trình để đảm bảo ba chế độ nhiệt:

- Nhiệt độ 94 - 95°C để tách sợi ADN kép ra hai sợi ADN đơn
- Nhiệt độ 30- 65°C (tùy theo yêu cầu của đoạn môi và tính chất của đoạn gen) có tác dụng “gắn” môi vào vị trí có trình tự base nitơ tương đồng của đoạn gen (ADN).
- Nhiệt độ 70-73°C đảm bảo hoạt động tốt cho enzym tổng hợp ADN tiếp từ đoạn môi.

Do đặc điểm của men taq ADN polymerase có thể chịu nhiệt và mất tác dụng sau một thời gian nên người ta thiết kế các máy có thời gian thay đổi nhiệt độ giữa các chế độ càng ngắn càng tốt

2. Hoá chất, dụng cụ

1. ADN khuôn: từ tách chiết ADN
 2. ADN môi (primer) và các dung dịch đi kèm
 3. DNTP (desoxy ribonucleotid hoạt hoá)
 4. Enzym (taq ADN polymerase)
 5. Máy PCR, máy và dụng cụ hoá chất điện di
- Máy và các dụng cụ chụp ảnh UV, micropipette

3. Tiến hành kỹ thuật

1. Trong ống Eppendorf
 - Pha hỗn hợp dung môi và môi
 - Trộn môi, men, nucleotid
 - ADN khuôn
 - Cho dầu paraffin nếu cần (tùy từng loại máy, nếu có bộ phận chống mất hơi nước có thể không cần dầu).

2. Chuẩn bị chương trình nhiệt cho máy

3. Để máy chạy theo chương trình đã đặt, thời gian khoảng 30 phút

Thông thường một chu kỳ khoảng 1 phút, sau khoảng 30 phút thì men hoạt động kém và lượng ADN cũng đã nhiều. Từ 1 ADN ban đầu sau khi chạy sẽ có 2^n sợi, n là số chu kỳ.

4. Sau khi máy ngừng chạy, để về nhiệt độ 10°C

- Lấy ra hút bỏ dầu trên (nếu có)

- Trong ống Eppendorf cho:
- + 8 μ l dịch ADN vừa tổng hợp
- + 2 μ l thuốc nhuộm

Trộn đều và cho chạy điện di trên gel với dòng điện 80 V, 45 mA, thời gian khoảng 45 phút. Nhuộm, soi và chụp UV sẽ thấy rõ 1 vạch (nếu dùng một cặp mồi).

4. Các yếu tố ảnh hưởng

PCR là phản ứng rất nhạy, dễ dương tính giả nếu để lẫn ADN ngoại lai, nên mọi thao tác ở các bước phải vô trùng và người ta thường chạy thêm một chứng âm (không cho ADN khuôn).

5. Các ứng dụng của PCR

- Dùng để nhân lên ADN sau đó lai, phát hiện bằng mẫu dò đặc hiệu
- Dùng cặp mồi đặc hiệu, có thể 2 hoặc 3 mồi để phát hiện các đột biến hay tính đặc trưng ADN cho loài, cá thể...

Chương 4

SINH HOÁ HUYẾT HỌC

SẮT HUYẾT THANH

(Phương pháp spectrophotometric ferrozine)

1. Nguyên lý

Transferrin gắn vào sắt ferric (sắt III). Trong huyết thanh, được giải phóng và biến đổi thành ferrous (sắt II) bởi hydroxylamin. Sắt II (ferrous) phản ứng với ferrozine thành phức hợp màu được định lượng bằng quang kế.

2. Dụng cụ, hoá chất

2.1. Hoá chất

- Bốn thuốc thử A: 48 ml
- + Guanidinium chlorid : 1,0 mol/L
- + Hydroxylamin : 0,6 mol/L, pH = 4,0
- Bốn thuốc thử B: 2ml: Ferrozine 40 mmol/L
- Sắt chuẩn: 5ml: Sắt 200 µg/L
(Ion standard)

Chuẩn bị thuốc thử xét nghiệm:

(Cho hai ống nghiệm/cho 1 mẫu thử khi tiến hành)

Chuyển các loại thuốc thử trong thuốc B vào 1 lọ thuốc thử A (chú ý 1). Lắc đều và ổn định được 6 tháng ở 2 - 8°C.

Chuẩn bị dung dịch xét nghiệm như sau: Thuốc thử B: 1ml

Thuốc thử A: 24 ml

2.2. Dụng cụ

Pipette, ống nghiệm, quang kế có bước sóng 560 nm (550 - 570nm).

2.3. Bệnh phẩm

Huyết thanh hoặc huyết tương chống đông bằng heparin, ổn định 7 ngày ở 2 - 8°C.

3. Tiến hành

3.1. Một ống thử (one tube/sample)

a. Dùng pipette cho vào ống nghiệm theo thứ tự sau:

		Ống trắng	Ống chuẩn (ST)	Thử (S)
1	Nước cất	200 µl	0	0
2	Sắt chuẩn	0	200 µl	0
3	Mẫu thử	0	0	200 µl
4	Thuốc thử A	1,0ml	1,0 ml	1,0 ml

b. Lắc tròn đều, rồi đọc mật độ quang (A₁) của ống chuẩn (ST) và ống thử (S) ở bước sóng 560nm đối chiếu với ống trắng.

c. Dùng pipette cho vào các ống nghiệm thuốc thử B

5	Thuốc thử B	40µl	40µl	40µl
---	-------------	------	------	------

d. Lắc tròn, để yên ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút, đọc mật độ quang (A₂) của ống chuẩn và ống thử với bước sóng 560nm đối chiếu với ống trắng

3.2. Hai ống thử (Two tubes/sample)

a. Dùng pipette cho vào ống nghiệm theo thứ tự sau:

		Ống trắng	Ống chuẩn (ST)	Thuốc thử trắng (SB)	Thử (S)
1	Nước cất	200 µl	0	0	0
2	Sắt chuẩn	0	200 µl	0	0
3	Mẫu thử	0	0	200 µl	200 µl
4	Thuốc thử A	0	0	1,0ml	0
5	Thuốc thử dùng hàng ngày (Working Reagent)	1,0ml	1,0ml	0	1,0ml

b. Lắc đều, để yên 5 phút tại phòng 20°C

c. Đọc mật độ quang (A) của ống thử trắng ở 560 nm đối chiếu với ống nước cất.

d. Đọc mật độ quang của ống chuẩn và thử tại 560 nm đối chiếu với ống trắng.

4. Cách tính kết quả

4.1. Một ống thử: Tính theo công thức sau:

$$\frac{A_2 - A_1 (\text{mẫu thử}) S}{A_2 - A_1 (\text{mẫu chuẩn}) ST} \times 200 \mu\text{g/dl sắt}$$

4.2. Hai ống thử

$$\frac{A_S - A_{SB}}{A_{ST}} \times 200 \mu\text{g/dl sắt}$$

Đơn vị quốc tế (SI unit) = $\mu\text{g/dL}$ sắt $\times 0,179 = \mu\text{mol/L}$ sắt

5. Nhận định kết quả

Giá trị bình thường

Nam : 70 - 155 $\mu\text{g/dL}$ = 12,5 - 27,7 $\mu\text{mol/l}$

Nữ : 55 - 140 $\mu\text{g/dL}$ = 9,84 - 25,1 $\mu\text{mol/l}$

Mỗi phòng xét nghiệm cần có giá trị bình trung bình riêng của mình.

6. Các yếu tố ảnh hưởng

- Không dùng huyết thanh vỡ hồng cầu sẽ gây sai kết quả
- Ống nghiệm thường dùng nên rửa bằng acid hay dùng ống nghiệm nhựa.

FERRITIN HUYẾT THANH

(Phương pháp đo độ đục latex)

1. Nguyên lý

Ferritin huyết thanh bị ngưng kết bởi hạt latex được gắn vào kháng huyết thanh người có kháng thể ferritin. Sự ngưng kết của hạt latex tỷ lệ thuận với nồng độ của ferritin, và có thể đo được bằng độ đục.

2. Dụng cụ, hoá chất

2.1. Cách thức đóng gói và mã số

Latex:	COD 31926 : 1 x 5 ml
	COD 31026 : 2 x 5 ml
Diluent:	COD 31926 : 1 x 45 ml
(Dung dịch pha loãng)	COD 31026 : 2 x 45ml
(Standard) Chuẩn:	COD 31926 : 1 x 3 ml
	COD 31026 : 4 x 3 ml

- Dung dịch treo (Suspension) của hạt latex được gắn vào huyết thanh người kháng thể ferritin. Natri azit + bảo quản nồng độ 0,95 g/l.

- Dung dịch pha loãng (Diluent). Dung dịch đệm chlorid ammonium 0,2 mol/l, có natriazit 0,95 g/l pH = 8,2.

- Ferritin chuẩn: Hoà tan với 3ml nước cất, ổn định 1 tháng ở 2 - 8°C

2.2. Dụng cụ

- Nồi cách thủy 37°C
- Quang kế hay quang kế có cách thủy 37°C có bước sóng 540 nm (530 - 550nm)

2.3. Bệnh phẩm

Huyết thanh ổn định 7 ngày ở 2 - 8°C, huyết thanh có hồng cầu bị vỡ và có nhiều mỡ không thích hợp cho xét nghiệm, gây sai số.

3. Quy trình kỹ thuật

1. Thuốc thử và quang kế để 37°C
2. Điều chỉnh quang kế về vị trí "0" với nước cất.
3. Trong cốc (Cuvetle) cho:

Số TT	Thuốc thử	Cốc (Cuvetle)
1	Dung dịch hoà loãng	0,90ml
2	Chuẩn hay mẫu xét nghiệm	0,10 ml
3	Latex	0,10 ml

4. Trộn đều, lắc ngang cốc rồi cho vào máy ở 37°C
5. Đọc mật độ quay ở 540 nm (sau 10 giây gọi là A₁) và sau 8 phút sau khi cho thêm mẫu thử vào (A₂)

Cách tính kết quả

$$\frac{(A_2 - A_1) \text{ (mẫu thử)}}{(A_2 - A_1) \text{ chuẩn}} \times \text{nồng độ chuẩn} = \mu\text{g/l ferritin}$$

4. Kết quả: bình thường

Nam : 30 - 220 µg/L

Nữ : 20 - 110 µg/L

Theo tài liệu của Biosystems Clinical Chemistry

COSTA - BRAVA 30 - 4

08030 Barcelona - Spain

ISO - 9001

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Hồng cầu vỡ, huyết thanh không đảm bảo, gây sai số
- Trước khi đọc phải để cách thủy 37°C

SỨC BỀN HỒNG CẦU

1. Nguyên lý

Hồng cầu được cho vào những dung dịch đậm muối nhược trương có pH = 7,4 để ở nhiệt phòng thí nghiệm 22°C. Sau một thời gian nhất định để quan sát xem mức độ tan của hồng cầu.

2. Dụng cụ, hoá chất

Dung dịch mẹ có áp lực thẩm thấu tương đương với dung dịch natri chlorua 10% (bảo quản được hàng tháng) bao gồm các muối sau đây:

- Natri chlorua : 180 g
- Natri dihydrophosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) : 4,86 g
- Di natri hydro phosphat (Na_2HPO_4) : 27,31 g
- Nước cất vừa đủ : 2000 ml

Dung dịch này không trong thì phải lọc. Từ dung dịch mẹ 10% pha thành các dung dịch 1%, 2%, 2,5%, 2,75%...6%, 7%, 8%. Từ dung dịch có nồng độ 2,75% đến 6% cứ mỗi nồng độ cách nhau 0,25%.

Từ các dung dịch phần trăm như trên pha thành các dung dịch phần nghìn tương ứng 1‰, 2‰, 2,5‰, 2,75‰, 8‰ (Từ nồng độ 2,75‰ đến 6‰ cứ mỗi nồng độ cách nhau 0,25‰).

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Cách lấy bệnh phẩm

Lấy 3ml hay 4 ml máu tĩnh mạch có chống đông bằng heparin hay natri oxalat hoặc natri citrat.

3.2. Tiến hành

Chuẩn bị 18 ống nghiệm đều màu loại ống nghiệm ly tâm đường kính 1cm x 6cm. Đánh số từ 1 đến 18. Cho vào mỗi ống nghiệm 5 ml các dung dịch đậm đã pha loãng ra phần nghìn như trên theo nồng độ giảm dần (ống số 1 nồng độ 8‰... ống số 18 nồng độ 1‰).

- Cho vào mỗi ống nghiệm 2 - 3 giọt hồng cầu (sau khi ống máu đã gạn bỏ bột phần huyết tương).
- Lắc nhẹ 2 - 3 lần cho đều hồng cầu trong các ống nghiệm.
- Để ở nhiệt độ phòng xét nghiệm 22°C từ 30 - 60 phút thì đọc kết quả (có thể quay ly tâm rồi đọc kết quả và tính tỷ lệ phần trăm huyết tán).

3.3. Cách đọc kết quả

- Bắt đầu tan: Phần trên có màu hồng
- Tan hoàn toàn: Toàn bộ dung dịch có màu đỏ trong suốt.

4. Kết quả

4.1. Bình thường

- Bắt đầu từ 4,5‰ → 5‰
- Tan hoàn toàn từ 3‰ → 3,5‰

4.2. Bệnh lý

- Sức bền hồng cầu giảm: (Dễ tan ở nồng độ cao) trong thiếu máu huyết tán, trong thiếu máu Minkowski Chauffard.
- Sức bền hồng cầu tăng: (Tan ở nồng độ thấp) trong những bệnh về huyết sắc tố nói chung, ngoài ra còn tăng sau cắt lách, thiếu máu và một số bệnh về gan.

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Dung dịch nhuộm trương phải chính xác nồng độ, sau khi pha phải kiểm tra bằng cách tiến hành xét nghiệm với 1 - 2 hồng cầu của người bình thường xem kết quả có nằm trong giới hạn bình thường không rồi mới sử dụng cho bệnh nhân.

Nếu không chính xác phải pha lại.

- Không làm xét nghiệm này khi bệnh nhân truyền máu chưa được hai tuần.

ĐIỆN DI HUYẾT SẮC TỐ

1. Nguyên lý

Phương pháp điện di là phương pháp lý hoá dùng dòng điện một chiều làm di chuyển các phần tử mang điện. Mục đích của phương pháp này dựa trên sự tích điện của các phân tử, và tốc độ di chuyển khác nhau để tách các thành phần mà ta mong muốn. Từ đó có thể định tính và định lượng.

2. Dụng cụ, hoá chất

2.1. Bảng acetat - cellulose có kích thước: 4 x 17 cm ; 2,5 cm x 17 cm

2.2. Chuẩn bị dung dịch huyết sắc tố

Lấy máu tĩnh mạch có chống đông bằng natrioxalat, natricitrat. Tốt nhất dùng heparin (1 giọt loại 25.000 đơn vị cho 5 ml máu).

- Ly tâm 2500 vòng/phút/ 5 phút.

- Loại bỏ huyết tương - Rửa 4 lần bằng nước muối sinh lý 9‰.
- Làm vỡ hồng cầu bằng nước cất và chloroform
- + 1 thể tích hồng cầu
- + 1 thể tích nước cất
- + 1 thể tích chloroform
- Lắc mạnh trong 5 phút. Để tủ lạnh + 4°C trong một đêm. Sau đó ly tâm 5.000 vòng/phút trong 20 phút. Hút phần trên cùng bằng pipette Pasteur sang một ống nghiệm khác vô trùng, ly tâm 5000 vòng/ phút/ 20 phút. Sau đó lọc lại để có dung dịch huyết sắc tố thật trong.
- Tỷ lệ huyết sắc tố của dung dịch trên được xác định bằng phương pháp so màu thường dung dịch này chứa khoảng 10% huyết sắc tố.

2.3. Dung dịch đệm

2.3.1. Đệm Veronal pH = 8,6

- Veronal sodique (natri veronal) : 10,3 g
- Veronal acid : 1,34 g
- Nước cất vừa đủ : 1000 ml

Điều chỉnh để pH = 8,6

2.3.2. Dung dịch đệm phosphat pH = 6,5

- K_2HPO_4 : 3,05 g
- KH_2PO_4 : 2,40 g
- Nước cất vừa đủ : 1000 ml

Điều chỉnh để pH = 6,5

2.4. Dung dịch nhuộm màu

- Đen amino (amino noir) : 0,5 g
- Methanol : 50 ml
- Acid acetic : 10 ml
- Nước cất : 40 ml

2.5. Dung dịch tẩy màu

- Methanol : 500 ml
- Acid acetic : 50 ml
- Nước cất : 450 ml

2.6. Dung dịch làm trong bằng cellulogen

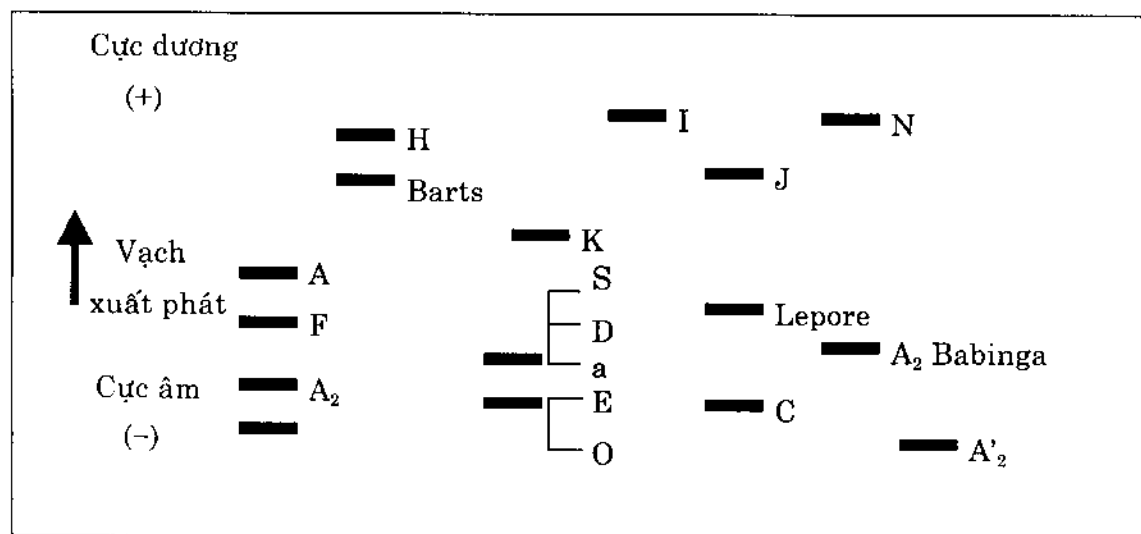
- Acid acetic glacial : 7 ml
- Methanol : 35 ml
- Nước cất : 50 ml

3. Quy trình kỹ thuật

- Nhúng những băng cellulogen vào dung dịch đậm 15 phút.
- Thấm những băng cellulogen vào giữa hai tờ giấy lọc để loại bỏ dung dịch thừa.
- Đặt những băng này trên giá điện di và nhỏ vào phía âm cực trên băng một giọt huyết sắc tố tương đương 5 μ l.
- Làm cầu nối cho các băng chạy. Cho chạy với cường độ 4mA cho mỗi băng và thời gian chạy từ 1 giờ 30 phút $\rightarrow$ 2 giờ (mỗi máy phải tự điều chỉnh thời gian chạy cho thích hợp).
- Tắt máy, lấy các băng điện di ra nhúng trực tiếp những băng này vào dung dịch nhuộm màu trong 5 phút.
- Rửa băng dung dịch tẩy màu đến khi trắng hoàn toàn.
- Sau khi rửa, sẽ làm trong các băng bằng dung dịch làm trong trong 10 phút.

4. Kết quả

Dựa vào hình ảnh của băng mẫu cực dương



Sơ đồ 4.1: Điện di huyết sắc tố

HUYẾT SẮC TỐ KHÁNG KIỂM

1. Nguyên lý

Dưới tác dụng của chất kiểm, các huyết sắc tố bị phá hủy dưới 1 phút. Riêng huyết sắc tố F không bị phá hủy.

2. Dụng cụ, hoá chất

2.1. Hoá chất

- Natri hydroxyd N/12 + NaOH 1N : 5ml
+ Nước cất hai lần : 55 ml
- Dung dịch ngưng kết
- + Amoni sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$: 76 g
- + Acid chlorhydric N : 0,5ml
- + Nước cất : 200 ml
- Dung dịch huyết sắc tố (Xem phần kỹ thuật điện di huyết sắc tố)

2.2. Dụng cụ: Pipette, quang kế có bước sóng 500 - 540 nm

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Dung dịch A

Mỗi bệnh phẩm chuẩn bị hai ống nghiệm sạch

- Một ống: 1,6ml dd NaOH N/12
- Một ống: 3,4 ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Dùng micropipette hút 0,1ml dung dịch huyết sắc tố cho vào ống đựng NaOH N/12. Bấm đồng hồ ngay. Chờ đúng 1 phút thì đổ ống nghiệm chứa 3,4 ml dung dịch amoni sulfat sang, lắc đều rồi lọc qua giấy lọc. Nước lọc là dung dịch A.

3.2. Dung dịch B

Mỗi bệnh phẩm một ống nghiệm để tên và đánh dấu chữ B. Cho vào ống 4ml nước cất và 0,02 ml dung dịch huyết sắc tố, lắc đều. Đó là dung dịch B. Mỗi lần làm xét nghiệm này phải làm song song với một huyết sắc tố của người lớn bình thường. Cũng có thể làm chứng dương tính bằng huyết sắc tố của máu rau thai nhi.

Dung dịch A và B được đọc ở bước sóng 540 nm.

4. Kết quả

Đọc và tính kết quả theo công thức:

$$F = \frac{\text{MDQHA} \times 25}{\text{MDQHB}} = \% \text{ Hb}$$

MDQH: Mật độ quang học

Phần trăm huyết sắc tố F ở đây là so sánh với huyết sắc tố toàn phần.

Trị số bình thường =
Người lớn : 0,2 - 2%
Sơ sinh : 60 - 80%
3 tháng : 20%
7 tháng 1 - 5%

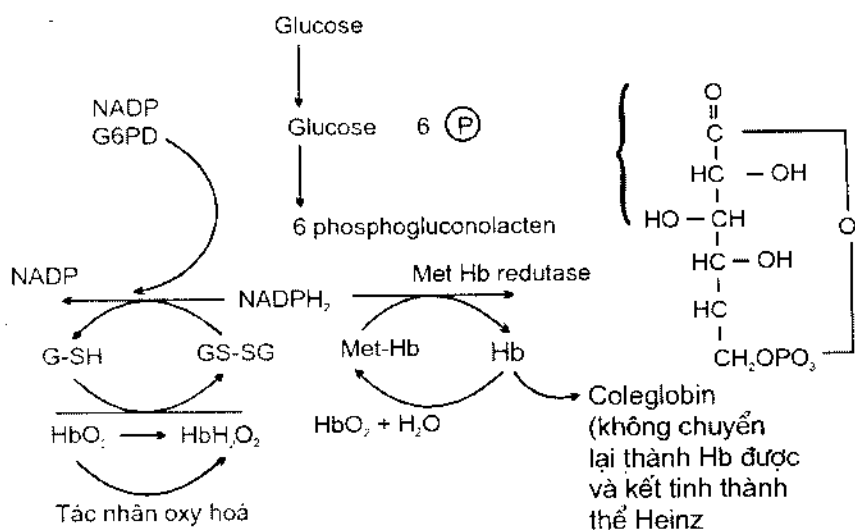
5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Dung dịch NaOH N/12 pha sai, dung dịch A không trong, đục, mật độ quang học cao gây ra số dung dịch NaOH N/12 làm dung dịch huyết sắc tố từ đỏ sang nâu, pha lâu phải kiểm tra lại.
- Tất cả các dung dịch phải được pha một cách chính xác, hemolysat phải làm chính xác.

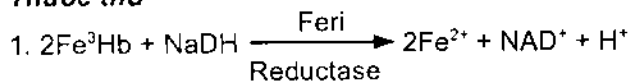
ĐỊNH LƯỢNG METHEMOGLOBIN REDUCTASE

1. Nguyên lý

Methemoglobin (Met-Hb) được tạo ra dưới tác dụng của $K_3Fe(CN)_6$, khi có mặt của $NADH_2$ nhờ tác dụng của Met-Hb-Reductase có trong hemolysat của mẫu xét nghiệm sẽ bị khử thành Hb khử. Hb khử này sẽ kết hợp với O_2 hoà tan trong nước tạo HbO_2 và tùy theo sự tăng mật độ quang học ở bước sóng 575 nm và tính ra hoạt tính Met-Hb-Reductase.



Thuốc thử



2. Dung dịch EDTA. 0,01M

Sơ đồ 4.2: Chu trình tạo methemoglobin (Meth-Hb)

2. Dụng cụ, hoá chất

2.1. Dung dịch EDTA 0,01 M

EDTA ($C_{10}H_{14}ON_2 \cdot 2H_2O$)	: 0,186 g
Nước cất	: 50ml

2.2. Đệm citrat 0,05M pH - 4,7

Acid citric ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	: 1,05 g
Nước cất vừa đủ	: 100 ml

Dùng NaOH 1N điều chỉnh pH về 4,7 rồi thêm nước cất vừa đủ 100ml.

2.3. Dung dịch kaliferricyanua $K_3Fe(CN)_6$: 0,5nm

Kaliferricyanua	: 16,5mg
Nước cất	: 100 ml

2.4. $NADH_2$ khô

Thường dùng loại muối có 2Na

$C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2$ (MW 709,4)	: 9 mg
Nước cất	: 1 ml

2.5. DEAE cellulose dạng bột, sợi (0,1 - 0,25mm)

2.6. Dung dịch huyết sắc tố (MW 64450) đã loại bỏ Met-Hb-Reductase, nồng độ 1,16 g%

Cách làm:

– Máu chống đông, heparin hoặc citrat, ly tâm 2000 vòng/phút/10 phút loại bỏ huyết tương.

– Rửa hồng cầu hai lần bằng nước muối 9‰ tỷ lệ 1/10

– Ly tâm lấy khối hồng cầu 3000 vòng/phút/10 phút.

– Cứ 10ml khối hồng cầu cho thêm 60 ml nước cất hai lần và 1,6 g DEAE cellulose khô.

– Khuấy đều để 10 phút, thỉnh thoảng lắc.

– Ly tâm và lấy dịch trong phía trên rồi lại cho một lượng DEAE vào lắc đều thêm 10 phút.

– Pha loãng dung dịch này bằng nước cất đến nồng độ Hb cuối cùng là 1,2 g%. Đây là dung dịch Hb không có Met-Hb-Reductase.

Kiểm tra trên máy quang kế.

– Chia thành lọ nhỏ để bảo quản (2 tháng). Các thuốc thử để định lượng huyết sắc tố bệnh nhân nên dùng phương pháp cyan met hemoglobin.

3. Quy trình kỹ thuật

Trước hết chuẩn bị hỗn dịch đậm có chứa Met-Hb. Cho vào ống nghiệm 10 ml.

- | | | |
|--------|-------------------------|-----|
| 0,5 ml | dung dịch EDTA | (1) |
| 1 ml | đệm citrat | (2) |
| 1,8 ml | dung dịch $K_3Fe(CN)_6$ | (3) |
| 1 ml | dung dịch HB | (6) |

- Lấy máu bệnh nhân: lấy ở đầu ngón tay bệnh nhân hoặc lấy có chống đông. Hoặc khối hồng cầu nếu là máu toàn phần thì lấy 0,04ml thổi ngay vào hỗn dịch trên, tráng pipette nhiều lần, đồng thời lấy máu để định lượng huyết sắc tố ngay.

- Sau khi cho máu bệnh nhân vào rồi để thêm nước đến 9,9 ml để một thể tích còn lại cho thêm NADH_2 .

- Trộn đều rồi để > 1 giờ ở nhiệt độ phòng, nếu 37°C thì 20 phút.
- Ly tâm loại bỏ cặn.
- Lấy nước trong phía trên để định lượng men.
- Định lượng men. Cho vào 2 ống (1 cm)

	Chứng (1)	Thử (2)
Nước trong	2,97ml	2,97ml
Nước cất	0,03 ml	0
NADH ₂	0	0,03 ml

Trôn đều

Đọc lại sự tăng mật độ quang học ở bước sóng 575 nm trong 10 phút (ghi từng phút).

- Định lượng huyết sắc tố trong mẫu máu xét nghiệm.

4. Kết quả

Hoạt tính Met-Hb-Reductase biểu thị bằng $\mu\text{mol Hb bị khử}$ sau 1 phút cho 1 gram Hb xét nghiệm. Trước hết tính $\Delta E/1$ phút. Thường lấy phút thứ 2, 3 và 4 rồi chia 3.

$$\text{Hoạt tính men} = \frac{\Delta E_{575\text{nm}}/\text{l}'}{\text{Hbg}\%} \times 595$$

Kết quả: Với kỹ thuật này hoạt tính men ở người cho máu là 3,2 đơn vị ($\mu\text{mol HbO}_2/1\text{gHb}$ (dao động từ 2,2 - 3,8 đơn vị).

Ở người thiếu men hoạt tính men sẽ giảm hay không còn.

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Các dung dịch phải pha chính xác.

- Dung dịch huyết sắc tố phải chung và chuẩn chính xác
 - Quang kế phải chuẩn để cho mật độ quang học chính xác
- Các điều kiện trên không đảm bảo sẽ dẫn đến nguyên nhân sai lầm.

XÉT NGHIỆM SỰ THIỂU HỤT MEN G6PD HỒNG CẦU BẰNG PHƯƠNG PHÁP SOI ĐÈN TỬ NGOẠI

Trang 161 - Practical Hematology Sixth Edition. Sir John V. Dace - S.M Lewis
Phương pháp cải tiến của Beutler và Mitchell.

1. Nguyên lý

Dựa vào tính chất phát quang đặc biệt của NADP-H ở vùng ánh sáng tử ngoại.

2. Dụng cụ, hoá chất

2.1. Hoá chất

- D-glucose 6 phosphat: 10 mmol/l. Hoà tan 305 mg muối dinatri hoặc dikali với số lượng tương tự trong 100 ml nước cất.
- NADP⁺ ($C_{21}H_{27}N_7O_{17}P_3Na$) = 7,5 mmol/l. Hoà tan 60mg NADP⁺ dinatriphosphat 10ml nước cất.
- Saponin 750mmol/l (10 g/l)
- Dung dịch đệm TRIS-HCl: pH = 7,8

Tris (hydroxymethyl) aminomethan (24,23 g/l): 250 ml

Oxyd glutathion (glutathione oxy hoá) (GSSG), 8 mmol/l. Hoà tan 49 mg GSSG trong 10 ml nước cất trộn thuốc thử theo cách sau:

Hai thể tích G6PD, 1 thể tích NADP⁺, 2 thể tích saponin, 3 thể tích dung dịch đệm 1 thể tích dung dịch GSSG, 2 thể tích nước. Dung dịch này ổn định 2 năm hay hơn ở nhiệt độ -20°C, 2 tháng nếu ở 4°C, azid có thể cho thêm vào để phòng nấm phát triển hoặc có thể chia ra ống nghiệm nhỏ, mỗi ống 100 µl, giữ âm 20°C mỗi khi dùng một ống nghiệm.

2.2. Dụng cụ

- Khay nhựa có lỗ
- Giấy thấm whatman N:1
- Đồng hồ bấm giây
- Đèn tử ngoại.

3. Quy trình kỹ thuật

Lấy 10 µl máu toàn phần chống đông bằng heparin hay EDTA, cho 100 µl dung dịch trộn để nhiệt độ 15 - 25°C. Lấy 10 µl máu đã phản ứng với thuốc thử

trên vào giấy thấm whatman số 1 tại thời điểm bắt đầu phản ứng và sau đó 0 - 1 phút, 4 - 6 - 8 - 10 phút nếu muốn nhanh hơn có thể để giấy ở nhiệt độ 25 - 30°C.

Cho vào lỗ mở khay nhựa: 10 μ l máu toàn phần chống đông bằng heparin hay EDTA. Cho 100 μ l dung dịch cơ chất, bấm đồng hồ vào tính là phút 0.

Dùng que thủy tinh trộn đều và chấm ra giấy thấm whatman tại các thời điểm: 0' - 1' - 4' - 6' - 8' - 10'

Để khô ở nhiệt độ phòng (khoảng 15 phút) đem soi dưới đèn tử ngoại, đánh giá mức độ phát quang.

4. Đọc kết quả

- Phát quang màu xanh da trời rõ: Hoạt tính men bình thường gọi là phản ứng âm tính (-)
- Không phát quang (thiếu men rõ) gọi là phản ứng dương tính (+)
- Phát quang yếu (thiếu men mức độ vừa phải) phản ứng ($\pm$)

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Dụng cụ bẩn
- Lấy máu chống đông không tốt sẽ dẫn đến sai kết quả

ĐỊNH LƯỢNG MEN G6PD TRONG DUNG DỊCH HỒNG CẦU BẰNG PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ

1. Nguyên lý

Phương pháp này cho phép xác định số lượng hoạt tính men G6PD dựa trên việc đo bước sóng tử ngoại 340nm - tốc độ tạo thành NADP khử (NADPH trong hệ thống chứa một lượng thừa G6PD và NADP). Hoạt tính men trong dung dịch tan hồng cầu là yếu tố quyết định tốc độ biểu diễn phản ứng.

2. Dụng cụ, hoá chất

2.1. Đệm TRIS-HCl

- | | |
|---------------------|--------|
| - pH = 8,0 | 0,1 M |
| - TRIS : | 1,21 M |
| - HCl: 0,1 N | 70 ml |
| - Nước cất vừa đủ | 100 ml |
| - Chỉnh pH bằng HCl | 0,1 N |

2.2. G6P: 20mM

- $\text{Na}_2\text{G}_6\text{P } 3\text{H}_2\text{O}$: 7,2mg
- Nước cất : 1ml

2.3. NADP: 10mM trong nước

- NADP : 7,7 mg
- Nước cất : 1ml

2.4. Dung dịch hoạt hoá MgCl_2 0,1M

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 20,3 g
- Nước cất : 100 ml

2.5. Máy quang phổ kế

- Đồng hồ bấm giây
- Dung dịch Prabkin

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Rửa hồng cầu

Rửa 3 lần bằng $\text{NaCl } 9\text{‰}$ lạnh chú ý gạt bạch cầu và tránh làm vỡ lớp hồng cầu bề mặt trên.

3.2. Chuẩn bị dung dịch huyết sắc tố

- 0,1 ml hồng cầu rửa
- 4,9 ml nước cất

Lắc cẩn thận trong 3 phút, ly tâm ở 4°C 3000 vòng/phút trong 30 phút. Hút phần nước trong ở trên để đo hoạt tính men.

3.3. Đo hoạt tính men

Trước khi cho vào ống để tiến hành phản ứng người ta cho thêm 0,1 ml GGP

- Cho vào ống: 0,3 ml dd đệm TRIS
- 0,3 ml dd hoạt hoá
- 2,0 ml nước cất
- 0,1 ml dd NADP
- 0,2 ml dd huyết sắc tố

Trộn đều, đo mật độ quang học ở bước sóng 340 nm phản ứng bắt đầu khi cho thêm 0,1 ml dd G6PD trộn đều rồi đo sự tăng mật độ quang học từng phút trong 10 phút.

Hoạt tính men được tính theo công thức

$$\text{Men UI/g Hb} = \frac{\Delta E/1' \times 3,0\text{ml} \times 100}{6,22 \times \text{Hb (g)} \times 0,2\text{ml}}$$

Chú thích:

- $\Delta E/1'$ thay đổi mật độ quang học trong 1 phút
- 6,22 hệ số hấp thụ phân tử của NADP
- 3,0 ml thể tích toàn bộ dung dịch phản ứng.
- 0,2 ml thể tích dung dịch huyết sắc tố
- Hb (g) số gram hemoglobin trong 100 ml (dung dịch huyết sắc tố đo trước khi tiến hành phản ứng).

Thông thường người ta đo hoạt tính G6PD ở nhiệt độ 30°C trong ống có điều nhiệt.

Nếu đo ở nhiệt độ phòng thì kết quả phải nhân với hệ số hiệu chỉnh

$$K = [1 - (t^\circ \text{ đo} - 30^\circ\text{C}) \times 0,06]$$

4. Kết quả

4.1. Hoạt tính men bình thường với điều kiện

+ Hồng cầu lưới 0,2 - 1,2 %

+ Nhiệt độ đo 30°C

Sẽ bằng 3,7 - 6,8 đơn vị quốc tế/gHb

4.2. Thiếu hẳn hoạt tính men

0,0 - 0,4 đơn vị quốc tế /gHb

4.3. Thiếu vừa

1,0 - 3,5 đơn vị quốc tế / g Hb

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Các loại dung dịch pha không chuẩn
- Quang phổ kế có bước sóng 340 nm không chính xác
- Dung dịch huyết sắc tố không chính xác

ĐỊNH LƯỢNG HAPTOGLOBIN TRONG HUYẾT THANH

Hatoglobin là một α mucoprotein, nó giảm nặng khi vỡ hồng cầu trong hoặc ngoài huyết quản.

Haptoglobin là một protein làm nhiệm vụ vận chuyển huyết sắc tố tự do trong huyết tương - huyết thanh về gan theo tỷ lệ 2 phân tử hemoglobin (Hb) cho 1 phân tử haptoglobin.

1. Nguyên lý

Một lượng hemoglobin biết trước cho vào huyết thanh. Phức hợp Hb - Haptoglobin được tách ra bằng phương pháp điện di trên giấy cellulose acetat. Mỗi quan hệ của số lượng xác định và huyết sắc tố tự do được tính ra sau khi nhuộm các băng điện di bằng Densitometer ở bước sóng 450nm với đường cắt ngang 0,3mm.

Nồng độ haptoglobin được tính ra bằng mg phức hợp hemoglobin trong 1 lít huyết thanh.

2. Thuốc thử

2.1. Dung dịch đệm: pH = 7,0 Ion lực 0,05

Na_2HPO_4 : 7,1g/1,2 thể tích

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 6,9g/1,1 thể tích

Bảo quản ở +4°C

2.2. Hemoglysat

Máu được lấy vào ống nghiệm vô trùng có chất chống đông là ACD

Rửa 3 lần bằng nước muối sinh lý 0,9%. Sau đó cho vào khối hồng cầu đã rửa 2 thể tích nước cất và 1 thể tích Toluene hoặc Carbon Tetrachloride (CCl_4), các loại dung dịch trên rất độc phải hết sức cẩn thận.

Dung dịch được khuấy đều và lắc bằng máy lắc, sau đó ly tâm 3000 vòng (1200g) trong 30 phút. Sau đó dùng pipette hút dung dịch Hb. Loại bỏ Hb và globin tự do. Tắt nhất cho vào dung dịch hemolysat 2 thể tích nước (không có Toluene) và ly tâm 20000 vòng (18000g) ở 4°C trong 20 phút. Có thể bảo quản ở 4°C được 1-2 ngày, nếu ở -20°C được vài tuần.

2.3. Dung dịch nhuộm

Hoà tan 0,5g O-dianisidin (3,3' - dimethoxybenzidin) trong 70ml của ethanol 95%.

Trước khi dùng cho thêm 10ml dung dịch đệm acetat, pH = 4,7 (Sodium acetate 2,92g, acid acetic glacial 1ml và cho nước cất vừa đủ 1000 ml). 2,5 ml của 3% (H_2O_2 10^{VOL}) sau đó cho nước cất vừa đủ 100ml.

2.4. Dung dịch làm rõ

Acid acetic 25ml + 75ml ethanol 95%

2.5. Dung dịch rửa

Acid acetic 50ml + nước vừa đủ 1000ml

3. Phương pháp

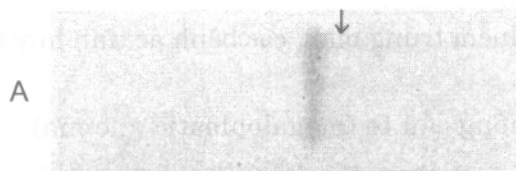
3.1. Chuẩn bị mẫu: Huyết thanh lấy vào ống nghiệm, rồi ủ trong chậu nước ấm (37°C) cho tiết huyết thanh, huyết thanh được bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Lấy 01 thể tích Hemolysat (đã chuẩn bị như trên) cộng với 09 thể tích huyết thanh (đã chuẩn bị như trên) để trong phòng ở nhiệt độ 20°C-22°C trong vòng 10 phút.

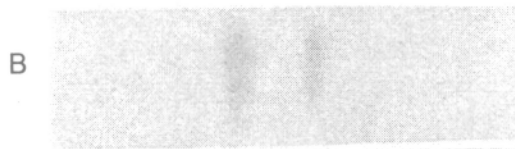
3.2. Tiến hành chạy điện di

Nhúng giấy cellulose acetat trong dung dịch đệm (kích thước giấy chạy điện di là 12 x 2,5cm). Sau đó với giấy cellulose acetat để trên giấy thấm cho se khô. Đặt khoảng 0,75ml dung dịch mẫu đã chuẩn bị trên ở vạch xuất phát. Chạy ở điện thế 150 V chiều dài băng chạy khoảng 5-7 cm trong vòng 30 phút.

Ví dụ như sau:



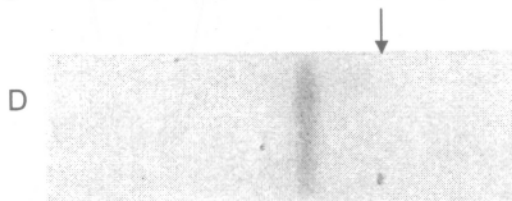
A: Chỉ có hemoglobin (0,4g/l). Băng xuất hiện ở vị trí β globulin.



B: Huyết thanh bình thường cộng với huyết sắc tố, băng xuất hiện ở cả β globulin (Hb) và vùng α_2 globulin (phức hợp hemoglobin và haptoglobin).



C: Lượng haptoglobin giảm nhẹ. Băng ở vị trí β globulin đậm hơn băng ở vị trí α_2 globulin.



D: Huyết thanh của một trường hợp thiếu máu tan máu. Haptoglobin không có. Hemoglobin xuất hiện ở vị trí β globulin.

Đường xuất phát được chỉ bằng mũi tên.

Sau khi chạy 30 phút lấy các băng ra cho vào dung dịch nhuộm O-dianisidin trong 10 phút. Sau đó rửa với nước và dung dịch rửa trong 5 phút, cho vào dung dịch cố định ethanol 95% chính xác trong 1 phút. Rồi cho vào dung dịch làm rõ trong 30 giây. Chuyển băng giấy cellulose acetat trên lam thủy tinh và sấy ở 100°C trong 10 phút.

Sau khi để nguội tiến hành đo kết quả bằng tỷ trọng kế ở bước sóng 540nm với đường cắt ngang là 0,3mm.

4. Tính kết quả

$\text{Haptoglobin (g/l)} = \text{Haptoglobin Fraction} \times \text{Nồng độ huyết sắc tố (g/l)}$

Trong huyết thanh người bình thường haptoglobin liên kết có từ 0,3-2,0g của huyết sắc tố/lít giá trị trung bình là 1,1g.

Nam cao hơn nữ

Bất thường:

Tăng: Khi có thai, nhiễm trùng mạn, các bệnh ác tính huỷ hoại tổ chức, Hodgkin, lupus ban đỏ.

Giảm: Thiếu máu hồng cầu to (megaloblastic anemia)

Tăng tan máu và theo dõi chảy máu ở các tổ chức.

Chương 5

MIỄN DỊCH HUYẾT HỌC

MỘT SỐ KHÁI NIỆM CƠ BẢN VỀ KỸ THUẬT MIỄN DỊCH ỨNG DỤNG TRONG HUYẾT HỌC - TRUYỀN MÁU

Miễn dịch huyết học là một phần của miễn dịch học nói chung. Để có thể nắm bắt được các kỹ thuật và ứng dụng trong Huyết học-Truyền máu, chúng tôi xin nhắc lại một số khái niệm cơ bản về miễn dịch học như: kháng nguyên (KN), kháng thể (KT), phản ứng kết hợp kháng nguyên - kháng thể (KN-KT).

1. Kháng nguyên

1.1. Định nghĩa: Kháng nguyên là chất lạ đối với cơ thể, có khả năng kích thích cơ thể sinh ra KT đặc hiệu chống lại chất đó.

1.2. Đặc tính của kháng nguyên

Đặc tính của KN phụ thuộc vào nhiều yếu tố như đặc tính của vật chủ, tính lạ của KN, bản chất KN....

1.2.1. Tính lạ của KN: Nếu KN là một chất càng khác xa với vật chủ về mặt tiến hoá bao nhiêu thì khả năng sinh KT càng mạnh bấy nhiêu. Dựa trên tính chất lạ ít hay nhiều của KN mà người ta có các khái niệm: dị KN, đồng loài KN, đồng gen KN, tự KN.

1.2.2. Trọng lượng phân tử của KN: Thường những chất có trọng lượng phân tử cao thì tính KN mạnh. Như vậy, protein là những chất có tính KN mạnh nhất. Dựa trên tính chất này, người ta có khái niệm: KN hoàn toàn, KN không hoàn toàn.

1.2.3. Các nhóm quyết định KN: Các nhóm quyết định KN là phần quan trọng trong việc hình thành KT đặc hiệu chống lại chúng.

1.2.4. Bản chất di truyền của vật chủ: Một cơ thể chỉ có thể miễn dịch chống lại một KN mà cơ thể đó không có.

1.2.5. Số phận KN trong cơ thể

KN dù vào cơ thể bằng bất kỳ đường nào thì sau 10 – 15 phút cũng xuất hiện trong máu. Sau đó KN khuếch tán ra khoảng gian bào làm cho nồng độ KN trong máu hạ nhanh. Sau 3 – 4 ngày, KN đột ngột biến mất. Đó chính là do cơ thể

bắt đầu xuất hiện KT. KN khi vào cơ thể bị đại thực bào ăn và trình diện các siêu KN cho các tế bào có thẩm quyền miễn dịch để các tế bào này sản xuất KT theo khuôn của KN.

1.2.6. Những yếu tố ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch của KN

Ngoài tính phản ứng của cơ thể vật chủ, tính sinh miễn dịch của KN còn phụ thuộc vào rất nhiều các yếu tố như: liều lượng KN, đường vào của KN, vai trò của cơ thể và tá chất,...

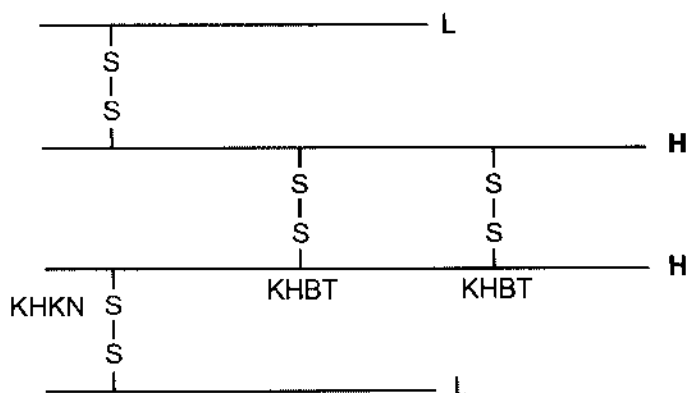
2. Kháng thể

2.1. Định nghĩa: KT là những chất do cơ thể sinh ra chống lại các yếu tố có hại xâm nhập cơ thể. Có hai loại KT: KT dịch thể và KT tế bào. KT dịch thể là những protein huyết thanh nằm ở khu vực gamma globulin. KT tế bào là những KT cố định trên bề mặt tế bào miễn dịch. Ở đây, chúng tôi giới thiệu chủ yếu về KT dịch thể hay còn gọi là globulin miễn dịch (Immunoglobuline - Ig).

2.2. Các lớp globulin miễn dịch: có 5 lớp globulin miễn dịch như sau:

Tên	Trọng lượng phân tử	Nồng độ trong huyết thanh	Việt Nam
IgG hay γ G	150.000	800-1000mg/100	1000 $\pm$ 160mg/100
IgA hay γ A	170.000	100-450mg/100	352 $\pm$ 126 mg/100
IgM hay γ M	900.000	60-280mg/100	174 $\pm$ 31 mg/100
IgD hay γ D	155.000	3-140mg/100	
IgE hay γ E	195.000	0,1-1,4mg/100	

2.3. Cấu trúc của globulin miễn dịch: Cấu trúc của 5 loại globulin miễn dịch tương đối giống nhau, gồm một hay nhiều đơn vị hình thành. Mỗi đơn vị là một phân tử protid có 4 chuỗi đa peptid: 2 chuỗi nặng (H) có trọng lượng phân tử là 50.000 và 2 chuỗi nhẹ (L) có trọng lượng phân tử là 25.000. Hai chuỗi nặng nằm kế nhau còn hai chuỗi nhẹ nằm ở 2 cạnh ngoài chúng được nối với nhau bằng cầu nối disulfua (SH) (Hình 5.1). Các chuỗi nặng (H) của các Ig thì khác nhau, thí dụ IgG chuỗi nặng ký hiệu là γ ; IgA ký hiệu là α , IgM ký hiệu là μ , IgD ký hiệu là δ , IgE ký hiệu là ϵ ; còn chuỗi nhẹ của các Ig chỉ có 2 typ hoặc λ hoặc κ .



Hình 5.1: Sơ đồ cấu trúc phân tử của IgG

2.4. Đặc tính của globulin miễn dịch (xem phần lý thuyết)

3. Phản ứng kết hợp kháng nguyên - kháng thể

Phản ứng kết hợp KN-KT là phản ứng cơ bản của quá trình miễn dịch. Trong cơ thể, phản ứng KN-KT là nguyên nhân của các hiện tượng bảo vệ cũng như hiện tượng quá mẫn của quá trình miễn dịch. Trong labo, phản ứng KN-KT là cơ sở để phát hiện KN, KT hoặc cả hai.

3.1. Cơ chế kết hợp KN-KT: KN và KT kết hợp đặc hiệu với nhau chủ yếu dựa vào các lực liên kết. Có 4 loại lực kết hợp được nói đến là: (1) Lực hấp dẫn phân tử Van der Waals, (2) Lực tĩnh điện coulomb, (3) Lực liên kết giữa các cầu nối hydro và (4) Lực ố thủy (lực liên kết giữa KN, KT khi không có phân tử nước ở giữa).

3.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng kết hợp KN-KT: Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình kết hợp KN-KT bao gồm: (1) Nhiệt độ phản ứng, (2) Độ ẩm, (3) pH của môi trường, (4) lượng KN, KT tham gia phản ứng, (5) Nồng độ các ion trong môi trường phản ứng...

3.3. Tác dụng sinh học của phản ứng kết hợp KN-KT: Mục đích cuối cùng của kết hợp này là loại trừ KN ra khỏi cơ thể. Việc loại trừ thông qua KT dịch thể có trong huyết thanh (Miễn dịch dịch thể) và KT tế bào (Miễn dịch qua trung gian tế bào).

Sau đây, chúng tôi xin giới thiệu một số kỹ thuật chính của miễn dịch học ứng dụng trong Huyết học - Truyền máu bao gồm: (1) Kỹ thuật miễn cảm động vật, (2) Kỹ thuật phân lập tế bào, (3) Kỹ thuật kết tủa, (4) Kỹ thuật ngưng kết và một số kỹ thuật khác.

KỸ THUẬT MẮN CẢM ĐỘNG VẬT

1. Một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tạo kháng thể

Sự tạo thành kháng thể chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác nhau: loại kháng nguyên, liều lượng kháng nguyên, đường vào, khoảng cách giữa các lần miễn cảm, sự lưu lại của kháng nguyên trong cơ thể, loại động vật, tuổi động vật cũng như tình trạng chung của động vật khi tiếp xúc với kháng nguyên, tính kháng nguyên... Bản chất, cấu trúc của kháng nguyên cũng như các tế bào có thẩm quyền miễn dịch đóng một vai trò rất quan trọng, có tính đặc hiệu trong quá trình tạo kháng thể và tất nhiên được lưu ý đặc biệt trong công tác sản xuất các kháng huyết thanh miễn dịch. Trong phần này, chúng tôi nêu lên một số yếu tố về phương diện động vật thí nghiệm: chủng loại, tuổi động vật... và vai trò của tá chất trong quá trình miễn cảm.

1.1. Khả năng đáp ứng miễn dịch của các loài động vật

1.1.1. Các loài động vật

Khi có kháng nguyên xâm nhập, cơ thể sinh vật phản ứng lại để loại trừ kháng nguyên, trong đó bao gồm quá trình tạo kháng thể. Nói như thế không phải tất cả các loài động vật và cũng không phải tất cả các chủng trong cùng một loài động vật đều phản ứng tạo kháng thể như nhau đối với một kháng nguyên. Trong các động vật thí nghiệm và ngựa là động vật được sử dụng nhiều để gây miễn cảm và do đó huyết thanh miễn dịch cũng được xếp thành hai loại chính: huyết thanh thỏ miễn dịch chứa kháng thể loại R (rabbit type) và huyết thanh ngựa miễn dịch chứa kháng thể loại H (horse type).

- *Thỏ* là động vật thông dụng nhất trong công tác điều chế kháng huyết thanh miễn dịch. Thỏ dễ nuôi, sạch sẽ, hiền lành cho nên rất tiện dụng trong các phòng thí nghiệm.

- *Ngựa*, dê là những động vật lớn cho lượng huyết thanh nhiều. Nhưng trong công tác thực nghiệm nói chung và điều chế kháng huyết thanh nói riêng, ngựa, dê là những động vật tương đối hiếm và đắt, giá thành huyết thanh cao.

- *Chuột lang* thì có phản ứng tạo kháng thể dịch thể không tốt nhưng lại thích hợp đặc biệt cho các phản ứng kháng nguyên - kháng thể tế bào. Chuột lang cũng như chuột cống trắng và chuột nhắt, một mặt cho ta lượng huyết thanh quá ít ỏi, mặt khác phản ứng kết tủa miễn dịch của các kháng huyết thanh này yếu.

- *Gà, chim*: Huyết thanh chim cần dung dịch có ion lực cao (có nồng độ gấp 10 đến 12 lần dung dịch đẳng trương) để tạo phản ứng kết tủa trong môi trường lỏng, trong khi đó ở môi trường gel chỉ cần nồng độ đẳng trương sẽ tạo tủa tốt.

Ambrosius đã tiến hành so sánh khả năng tạo kết tủa của huyết thanh miễn dịch thỏ, chó, chuột cống trắng, chuột lang, chuột nhắt và chuột đồng. Kháng

nguyên được sử dụng là huyết thanh lợn bất hoạt. Tác giả nhận thấy khả năng kết tủa của các kháng huyết thanh khác nhau rõ rệt: kháng huyết thanh thỏ có khả năng kết tủa cao nhất rồi đến chó và chuột đồng là thấp nhất.

Nói tóm lại, thỏ là động vật có nhiều ưu điểm và tiện dụng nhất dùng gây miễn cảm điều chế các kháng huyết thanh miễn dịch, sau đó đến ngựa, dê.

1.1.2. Tuổi động vật.

Tuổi động vật có ảnh hưởng quan trọng đối với quá trình tạo kháng thể. Phôi và động vật mới lọt lòng hầu như chưa có khả năng tạo kháng thể hoặc nói một cách chính xác hơn là quá yếu. Kaliss và cộng sự (1962) đã tiến hành tiêm một kháng nguyên để gây miễn cảm cho thỏ mới đẻ, kết quả đem lại là dung nạp miễn dịch đối với kháng nguyên đó. Những trẻ mới đẻ, ngay tuần lễ đầu được miễn cảm một kháng nguyên thì không có hiện tượng tạo kháng thể trước tháng thứ 2.

Sự trưởng thành của các cơ quan có thẩm quyền miễn dịch gắn liền với tuổi của động vật, do đó điều chế các kháng huyết thanh miễn dịch phải tiến hành trên động vật trưởng thành khoẻ mạnh.

Trong cùng một chủng và cùng một điều kiện sinh sống, có con phản ứng mạnh đối với kháng nguyên miễn cảm tức là tạo được kháng thể hiệu giá cao, nhưng lại có những con phản ứng yếu, cho kháng thể hiệu giá thấp. Do đó trong quá trình gây miễn cảm, cần chọn lọc những con có phản ứng tốt để thuần chủng.

Ngoài ra yếu tố thần kinh, nội tiết, các thuốc ức chế miễn dịch cũng ảnh hưởng khá lớn đến quá trình tạo kháng thể. Vì vậy cần lưu ý đến tình trạng chung và điều kiện sống của con vật khi tiến hành gây miễn cảm.

1.2. Vai trò tá chất

Tá chất là những chất được trộn với kháng nguyên khi gây miễn cảm. Tá chất có tác dụng tăng cao khả năng đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, qua đó mà tăng cường sản xuất kháng thể, cho nên có tên là tá chất miễn dịch. Về cơ chế tác dụng của tá chất, có tác giả cho rằng tá chất đã tăng hoạt tính phospholipase A của đại thực bào. Nhờ đó lexitin chuyển thành lyzolexitin, có chức năng của một tá chất nội sinh.

1.3. Chăn nuôi động vật thí nghiệm

Trong hoàn cảnh chưa có cơ sở chăn nuôi lớn để cung cấp các động vật thuần chủng ổn định, mỗi đơn vị nghiên cứu đều có một cơ sở chăn nuôi nhỏ. Động vật thí nghiệm hầu hết đều mua ở chợ hoặc ở các gia đình chăn nuôi riêng lẻ một cách tùy tiện. Chế độ nuôi dưỡng và khẩu phần ăn hoàn toàn tự do theo khả năng cung cấp của từng cơ sở. Chế độ chăm sóc theo dõi sức khoẻ động vật thí nghiệm còn yếu. Việc nhập động vật thí nghiệm rất bị động và không chọn lọc tốt. Động vật thí nghiệm chất lượng kém thì độ tin cậy của kết quả nghiên cứu rất sai lệch. Không có động vật thuần chủng tốt là một khó khăn lớn cho công tác thí nghiệm nói chung và công tác gây miễn cảm điều chế kháng huyết thanh miễn dịch nói riêng. Tình trạng con vật có tính quyết định đối với khả năng đáp ứng miễn dịch

tạo kháng thể. Để khắc phục một số khó khăn tạm thời trên đây, trước khi có trại chăn nuôi lớn cung cấp động vật thuần chủng với chế độ nuôi dưỡng và khẩu phần thống nhất, cần đề cao công tác lựa chọn khi nhập động vật thí nghiệm.

Trước hết, các động vật được chọn phải có sức khỏe tốt, không mắc bệnh như các bệnh ngoài da: ghẻ, nấm... có cân nặng tối thiểu tùy từng loại động vật. Thỏ phải có cân nặng trên 2,5kg, chuột lang phải nặng trên 300 gam. Sau khi nhập động vật cần phải nuôi trong một thời gian ít nhất 15 ngày rồi mới tiến hành gây miễn cảm.

Cơ sở chăn nuôi cần phải cao ráo, sạch sẽ, thoáng, về mùa đông không để gió lùa, về mùa hè không quá nóng. Phải có chế độ vệ sinh chuồng trại hàng ngày cũng như vệ sinh cho động vật. Đặc biệt cần giữ vệ sinh tốt cho các khu vực tiêm như gan bàn chân, tai, bụng để tránh hiện tượng nhiễm trùng.

Người chăn nuôi phải tôn trọng nội quy bảo hộ lao động và vệ sinh dinh dưỡng. Khẩu phần ăn cần đủ về số lượng và đảm bảo chất lượng, đặc biệt phải đảm bảo về protein.

2. Điều chế kháng huyết thanh miễn dịch

2.1. Nguyên tắc chung

Nói chung cho đến nay chưa có một phương pháp miễn cảm nào thích hợp, tiện lợi nhất đối với mỗi một kháng nguyên và cho mỗi một loại động vật. Người ta cũng chưa tìm ra được một mô hình miễn cảm nào có tính vạn năng. Một mô hình miễn cảm tốt được đánh giá ở chỗ kháng thể được tạo ra nhanh, hiệu giá cao, tinh khiết. Tuy nhiên, việc điều chế kháng huyết thanh miễn dịch cần phải tuân theo một số nguyên tắc nhất định như chất lượng kháng nguyên, liều lượng kháng nguyên, cách tiêm, khoảng cách giữa các lần tiêm...

2.1.1. Chất lượng kháng nguyên

Tính kháng nguyên của một chất (khả năng gây đáp ứng miễn dịch) phụ thuộc vào bản chất, trọng lượng phân tử, cấu trúc, tính lạ, khả năng chuyển hoá của chất đó. Tính kháng nguyên còn phụ thuộc vào tính đơn giá hay đa giá, nghĩa là kháng nguyên gồm nhiều protein hay chỉ có một protein.

Độ tinh khiết của kháng nguyên quyết định độ tinh khiết của kháng huyết thanh. Cần phải đặc biệt chú ý đến độ tinh khiết của kháng nguyên khi điều chế kháng huyết thanh đơn đặc hiệu. Bằng các phương pháp tủa, sắc ký, hấp phụ miễn dịch, người ta điều chế được kháng nguyên tinh khiết.

2.1.2. Liều lượng kháng nguyên, khoảng cách giữa các lần tiêm

Bảng 5.1: Liều lượng kháng nguyên và phương pháp miễn cảm

Tiêm lần lượt	Lượng kháng nguyên CFA (ml)	Tạo kháng thể	Thời gian có hiệu giá kháng thể cao nhất	Lượng kháng thể	Xuất hiện quá mẫn chậm	Tiêm nhắc lại lần II	Tác dụng trên hiệu giá kháng thể	Tác dụng trên phản ứng quá mẫn chậm
Trong da	0,4 ml 25mg RSA 1mg MB	Nhanh	2-4 tuần	80mcg KT.N/ml	++	10mg RSA (nước muối)	500mcg KT.N/ml	Giảm rõ
Gan bàn chân	0,4 ml 25mg RSA 1mg MB	Nhanh	2-4 tuần	200mcg KT.N/ml	++	10mg RSA (nước muối)	1000mcg KT.N/ml	Giảm rõ
Màng bụng	0,4 ml 25mg RSA 1mg MB	Chậm hơn	6 - 9 tuần	200mcg KT.N/ml	±	10mg RSA (nước muối)	400mcg KT.N/ml	Giảm rõ
Dưới da	0,4 ml 25mg RSA 1mg MB	Chậm hơn	6 - 9 tuần	400mcg KT.N/ml	±	10mg RSA (nước muối)	Thay đổi ít	Giảm rõ
Tiêm bắp	0,4 ml 25mg RSA 1mg MB	Chậm hơn	6 - 9 tuần	400mcg KT.N/ml	±	10mg RSA (nước muối)	Thay đổi ít	Giảm rõ
Tĩnh mạch	0,4 ml 25mg RSA 1mg MB	Chậm hơn				10mg RSA (nước muối)	600mcg KT.N/ml	

CFA: Tá chất Freund toàn vẹn

MB: Mycobacterium

RSA: Albumin huyết thanh bò

KT-N: Nitơ của kháng thể

2.1.3. Đường tiêm

Để miễn cảm động vật, người ta tiến hành các cách tiêm khác nhau như tiêm trong da, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch. Ngoài ra còn sử dụng cách tiêm màng bụng và gan bàn chân phối hợp. Tùy theo loại động vật mà chọn vị trí tiêm bắp, tiêm dưới da, tiêm tĩnh mạch cho thích hợp. Mỗi một cách tiêm đều có tác dụng khác nhau. Tiêm tĩnh mạch có tác dụng nhanh toàn thân, đặc biệt gan, lách. Tiêm màng bụng cũng có tác dụng toàn thân nhưng trước hết là tác dụng đến các hạch của mạc treo. Tiêm bắp, tiêm dưới da có tác dụng tốt đối với các hạch địa phương.

Tiêm trong da và gan bàn chân làm kháng nguyên tiêu chậm hơn, kéo dài kích thích của kháng nguyên tại chỗ. Nhưng lượng kháng nguyên cho mỗi lần tiêm ít, do đó thường dùng đối với các kháng nguyên có trọng lượng phân tử cao, hoặc kháng nguyên không phải protid như polysaccharid... Năm 1960 Leskowitz và Waksman đã tiến hành so sánh kết quả quá trình tạo kháng thể và quá mẫn chậm bởi các cách tiêm khác nhau (bảng 5.1).

2.1.4. *Động vật thí nghiệm*: Thỏ, chuột lang, chuột cống trắng, gà... là những động vật được sử dụng nhiều trong điều chế kháng huyết thanh. Dưới đây chúng tôi giới thiệu kỹ thuật tiêm mẫn cảm cho một số động vật trên.

a. Thỏ

• *Tiêm tĩnh mạch*: Vị trí tiêm tĩnh mạch tốt nhất đối với thỏ là tĩnh mạch tai. Trước khi tiêm cần phải vệ sinh nơi tiêm như cắt sạch lông và sát trùng bằng cồn. Để tĩnh mạch nổi rõ để tiêm thì sau khi cắt lông, nên xoa nhẹ vùng tiêm bằng tay. Vì quá trình gây mẫn cảm phải tiêm nhiều lần, do đó phải tiêm lần theo tĩnh mạch từ đầu tai đến gốc tai nhằm tránh hiện tượng vỡ mạch, tắc mạch. Nên cố định thỏ bằng một hộp gỗ, chỉ để tai thỏ ra ngoài thì khi tiêm sẽ đơn giản, đảm bảo chắc chắn kết quả.

• *Tiêm dưới da*: Vị trí tiêm dưới da đối với thỏ là ở vùng sườn hoặc vùng lưng. Trước khi tiêm cũng cần phải cắt lông và sát trùng bằng cồn. Để đảm bảo chính xác khi tiêm, lấy một tay cầm da lên và tay kia luồn mũi kim vào đúng vị trí dưới da.

• *Tiêm màng bụng*: Trong kỹ thuật tiêm màng bụng, cần chú ý tư thế thỏ khi tiêm và kim tiêm. Kim tiêm không được quá sắc, đường tiêm đi chéo 30° để tránh tiêm sâu quá vào ruột. Trong khi tiêm phải dốc ngược thỏ để ruột dồn hết về phía trên, tạo điều kiện tiêm được chính xác, mặt khác tay trái cầm da bụng kéo lên, tay phải luồn kim tiêm với đường chéo 30° .

• *Tiêm trong da*: Trước khi tiêm cần cắt lông thật sạch và sát trùng. Kỹ thuật tiêm phải chính xác tạo được một nốt nổi sần như trong các thử nghiệm nội bì.

b. Chuột lang

• *Tiêm tĩnh mạch*: Tĩnh mạch chân sau là nơi dễ tiêm nhất đối với chuột lang. Có thể tiêm vào tĩnh mạch nằm giữa ngón chân giữa và ngón chân ngoài; có thể tiêm vào tĩnh mạch của phần trên đùi sau khi bộc lộ tĩnh mạch. Ngoài ra, có thể tiêm vào tĩnh mạch tai, hoặc tĩnh mạch quy đầu. Cần cố định chuột lang trên một miếng gỗ phẳng (bàn mổ chuột) trong khi tiêm. Vùng tiêm cũng phải làm sạch lông và sát trùng cẩn thận. Nếu bộc lộ tĩnh mạch sau khi tiêm phải khâu 1-2 mũi và băng sát trùng.

• *Tiêm trong da*: Thường tiêm trong da khi tiến hành các thử nghiệm. Nơi tiêm trong da đối với chuột lang là da vùng lưng và da vùng bụng.

c. Chuột (chuột cống trắng, chuột đồng).

• *Tiêm tĩnh mạch*: Vị trí tiêm tĩnh mạch đối với chuột cống trắng và chuột đồng là tĩnh mạch đuôi. Có thể gây mê bằng ether trước khi tiêm, hoặc cố định trên bàn mổ chuột. Để tĩnh mạch nổi rõ để tiêm thì trước khi tiêm cần ngâm đuôi chuột 5 - 10 phút trong nước ấm khoảng 50°C và làm thật sạch vùng tiêm. Hai tĩnh mạch đuôi nằm dọc hai bên của đuôi.

• *Tiêm trong da*: Vị trí tiêm trong da như đối với chuột lang.

d. Gà mái

Gây mẫn cảm cho gà cũng như cho chim, thường tiến hành tiêm tĩnh mạch. Tĩnh mạch nằm ở mặt trong vùng gốc cánh là nơi dễ tiêm nhất. Cần phải cố định gà thật tốt để đảm bảo tiêm chính xác.

e. *Trứng gà*: Gần đây, người ta còn dùng trứng gà mái để sản xuất kháng thể. Sau khi miễn cảm, gà mái được nuôi để đẻ trứng, kháng huyết thanh (được gọi là IgY được chuyển tới lòng đỏ trứng và thu hoạch trứng gà để phân lập kháng thể bằng việc kết hợp phương pháp kết tủa với natri sulphat và/hoặc acid caprylic. Người ta đã thành công trong việc gây miễn cảm kháng nguyên nọc rắn loài Bothrops hoặc loài Crotalus cho gà mái Leghorn để tạo ra kháng thể kháng nọc rắn, sử dụng trong các trường hợp bị các loài rắn này cắn.

2.2. Miễn cảm cho động vật

Tuỳ theo kháng nguyên, tuỳ theo yêu cầu điều chế kháng huyết thanh đơn giá hay đa giá mà có thể tiến hành theo các cách sau đây:

- Miễn cảm bằng dung dịch kháng nguyên đơn thuần.
- Miễn cảm hỗn hợp kháng nguyên với alumin hydroxyd và tá chất Freund.
- Miễn cảm phối hợp. Lần miễn cảm đầu dùng hỗn hợp kháng nguyên với tá chất, sau đó miễn cảm bằng dung dịch kháng nguyên không có tá chất.

Để tiến hành nghiên cứu giải quyết các vấn đề thực tiễn đề ra, các ngành miễn dịch thuộc y học cũng như thuộc chăn nuôi thú y... phải có các kháng huyết thanh đa giá cũng như kháng huyết thanh đơn giá. Các kháng huyết thanh đã được nhiều nước sản xuất bán trên thị trường quốc tế nhưng rất đắt, và bảo quản khó khăn, phải luôn luôn giữ ở nhiệt độ tối thiểu 4°C để hiệu giá kháng thể không bị giảm. Một mặt để giải quyết khó khăn chung, mặt khác, để chủ động trong công tác nghiên cứu, việc tự sản xuất kháng huyết thanh là điều cần thiết. Do vậy chúng tôi giới thiệu một số mô hình miễn cảm chung nhằm mục đích giúp các cơ sở có thể nghiên cứu ứng dụng tuỳ theo yêu cầu và điều kiện của mình.

2.2.1. Miễn cảm bằng kháng nguyên đơn thuần

a. *Đối với kháng nguyên hoà tan*: Các kháng nguyên hoà tan thường được sử dụng với nồng độ từ 0,01g% đến 1g% trong quá trình gây miễn cảm. Nồng độ protein bình thường của huyết thanh: 6 - 7g%, trong đó khoảng một nửa là alumin, khoảng 1/5 là gamma globulin và khoảng 2% trong số còn lại là hỗn hợp của hơn 20 thành phần protein có đặc tính kháng nguyên.

Để gây miễn cảm cho thỏ, Gillert và Eichhorn đã sử dụng dung dịch kháng nguyên 0,1g % theo mô hình đơn giản bằng cách tiêm tĩnh mạch dưới đây (Bảng 5.2)

Bảng 5.2: Mô hình miễn cảm cho thỏ theo Gillert

Ngày tiêm	Thể tích tiêm
Ngày thứ nhất	1ml
Ngày thứ hai	3ml
Ngày thứ ba	3ml
Ngày thứ 21	3ml

Ngày thứ 28 lấy máu thử hiệu giá kháng thể, nếu đạt hiệu giá cao mong muốn thì có thể giết thử lấy toàn bộ huyết thanh.

Để tránh nguy cơ sốc phản vệ do tiêm protein lạ vào tĩnh mạch thì lần đầu mẫn cảm tiêm tĩnh mạch, sau đó tiêm dưới da hoặc tiêm màng bụng. Mặt khác, trước khi mẫn cảm 1 - 2 giờ, có thể thử phản ứng nội bì với 0,1 ml dung dịch kháng nguyên, hoặc có thể dùng kháng histamin tổng hợp.

b. Đối với kháng nguyên không tan (kháng nguyên vi khuẩn).

Tiêm tĩnh mạch và trong da thì đạt kết quả tốt hơn so với tiêm bắp và tiêm dưới da, mặt khác, vi khuẩn sống gây đáp ứng miễn dịch tốt hơn vi khuẩn chết. Để bảo vệ động vật mẫn cảm, nên tăng liều lượng dần dần. Với hỗn dịch vi khuẩn có 1 tỷ mầm bệnh trong 1ml thì Alfoldy Hegedus gây mẫn cảm cho thử, bằng cách tiêm tĩnh mạch.

Bảng 5.3: Mô hình mẫn cảm cho thử theo Alfoldy

Ngày tiêm	Thể tích tiêm
Ngày thứ nhất	0,1ml
Ngày thứ 6	0,2ml
Ngày thứ 11	0,5ml
Ngày thứ 16	1,0ml
Ngày thứ 21	2,0ml

Ngày thứ 25 lấy máu thử hiệu giá kháng thể, và có thể giết thử lấy huyết thanh nếu hiệu giá đạt yêu cầu. Nếu hiệu giá còn thấp, có thể tiếp tục tiêm nhắc lại một lần nữa 2ml, hoặc tiêm 5 ngày liên mỗi ngày 2ml.

Điều chế kháng huyết thanh miễn dịch mà kháng nguyên là vi khuẩn, cho đến nay ít sử dụng phương pháp mẫn cảm kháng nguyên đơn thuần mà thường sử dụng hỗn hợp kháng nguyên với tá chất. Vì khi sử dụng thêm tá chất thì đạt được hiệu giá kháng thể cao hơn nhiều.

2.2.2. Mẫn cảm kháng nguyên với tá chất

Có nhiều loại tá chất dùng để mẫn cảm, ở đây chúng tôi chỉ giới thiệu tá chất thông dụng nhất, tá chất Freund.

Mẫn cảm bằng hỗn hợp kháng nguyên - tá chất Freund là phương pháp được ứng dụng rộng rãi ở các nước trong công tác điều chế kháng huyết thanh. Hỗn hợp kháng nguyên - tá chất Freund đã đem lại được sự đáp ứng miễn dịch tốt, tạo được lượng kháng thể nhiều. Có hai loại tá chất Freund được bán trên thị trường.

Loại không hoàn toàn (incomplete): - Arlacel A: 1,5ml

- Bayol F : 8,5ml

Loại hoàn toàn (complete):

- Arlacel A: 1,5ml

- Bayol F : 8,5ml

- Mycobacterium: 5mg

(1) Điều chế hỗn hợp "kháng nguyên - tá chất:

Hỗn hợp kháng nguyên - tá chất Freund chỉ điều chế trước khi gây miễn cảm.

Dụng cụ cần có:

- Bơm tiêm loại 10ml với kim tiêm to.
- Cốc có mỏ loại 10 - 25ml

Dụng cụ phải được rửa sạch, sấy khô, vô trùng trước khi dùng.

Tiến hành điều chế:

- Dung dịch kháng nguyên (protein) hoặc nhũ dịch kháng nguyên (vi khuẩn, virus, tế bào): 1 thể tích.
- Tá chất Freund loại hoàn toàn hoặc không hoàn toàn: 1 thể tích

Trộn tá chất với kháng nguyên. Đầu tiên cho vào cốc có mỏ 1 thể tích tá chất Freund, sau đó cho từ từ 1 thể tích dung dịch kháng nguyên vào. Dùng bơm tiêm để bơm, hút nhiều lần khoảng 30 - 40 phút là đạt yêu cầu (hỗn dịch đã thuần nhất) cho đến khi nào hỗn dịch trắng đục như sữa, có độ keo đặc tốt, nghĩa là nhỏ một giọt hỗn dịch lên mặt nước lã mà giọt đó không bị tan ra.

Có thể dùng cối chày sứ nhỏ có dung tích khoảng 50ml vô trùng để nghiền hỗn hợp kháng nguyên - tá chất Freund.

(2) Gây miễn cảm cho thử:

- Với dung dịch kháng nguyên, tổng liều protein cho một thử: 75 - 100 mg.

Mỗi tuần tiêm một lần trong 3 - 4 tuần liên. Có thể tiêm dưới da hoặc tiêm bắp.

Liều lượng cho mỗi lần tiêm: 2ml hỗn hợp kháng nguyên - tá chất Freund (1ml dung dịch kháng nguyên: 25mg kháng nguyên trong 1ml nước muối sinh lý + 1ml tá chất Freund).

Huyết thanh có kháng thể tăng cao kéo dài trong quá trình gây miễn cảm từ 2 - 4 tháng sau. Khoảng 5 - 6 ngày sau lần tiêm cuối cùng thì lấy máu thử.

- Kháng nguyên là chất chiết xuất của phấn hoa. Tinh chất phấn hoa được chiết bằng dung dịch caca hoặc phenol 1ml dung dịch chiết tách (37,25mg/ml) trộn với 1ml tá chất Freund chia thành 4 phần tiêm vào 4 gan bàn chân. Mỗi tuần tiêm 2 lần, trong 3 tuần.

- Protein kết hợp. Thí dụ: picryl clorua - gamma globulin bò; P - sulfanilic - gamma globulin bò; 2,4 dinitrophenylalbumin bò... Có nhiều phương pháp gắn các chất có trọng lượng phân tử thấp (các hapten) lên một chất có trọng lượng phân tử cao mà chủ yếu lên protein. 10 mg picryl clorua - gamma globulin bò được trộn với tá chất Freund tiêm dưới da ở vùng gáy. 7 ngày sau tiêm nhắc lại. Sau đó 1 tuần thì tiêm tiếp 3 tuần mỗi tuần 2 lần, mỗi lần 2mg picryl clorua - gamma globulin bò không có tá chất.

(3) Gây miễn cảm chuột lang.

Tiêm một lần 10 - 20 mg kháng nguyên (albumin lòng trắng trứng, gamma globulin...) trong 1ml nước muối sinh lý + 1ml tá chất Freund. Chia đều làm 2, tiêm dưới da hoặc tiêm bắp. Sau 4 tuần lấy máu.

Có thể tiêm 3 tuần liên, mỗi tuần một lần tiêm bắp 1ml (gồm 2 - 2,5mg kháng nguyên + tá chất Freund). Một tuần sau lần tiêm cuối cùng thì lấy máu.

Nếu mẫn cảm chuột lang bằng protein kết hợp thì tiến hành như sau: 2mg picryl clorua - gamma globulin bò với tá chất Freund tiêm dưới da ở gan bàn chân sau. 17 ngày sau tiêm lại một lần với 3 mg picryl clorua - gamma globulin + tá chất vào dưới da vùng gáy. Sau 8 ngày lấy máu.

(4) Gây mẫn cảm chuột cống trắng.

1mg kháng nguyên trong 0,1ml nước muối sinh lý + 0,1 ml hỗn hợp trên (0,5 mg kháng nguyên). Khoảng 19 - 20 ngày sau lấy máu kiểm tra hiệu giá kháng thể.

2.3. Mẫn cảm phối hợp

Là phương pháp phối hợp cách sử dụng tá chất trong quá trình gây mẫn cảm cho động vật. Một quá trình mẫn cảm gồm nhiều lần tiêm cách nhau, do đó một vài lần tiêm sử dụng hỗn hợp kháng nguyên - tá chất Freund, một số lần tiêm sử dụng hỗn hợp kháng nguyên - alumin hydroxyd, một số lần tiêm chỉ sử dụng dung dịch kháng nguyên đơn thuần.

Phương pháp mẫn cảm phối hợp có thể dùng đối với các kháng nguyên như collagen gelatin, hoặc kháng nguyên tổ chức: tổ chức não, thượng thận, gan, dạ dày, ruột...

2.3.1. Mô hình mẫn cảm phối hợp (theo Steffen, 1968)

Thí dụ mẫn cảm cho thỏ điều chế kháng huyết thanh đa giá.

Tuần thứ nhất, tiêm dưới da vùng gáy: 10 mg protein + tá chất Freund.

Tuần thứ hai, tiêm nhắc lại một lần như tuần thứ nhất.

Sau đó một tuần, tiêm tiếp 4 tuần với hỗn hợp protein - alumin hydroxyd. Tiến hành như sau (tiêm tĩnh mạch):

Bảng 5.4: Mô hình mẫn cảm theo Steffen

Tuần lễ	Số lần tiêm	Liều lượng mỗi lần tiêm
Tuần 1	3	1,5mg
Tuần 2	3	2,0mg
Tuần 3	3	2,5mg
Tuần 4	3	3,0mg

Tám ngày sau lần tiêm cuối cùng thì lấy máu thử hiệu giá kháng thể.

2.3.2. Mô hình mẫn cảm phối hợp.

Sau đây giới thiệu một vài mô hình mẫn cảm phối hợp đã có kết quả tốt.

a. Điều chế kháng huyết thanh đa giá (huyết thanh thỏ chống protein huyết thanh người).

Nguyên liệu, dụng cụ:

- Cốc có mỏ, bơm tiêm, kim tiêm cõi chày sứ.
- Huyết thanh người bình thường (5 - 10 mẫu huyết thanh người cho máu bình thường, trộn đều) không dung huyết.
- Tá chất.

Nếu không có tá chất Freund ngoại, có thể tự điều chế tá chất với các nguyên liệu sẵn có như sau:

- Dầu paraffin tinh khiết: 6 ml
- Lanolin: 2 g
- BCG chết 30 mg

Đầu tiên cho lanolin với dầu paraffin vào cõi chày sứ nghiền cho thật đều và nhuyễn, sau đó cho BCG chết vào, lại nghiền tiếp cho đến khi có được một hỗn dịch keo tốt.

Điều chế hỗn hợp kháng nguyên (KN)- tá chất:

- Dung dịch kháng nguyên (huyết thanh người bình thường pha loãng với NaCl 0,9% theo tỷ lệ 1: 1): 1 thể tích.
- Hỗn dịch tá chất (ở trên): 1 thể tích dùng bơm tiêm với kim tiêm to hoặc cõi chày sứ để điều chế nhũ dịch (xem ở trên).

Tiến hành miễn cảm:

Bảng 5.5: Mô hình miễn cảm phối hợp

Tuần lễ	Dịch tiêm	Liều lượng	Cách tiêm
Thứ nhất	Hỗn hợp KN - tá chất	1,5ml	Màng bụng
Thứ hai	Hỗn hợp KN - tá chất	1,5ml	Màng bụng
Thứ ba	Dung dịch KN pha loãng 1: 1	1ml	Tiêm bắp
Thứ tư	Nghỉ, không tiêm		
Thứ năm	Dung dịch KN pha loãng 1: 1	1ml	Tĩnh mạch

7 - 8 ngày sau lấy máu thử hiệu giá kháng thể. Nếu hiệu giá còn thấp thì tiêm lại một lần: 1ml dung dịch kháng nguyên pha loãng (0,5ml huyết thanh + 0,5ml NaCl 0,9%) tiêm bắp hoặc tĩnh mạch; 7 - 8 ngày sau lấy máu thử.

Để tránh tình trạng sốc bởi lần tiêm tĩnh mạch, cần sử dụng huyết thanh tươi, không vỡ hồng cầu, không có lipid, đồng thời dụng cụ phải vô trùng và tiêm chậm.

Như đã trình bày ở trên, mỗi một động vật, mỗi một chủng loại đều có sự đáp ứng miễn dịch khác nhau. Vì vậy cần gây miễn cảm, một đợt cho nhiều thỏ, ít ra là 4 - 5 con. Qua kinh nghiệm, có thỏ thì cho phản ứng tốt với albumin (đường tủa albumin đậm rõ) nhưng có thỏ lại cho phản ứng tốt với các protein khác của huyết thanh như IgG hoặc IgA, hoặc haptoglobin... Nếu để riêng huyết thanh từng thỏ thì không được một huyết thanh đa giá tốt mong muốn, nhưng nếu trộn lại với nhau thì sẽ được một huyết thanh đa giá tốt, phản ứng tủa đậm rõ với trên 30 thành phần protein huyết thanh người (kháng nguyên).

b. Điều chế kháng huyết thanh đơn giá.

Điều chế kháng huyết thanh đơn giá như: huyết thanh thỏ kháng IgG, kháng IgA, kháng IgM, kháng alpha - foetoprotein (AFP)... Dưới đây là mô hình điều chế huyết thanh thỏ kháng IgG của người.

IgG trong huyết thanh người được chiết tách bằng phương pháp sắc ký cột qua DEAE Sephadex A₅₀. Dung dịch IgG có nồng độ 3mg/ml.

Điều chế hỗn dịch kháng nguyên - tá chất:

- Dung dịch IgG (3mg/ml): 1 thể tích
- Tá chất Freund: 1 thể tích

Bảng 5.6: Mô hình miễn cảm phối hợp

Tuần lễ	Dịch tiêm	Liều lượng	Cách tiêm
Thứ nhất	Hỗn hợp KN	2ml	Màng bụng
Thứ hai	Hỗn hợp KN	2ml	Màng bụng
Thứ ba	Dung dịch IgG (3mg/ml)	1,5ml	Tiêm bắp
Thứ tư	Nghỉ		
Thứ năm	Dung dịch IgG	1,5ml	Tĩnh mạch

7 - 8 ngày sau lấy máu thử hiệu giá kháng thể. Nếu hiệu giá chưa cao thì tiếp tục tiêm một lần nữa: 1,5ml dung dịch kháng nguyên tiêm bắp hoặc tĩnh mạch. Sau đó 7 - 8 ngày lấy máu thử lại.

2.4. Kỹ thuật lấy máu và tách huyết thanh

2.4.1. Lấy máu kiểm tra hiệu giá kháng thể

Có thể lấy máu tĩnh mạch hoặc động mạch để kiểm tra hiệu giá kháng thể. Kỹ thuật và vị trí lấy máu tĩnh mạch đối với từng loại động vật như phần tiêm tĩnh mạch ở trên. Chú ý: ống nghiệm và bơm tiêm phải sạch, khô và vô trùng. Mỗi lần thử cần lấy 0,5 - 1ml máu tùy loại động vật. Sau khi lấy máu, cần nắm ống nghiệm trong tay khoảng 15 phút rồi để ở nhiệt độ phòng từ 30 phút đến 1 giờ để cục máu co tốt; có thể để ở tủ lạnh + 4°C khoảng 20 phút. Ly tâm tách lấy huyết thanh dùng để thử hiệu giá kháng thể.

2.4.2. Kỹ thuật kiểm tra hiệu giá kháng thể

Kiểm tra hiệu giá kháng thể bằng kỹ thuật khuếch tán Ouchterlony và điện di miễn dịch. Xem phần kỹ thuật kết tủa.

2.4.3. Lấy máu và huyết thanh toàn bộ

Sau khi kiểm tra thấy hiệu giá kháng thể đã đạt thì giết động vật, lấy máu toàn bộ.

Dụng cụ cần: dao kéo mổ và ống ly tâm to.

Cố định thỏ trên bàn mổ với tư thế nằm ngửa. Làm vệ sinh vùng cổ: cắt lông, sát trùng. Bộc lộ mạch cảnh và luồn một ống thông vào động mạch cảnh để lấy máu.

Cho máu chảy vào ống ly tâm to. Cho chảy từ từ và khi máu chảy gần hết thì dốc ngược thỏ để lấy được tối đa.

Để các ống máu vào tủ ấm 37°C khoảng 15 phút, sau đó để vào tủ lạnh 4°C khoảng 30 phút đến 1 giờ. Tách cục huyết khối thành ống thủy tinh bằng que thủy tinh ly tâm lấy huyết thanh (3000 vòng/ phút trong 15 phút). Dùng ống hút Pasteur để hút huyết thanh sang các ống hoặc chai thủy tinh vô trùng.

2.5. Tinh khiết kháng huyết thanh

Đối với các kháng huyết thanh đơn đặc hiệu, cần có độ tinh khiết kháng thể cao. Có thể tiến hành hấp phụ miễn dịch để loại trừ các kháng thể tạp (xem kỹ thuật miễn dịch hấp thụ).

2.6. Bảo quản kháng huyết thanh miễn dịch

Hiệu giá kháng thể của huyết thanh giảm nhanh nếu không được bảo quản ở điều kiện lạnh hoặc nếu làm tan ra đông lại nhiều lần trong quá trình sử dụng.

Do đó cần phải chia huyết thanh thành nhiều ống nhỏ, vô trùng, mỗi ống 1 - 2ml để bảo quản và hàng ngày lấy ra một lượng đủ dùng. Ngoài lọ phải có nhãn ghi ngày lấy và loại kháng huyết thanh hiệu giá tối ưu, thể tích.

Tùy theo điều kiện cho phép có thể bảo quản theo hai cách dưới đây:

2.6.1. Bảo quản dưới dạng lỏng

Sau khi chia huyết thanh vào các ống nhỏ thì bảo quản ở độ lạnh -20°C . Hàng ngày lấy ra sử dụng nếu không hết thì để vào tủ lạnh $+4^{\circ}\text{C}$ và sử dụng cho 4 - 5 ngày sau.

2.6.2. Bảo quản dưới dạng đông khô

Đông khô là hình thức tốt nhất để bảo quản huyết thanh. Có thể đông khô ít một bằng tuyết carbonic kết hợp với hút chân không.

Có thể đông khô bằng nitơ lỏng. Tiện lợi nhất là dùng máy đông khô hiện đại.

Sau khi đông khô cũng bảo quản ở điều kiện lạnh, hiệu giá kháng thể giữ được 1 - 2 năm sau. Trước khi sử dụng, hoà khối lượng đông khô với một lượng nước muối sinh lý bằng thể tích huyết thanh trước khi đông khô.

Để chống sự phát triển của vi khuẩn, dù dạng lỏng hay dạng đông khô thì trước khi bảo quản cần cho thêm vào huyết thanh một lượng 0,5% phenol hoặc 0,01% methiolat, hoặc 0,02% Na - azit hoặc hỗn hợp 0,25% phenol + 0,005% methiolat (nếu không dùng để định lượng các protein có tính chất men).

KỸ THUẬT PHÂN LẬP TẾ BÀO MIỄN DỊCH

Muốn nghiên cứu đặc điểm các tế bào miễn dịch thì trước hết phải tách được các tế bào này ra khỏi hỗn hợp gồm nhiều tế bào máu khác. Thí dụ muốn có lympho tinh khiết từ máu thì phải tách được lympho ra khỏi hỗn hợp các tế bào hồng cầu, tiểu cầu, bạch cầu đa nhân và đại thực bào. Chỉ khi có hỗn dịch tế bào tinh khiết mới có thể nghiên cứu các đặc điểm của chúng. Cho nên phân lập các dòng tế bào là một kỹ thuật không thể thiếu được khi nghiên cứu các phản ứng miễn dịch tế bào cũng như các đặc điểm khác của tế bào miễn dịch. Kỹ thuật phân lập tế bào đã có từ lâu, ngày càng được cải tiến và hoàn thiện, do đó có nhiều loại kỹ thuật khác nhau. Trong phạm vi này, chúng tôi giới thiệu hai loại kỹ thuật: phân lập lympho và phân lập đại thực bào, chủ yếu là các tế bào miễn dịch của người để phục vụ cho việc nghiên cứu các kỹ thuật tế bào.

Kỹ thuật phân lập lympho bao gồm:

- Phân lập lympho từ máu.
- Phân lập lympho từ hạch, lách và các tổ chức lympho khác.

Kỹ thuật phân lập đại thực bào gồm:

- Phân lập đại thực bào từ máu.
- Phân lập đại thực bào từ các cơ quan khác: ổ bụng, các xoang, phổi...

1. Phân lập lympho

1.1. Phân lập lympho từ máu

Có nhiều cách phân lập lympho từ máu như: phân lập bằng dung dịch dextran, phân lập bằng gelatin, phân lập bằng ficoll. Ở đây, chúng tôi giới thiệu phương pháp phân lập lympho thông dụng nhất từ máu là phương pháp phân lập lympho bằng ficoll, còn các phương pháp khác chỉ nêu nguyên lý chung.

1.1.1. Phân lập lympho bằng dung dịch dextran

Nguyên lý: dùng dextran trọng lượng phân tử lớn, các phân dextran sẽ gắn vào bề mặt hồng cầu, nhưng không gắn vào các tế bào máu khác. Sự liên kết này sẽ làm cho hồng cầu nặng thêm, do đó khi lắng tự nhiên, hồng cầu sẽ lắng nhanh hơn các tế bào máu khác. Lắng nhanh nhất là các hồng cầu, rồi đến bạch cầu đa nhân, sau cùng là lympho. Sau thời gian để lắng, ở 2/3 trên khối nước mặt có tới trên 80% là lympho.

1.1.2. Phân lập lympho bằng dung dịch gelatin 3%

Nguyên lý: Giống như dextran, gelatin cũng bám vào hồng cầu làm tăng trọng lượng của hồng cầu, do đó khi để lắng, hồng cầu sẽ lắng nhanh hơn các tế bào khác. Gelatin còn có ưu điểm là làm hồng cầu lắng nhanh hơn và lắng nhiều hơn, nên số hồng cầu còn sót ít hơn.

Thường dùng gelatin 3% trong dung dịch Hanks. Dung dịch này được hấp cách thủy cho gelatin tan hoàn toàn. Nếu cần vô trùng thì phải lọc qua màng lọc 0,45 milimicron, sau đó để ở tủ ấm 37°C để cho nhiệt độ của dung dịch trở về 37°C. Đồng thời máu đã chống đông cũng để ở tủ ấm 37°C. Để tránh chờ đợi lâu, người ta thường chuẩn bị dung dịch gelatin từ chiều hôm trước, liên tục để tủ ấm 37°C đến hôm sau sử dụng.

1.1.3. Phân lập lympho bằng dung dịch ficoll (Hình 5.2)

Dùng ficoll (Pharmacia) trọng lượng phân tử 400.000 trong dung dịch uromiro, dung dịch này có tỷ trọng xác định; với tỷ trọng đó; khi ly tâm, các lympho không thể lắng xuống đáy qua lớp ficoll, do đó tập trung lại ở bề mặt tiếp xúc giữa dung dịch ficoll và huyết tương. Riêng hồng cầu và bạch cầu đa nhân lắng xuống đáy. Phương pháp này còn gọi là ly tâm phân lớp theo tỷ trọng.

- Nguyên liệu

- Ống ly tâm cỡ 10 x 75 mm, pipette Pasteur đầu nhọn.
- Pha dung dịch ficoll: ficoll (400.000) 9,6 g + uromiro 0,75% 20 ml (1 ống) + nước cất 130 ml. Hiện nay, có nhiều loại ficoll bán sẵn trên thị trường, không cần pha chế.

Đánh cho tan đều, bảo quản ở nhiệt độ 4°C có thể dùng 2 - 3 tháng.

- Dung dịch Hanks pH 7,4 để rửa tế bào.
- Máy ly tâm lạnh 4°C.
- Kính hiển vi và buồng đếm tế bào bạch cầu.

- Tiến hành

- 2 ml máu chống đông bằng heparin, lắc đều, có thể pha loãng thêm với một khối 2 ml dung dịch Hanks.

- Dùng pipette chia độ hút 2 ml máu rồi nhẹ nhàng đưa vào ống nghiệm đã có sẵn 1 ml dung dịch ficoll, cho máu chảy từ từ vào theo thành ống nghiệm xuống tiếp xúc với bề mặt của dung dịch ficoll, tạo thành hai khối rõ rệt: ficoll ở dưới, máu ở lớp trên.

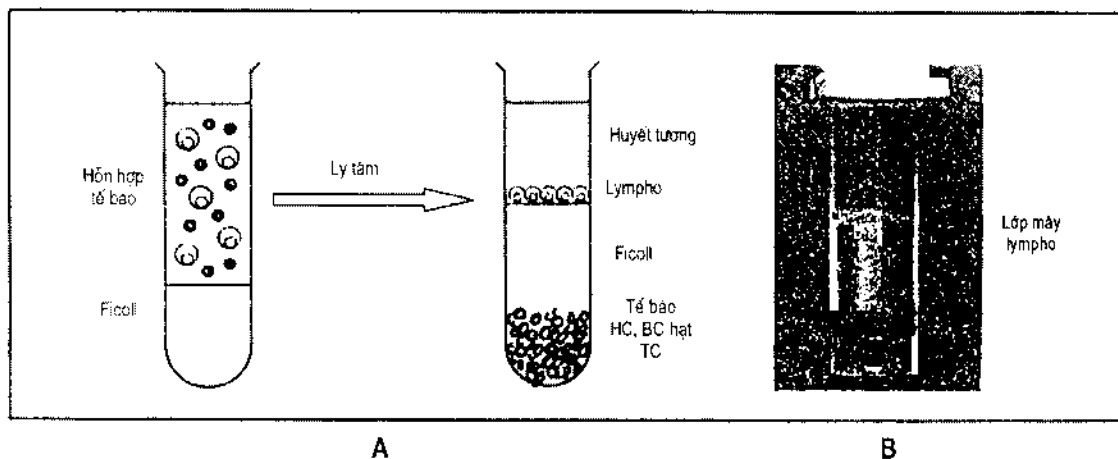
- Nhẹ nhàng đưa vào máy ly tâm 1200 vòng / 20 phút ở nhiệt độ 4°C.

Lấy ra quan sát bằng mắt thường sẽ thấy 4 lớp rõ rệt: dưới cùng là hồng cầu, có bạch cầu đa nhân, tiếp theo là khối ficoll, trên bề mặt ficoll là một lớp mỏng tế bào màu trắng nhạt và trên cùng là huyết tương. Còn gọi là lớp "mây" tế bào (Hình 5.2).

- Dùng pipette Pasteur nhẹ nhàng hút lấy lớp "mây" tế bào, chuyển sang ống nghiệm khác.

- Rửa tế bào bằng dung dịch Hanks. Đổ đầy ống nghiệm bằng dung dịch Hanks, dùng pipette Pasteur thuần nhất huyền dịch tế bào, ly tâm 1500 vòng trong 10 phút, rửa ba lần như vậy ở nhiệt độ 4°C.

- Pha thành huyền dịch tế bào trong dung dịch Hanks.
- Xác định số lượng tế bào, tỷ lệ tế bào sống bằng dung dịch Hanks.



Hình 5.2: Tách lympho bằng kỹ thuật ly tâm phân lớp với Ficoll

A: Mô hình về nguyên lý của kỹ thuật

B: Ảnh sau ly tâm tách lympho tạo thành lớp màng trong ống ly tâm.
Thu hoạch lớp "mây" này có lympho chiếm > 95%

Kỹ thuật này cho huyền dịch tế bào trên 90% là lympho, 2 - 5% là bạch cầu đa nhân và 5% là hồng cầu. Tỷ lệ sống của tế bào là trên 95%.

Áp dụng: Huyền dịch tế bào lympho này khá tinh khiết nên có thể dùng cho các kỹ thuật sau:

- Tạo hoa hồng T và B.
- Nuôi cấy, chuyển dạng lympho in vitro.
- Làm độc tế bào lympho.

Kỹ thuật này tiết kiệm được máu vì tế bào lympho không bị mất nhiều.

1.1.4. Chuẩn bị huyền dịch tế bào lympho hoàn toàn tinh khiết (không có bạch cầu đa nhân, hồng cầu và tiểu cầu).

• **Nguyên liệu**

- Ống nghiệm 10 x 75 mm. Pipette Pasteur, pipette chia độ.
- Bơm tiêm loại 20 ml ,
- Bông nylon, bông thuỷ tinh (nếu không có cả hai thứ thì có thể dùng bông thấm nước xé sợi).
- Dung dịch ficoll.
- Huyết thanh kháng ABH.
- Dung dịch Hanks.

• **Tiến hành:** Có hai cách làm: có thể làm ngưng kết hồng cầu bằng huyết thanh kháng ABH hoặc để lắng tự nhiên với dextran như trên, rồi ly tâm với ficoll.

(1) Dùng phản ứng ngưng kết hồng cầu bằng huyết thanh kháng ABH:

- Lấy 2 ml máu chống đông cho vào ống nghiệm nhỏ (0,5 x 6cm) mỗi ống 1 ml.

- Ly tâm 3500 vòng trong 5 phút, lấy nước mặt chuyển sang ống nghiệm khác có 0,3 ml huyết thanh kháng AB, hoặc kháng H (tùy thuộc vào nhóm máu).
- Cặn ngưng kết được loại bỏ bằng cách ly tâm 1000 vòng trong 10 giây.
- Lấy nước mặt chuyển sang ống nghiệm khác có 0,3 ml ficoll.
- Ly tâm 3000 vòng/3 phút, tất cả bạch cầu đa nhân và đám hồng cầu ngưng kết sẽ lắng xuống đáy, tiểu cầu nằm trong nước mặt có kháng ABH, còn tế bào lympho nằm ở bề mặt trên lớp ficoll. Tế bào lympho được lấy ra bằng pipette Pasteur và chuyển sang ống nghiệm khác có dung dịch Hanks, trộn đều bằng pipette Pasteur.
- Ly tâm tiếp 1000 vòng trong 1 phút, loại bỏ nước mặt, trong đó có tiểu cầu. Còn cặn lympho tinh khiết được chuyển sang ống nghiệm khác, rửa tiếp một lần nữa bằng dung dịch Hanks.
- Cặn tế bào được hoà tan trong dung dịch Hanks, đếm số lượng tế bào, đánh giá tỷ lệ sống chết bằng dung dịch xanh trypan.

(2) Dùng bông nylon

Bước 1: Loại bỏ sơ bộ hồng cầu bằng dung dịch dextran.

Bước 2: Loại bỏ bạch cầu đa nhân. Sau khi đã làm lắng hồng cầu bằng dextran, lấy toàn bộ nước mặt. Chuyển nước mặt vào bơm tiêm nhựa 20 ml có sẵn bông đã xé sợi (dùng 600 mg bông sợi cho vào 20 ml huyền dịch bạch cầu). Huyền dịch thấm đều vào bông. Bơm tiêm được để đứng ở tủ ấm 37°C trong 30 phút. Trong thời gian này, bạch cầu đa nhân bám vào bông, sau đó dùng dung dịch Hanks rửa lớp bông cho tế bào lympho (tế bào không bám vào bông) theo dung dịch chảy xuống, cuối cùng dùng lõi bơm tiêm ép cho sạch nước. Nước chảy xuống có chứa tế bào lympho và hồng cầu, còn bạch cầu đa nhân được giữ lại ở lớp bông.

Bước 3: loại bỏ hoàn toàn hồng cầu: Huyền dịch tế bào lympho còn lẫn hồng cầu được phân lập tiếp tục bằng cách ly tâm với dung dịch ficoll . 2 ml huyền dịch tế bào được ly tâm với 1 ml ficoll. Hồng cầu sẽ lắng hoàn toàn xuống đáy ống, tế bào lympho dừng lại ở bề mặt tiếp xúc giữa ficoll và dịch chứa tế bào. Tế bào lympho được lấy ra bằng pipette Pasteur, rửa lại ba lần bằng dung dịch Hanks. Đếm số lượng tế bào, xác định tỷ lệ sống chết bằng xanh trypan 2%. Chuẩn bị huyền dịch tế bào theo yêu cầu của thí nghiệm.

Áp dụng: Tế bào lympho tách bằng phương pháp này rất tinh khiết, gần 100% tế bào là lympho, không có bạch cầu đa nhân và hồng cầu, tiểu cầu. Thường chỉ áp dụng cho các kỹ thuật sau đây:

- Độc tế bào, đặc biệt là độc tế bào trong phát hiện kháng nguyên HLA.
- Nuôi cấy tế bào lympho hỗn hợp.

Phương pháp này có nhược điểm là tổn máu vì tách qua nhiều bước nên tế bào bị mất nhiều.

1.2. Phân lập lympho từ ống ngực

Các tế bào lấy từ ống ngực có chủ yếu là lympho bào, các tế bào khác như bạch cầu đa nhân và hồng cầu chiếm tỷ lệ rất ít. Người ta thấy rằng có tới 90% các

lympho ở ống ngực có đường kính của các lympho nhỏ là 8 μm , một vài phần trăm là các lympho bào như khi phân lập từ máu. Có thể làm như sau:

- Bộc lộ ống ngực, dùng bơm tiêm vô trùng hút dịch bạch huyết (còn gọi là kỹ thuật dẫn lưu ống ngực).

- Bảo quản dịch bạch huyết trong một bình nhỏ có sẵn dung dịch bảo quản. Dung dịch bảo quản gồm dung dịch Parker, heparin 20 đơn vị/ml, penicillin 50 đơn vị/ml, streptomycin 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Với dung dịch này, tế bào có thể sống 12 giờ ở nhiệt độ 4°C, sau đó thì lượng tế bào chết sẽ tăng lên. Cũng có thể bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong dung dịch nuôi cấy có 0,5% đường, 10% huyết thanh cùng loại, có kháng sinh, độ đậm đặc của tế bào từ 10 - 100 x 10⁶ tế bào trong 1 ml dung dịch nuôi. Trong trường hợp này, tế bào có thể sống trên 24 giờ với tỷ lệ tế bào sống trên 80%.

1.3. Phân lập lympho từ hạch

Có thể lấy hạch ở người (hạch Hodgkin, hạch lympho - sarcom) hoặc hạch của súc vật (thường nhất là hạch bẹn, hạch cổ của chuột, v.v...). Tiến hành như sau:

- (1) Hạch lấy ra được bảo quản ngay trong dung dịch Parker có huyết thanh cùng loại 10% và kháng sinh.

- (2) Cắt lọc các tổ chức xơ, mỡ (nếu có).

- (3) Rửa lại vài lần bằng dung dịch Parker.

- (4) Dùng kéo nhỏ, sắc, cắt thành mảnh nhỏ, kích thước 5 x 5 mm. Nếu hạch chuột thì chỉ cần cắt đôi. Từ bước này có hai cách làm: tách lympho bào ra khỏi hạch bằng dung dịch trypsin, hoặc nghiền hạch qua lưới lọc.

Phân lập bằng dung dịch trypsin 0,25%. Tổ chức hạch được tiêu bằng dung dịch trypsin có khuấy từ, mỗi lần khuấy khoảng 10 - 15 phút, ở nhiệt độ 37°C. Khuấy như vậy 3 - 4 lần, mỗi lần khuấy xong, gạn lấy nước, nước này có tế bào, ngay lập tức phải bảo quản ở 4°C để ức chế tác dụng của trypsin. Cách làm này có nhược điểm là trypsin làm giải phóng ADN và nucleoprotein. Các thành phần này bám vào bề mặt tế bào, làm ảnh hưởng đến hoạt động bình thường của các cảm thụ quan bề mặt tế bào. Sau cùng, phải rửa tế bào 3 lần bằng dung dịch Hanks để loại bỏ trypsin.

Phân lập tế bào từ hạch bằng cách nghiền tổ chức hạch. Các mảnh tổ chức của hạch được nghiền nhẹ nhàng qua lưới lọc tế bào bằng que thủy tinh. Vừa nghiền vừa xối nước cho tế bào đã tách ra được tự do theo nước, qua màng lọc xuống bình chứa ở dưới. Sau khi nghiền, tế bào được rửa lại hai lần bằng dung dịch Hanks. Bằng cách này, tỷ lệ tế bào chết cũng vào khoảng từ 5 - 10%.

1.4. Phân lập lympho từ lách

Lấy lách: Thường lấy lách từ súc vật thí nghiệm, hoặc có thể từ bệnh nhân qua phẫu thuật. Tổ chức lách được bảo quản trong dung dịch Parker có heparin (10 đơn vị/ml), để ở nhiệt độ 4°C.

- Tách tế bào ra khỏi tổ chức lách: tiến hành như đã mô tả ở phần trên (phân lập tế bào từ hạch).
- Loại bỏ sơ bộ tế bào hồng cầu: hồng cầu được làm lắng sơ bộ bằng dung dịch dextran 6% hoặc gelatin 3% (xem phần phân lập lympho từ máu).
- Loại bỏ hoàn toàn bạch cầu đa nhân và hồng cầu bằng cách ly tâm với dung dịch ficoll. Nước mặt sau khi làm lắng hồng cầu ở bước trên được ly tâm với dung dịch ficoll (xem phần phân lập lympho từ máu).
- Rửa sạch tế bào 3 lần bằng dung dịch Hanks, mỗi lần rửa ly tâm 1200 vòng trong 10 phút ở nhiệt độ 4°C.
- Đếm số lượng lympho, xác định tỷ lệ sống và chết của tế bào bằng dung dịch xanh trypan.
- Pha thành huyền dịch tế bào có đậm đặc theo yêu cầu thí nghiệm.

1.5. Tách lympho từ amidan

Giống như tách từ tuyến ức, nhưng cần chú ý hai điểm:

- Rửa sạch tuyến bằng NaCl 0,9% vì có lẫn máu trong quá trình phẫu thuật.
- Sau khi rửa sạch hồng cầu, cần mở rộng hạch, rửa các ổ mủ bên trong, nếu là viêm amidan. Dung dịch rửa này cần có kháng sinh, như penicillin 60 đơn vị, streptomycin 60 µg/ml.

1.6. Tách lympho từ dịch xuất tiết ở ổ phúc mạc

Nước xuất tiết ở ổ bụng thông thường có thể có ba loại tế bào: đại thực bào, lympho bào, ít hồng cầu.

Phân lập tế bào lympho cũng như đại thực bào trong nước xuất tiết của ổ bụng được áp dụng cho các nghiên cứu về quá trình miễn dịch học hoặc quá mẫn.

1.6.1. Lấy nước xuất tiết

- Chọc dò ổ bụng, hoặc nếu là súc vật thí nghiệm thì giết chết rồi rửa ổ bụng bằng dung dịch Parker.
- Dung dịch chứa nước xuất tiết là dung dịch Parker có 1% huyết thanh bê, có heparin chống đông (mỗi đơn vị heparin cho 1 ml). Dịch tế bào lấy ra được bảo quản ở nhiệt độ lạnh, tốt nhất là đặt liên tục trong chậu nước đá.

1.6.2. Ly tâm phân lớp theo tỷ trọng

Trong ống nghiệm 20 ml, có sẵn 5 ml dung dịch ficoll, dùng pipette Pasteur nhỏ từ từ hỗn dịch tế bào vào lớp ficoll (như đã mô tả) ly tâm nhẹ 1200 vòng trong 30 phút ở 4°C. Các đại thực bào và hồng cầu sẽ lắng xuống, còn tế bào lympho nằm ở vùng giữa ficoll và dung dịch chứa tế bào nguyên uỷ. Dùng pipette Pasteur lấy lớp tế bào này ra, rửa hai lần bằng dung dịch Hanks.

Chú ý: Nếu dịch tế bào xuất tiết quá nhiều và loãng thì có thể cô đặc lại bằng cách ly tâm 1500 vòng trong 10 phút, loại bớt nước mặt rồi thuần nhất. Dịch đặc này sẽ được ly tâm với ficoll. Làm như vậy đỡ tốn ficoll mà vẫn không ảnh hưởng đến kết quả.

Phân lập bằng cách này có thể cùng một lúc được hai loại tế bào tinh khiết: đại thực bào nằm ở phần cận, lympho bào nằm ở phần giữa.

2. Phân lập cách dưới nhóm lympho (T và B lympho) từ hỗn hợp tế bào lympho

2.1. Phân lập B lympho

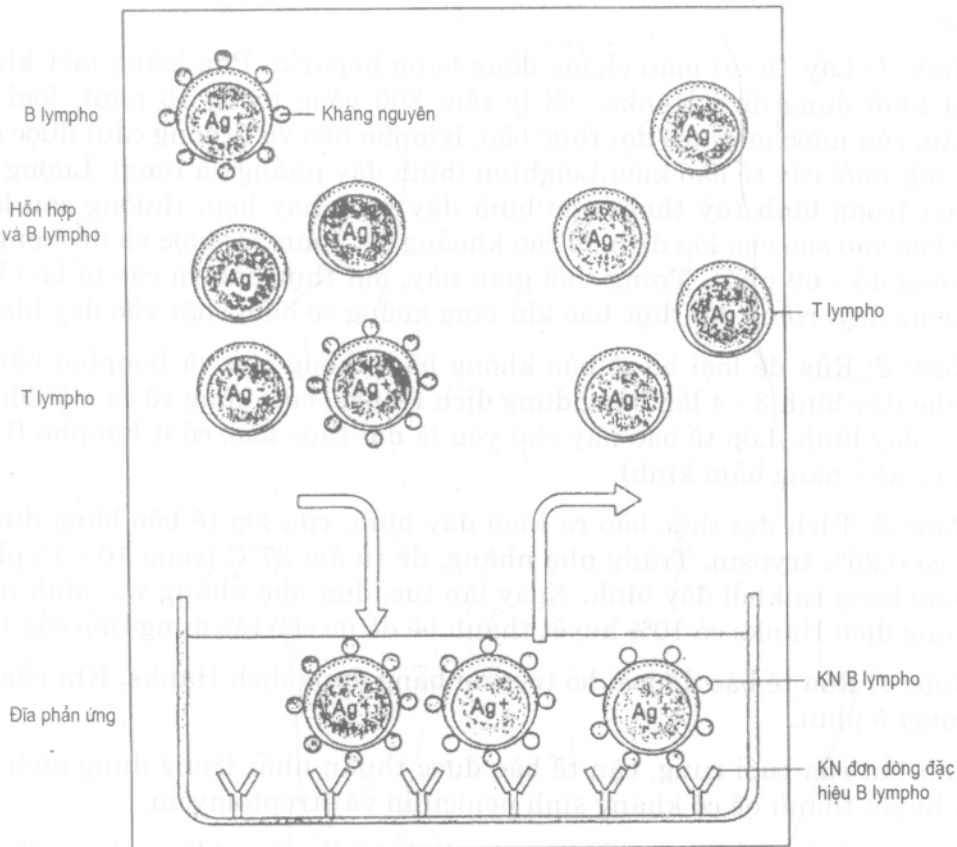
Chuẩn bị hỗn hợp tế bào lympho

- Chuẩn bị ống tế bào:
- + Mỗi ống cho phép xử lý khoảng 100×10^6 tế bào
- + Sử dụng các ống nhựa (kích thước: 19,5 cm x 0,6 cm) được cắt dài khoảng 12 – 14 cm và hàn đáy tạo góc nghiêng 45° .
- Nhúng 0,1 g sợi bông vào dung dịch Hanks.
- Đặt ống vào dung dịch Hanks và nhồi bông đều đặn vào lòng ống đến 5 cm, tránh bọt khí.
- Những ống này có thể để ở 4°C trong một đêm hoặc bảo quản ở -20°C , hai đầu ống được hàn lại.
- Cắt đầu ống để tháo dung dịch ra khỏi ống
- Rửa lại bằng 5 ml dung dịch Hanks, sau đó bằng 3 ml RPMI có 5% huyết thanh bào thai bê (SCF = serum calf fetal).
- Đặt ống thẳng đứng, để lại một chút môi trường ngập trên lớp sợi.
- Để ống ở 37° trong 30 phút trước khi cho tế bào vào.
- Phân lập lymphocyt B
- + Dung $50 - 100 \times 10^6$ lympho toàn phần pha trong 0,5 ml RPMI có 5% SCF (pha bằng pipette Pasteur có tráng silicon), cho hỗn dịch tế bào vào trong ống.
- + Đợi cho lớp tế bào thấm hết vào lớp sợi, thêm 0,2 ml môi trường vào bên trên lớp sợi, đặt ống thẳng đứng, ủ 30 phút ở 37°C .
- + Loại bỏ tế bào không kết dính (T lympho) bằng 5 ml dung dịch Hanks 37°C (để ống nghiêng trên một ống nghiệm loại 5 ml. Làm lại lần thứ hai.
- + Thu tế bào kết dính (B lympho) bằng cách thêm vào ống 1 ml dung dịch RPMI có 5% SCF và ép lớp sợi. Hỗn dịch thu được cho vào ống Fisher và rửa hai lần trong dung dịch Hanks bằng cách ly tâm 1000 g/1 phút.

2.2. Phân lập T lympho: có hai phương pháp

- Dùng kỹ thuật bông: có thể dùng bông thủy tinh, bông y tế, bông nilon, T lympho không dính vào bông, chúng sẽ được thu hoạch từ dung dịch rửa bông trong ống thí nghiệm như mô tả ở trên. Tế bào T được tập trung, cô đặc bằng cách ly tâm lắng cận tế bào. Còn có thể phân lập T lympho bằng phương pháp tạo E rosette với hồng cầu cừu.
- Dùng kỹ thuật kháng thể (KT) đơn dòng đặc hiệu B lympho: Kỹ thuật được tiến hành theo các bước sau đây:

- + Gắn KT vào đĩa phản ứng
- + Chuẩn bị hỗn hợp dịch tế bào lympho
- + Đưa hỗn hợp lympho có độ đậm đặc 5×10^6 tế bào vào đĩa phản ứng, ủ ấm $37^\circ\text{C}/30$ phút, các tế bào có kháng nguyên đặc hiệu sẽ gắn vào KT trên đĩa (Hình 5.3).
- + Rửa đĩa thí nghiệm bằng dung dịch Hanks, các tế bào không phản ứng với KT sẽ được thu hoạch qua dung dịch rửa (Hình 5.3).
- + Tập trung dung dịch rửa, ly tâm, cô đặc, cấy tế bào là T lympho (Hình 5.3)



Hình 5.3: Nguyên lý kỹ thuật phân lập T lympho bằng KT đơn dòng đặc hiệu B lympho

KT đặc hiệu B lympho gắn vào đĩa phản ứng, B lympho phản ứng với KT này bị giữ lại, còn lympho tự do sẽ thu được bằng cách rửa đĩa bằng dịch PBS.

3. Phân lập đại thực bào

Ta có thể có được đại thực bào tinh khiết bằng cách phân lập chúng từ máu, từ nước xuất tiết của các xoang như ổ bụng, xoang mũi, hoặc dịch tiết đường hô hấp.

Có thể tiến hành phân lập được cả ở người và súc vật thí nghiệm. Đại thực bào khó nuôi, khó giữ được lâu, bởi vì chúng không có khả năng nhân lên như

lympho bào. Nhưng nhiều thí nghiệm in vitro rất cần có huyền dịch đại thực bào tinh khiết như: trong nghiên cứu quan hệ giữa lympho và đại thực bào trong quá trình tạo kháng thể, nghiên cứu chỉ số thực bào đại thực bào đã được miễn dịch, nghiên cứu yếu tố ức chế di tản đại thực bào. Do đó phân lập đại thực bào là một kỹ thuật từ lâu đã được chú ý.

3.1. Phân lập đại thực bào từ máu

Trong máu, đại thực bào có rất ít nên phân lập cũng rất khó khăn. Dựa vào khả năng bám kính của đại thực bào, chúng ta có thể tiến hành theo các bước sau đây:

Bước 1: Lấy 10 ml máu chống đông bằng heparin. Pha loãng một khối máu với một khối dung dịch Hanks, rồi ly tâm 800 vòng trong 10 phút, loại bỏ cặn hồng cầu, còn nước mặt, (có đại thực bào, lympho bào và ít hồng cầu) được để lắng trong bình nuôi cấy tế bào kiểu Leighton (bình đáy phẳng và rộng). Lượng dịch tế bào chứa trong bình tùy thuộc vào bình đáy rộng hay hẹp, thường sau khi đưa dịch tế bào vào sao cho lớp dịch đó cao khoảng 2 - 3 mm là được và để trong tủ ấm 37°C trong 45 - 60 phút. Trong thời gian này, đại thực bào và các tế bào khác sẽ lắng xuống đáy, riêng đại thực bào khi lắng xuống sẽ bám chặt vào đáy bình.

Bước 2: Rửa để loại bỏ tế bào không bám (hồng cầu và lympho) bằng cách tráng nhẹ đáy bình 3 - 4 lần bằng dung dịch Hanks, cuối cùng sẽ có một lớp tế bào bám vào đáy bình. Lớp tế bào này chủ yếu là đại thực bào, có ít lympho B (tế bào B cũng có khả năng bám kính).

Bước 3: Tách đại thực bào ra khỏi đáy bình, rửa lớp tế bào bằng dung dịch Hanks có 0,25% trypsin. Tráng nhẹ nhàng, để tủ ấm 37°C trong 10 - 15 phút cho lớp tế bào bong ra khỏi đáy bình. Ngay lập tức, đưa nhẹ nhàng vào bình nuôi cấy bằng dung dịch Hanks có 10% huyết thanh bê để ức chế tác dụng tiếp của trypsin.

Bước 4: Rửa tế bào để loại bỏ trypsin bằng dung dịch Hanks. Khi rửa ly tâm 1200 vòng/ 5 phút.

Sau lần rửa cuối cùng, cặn tế bào được thuần nhất trong dung dịch Parker có 20% huyết thanh bê có kháng sinh penicillin và streptomycin.

Bước 5: Đếm số lượng tế bào, xác định tỷ lệ sống (dùng dung dịch xanh trypan 0,2%).

3.2. Phân lập đại thực bào từ chất tiết đường hô hấp

Dịch tiết ở đường hô hấp có một lượng lớn đại thực bào. Có thể lấy các đại thực bào từ dịch này bằng cách sau đây (thường làm trên súc vật).

Giết mổ, mổ lồng ngực, lấy toàn bộ phổi và khí quản. Khi phẫu tích, chú ý không để tổn thương đường hô hấp và làm chảy máu vào tổ chức phổi.

Dùng kẹp, kẹp một mép khí quản, nâng lên, dùng pipette Pasteur lấy dung dịch rửa bơm vào khí quản (khoảng 10 - 15 ml). Dung dịch rửa là dung dịch Hanks có heparin, cứ 1 ml dung dịch có một đơn vị heparin. Dùng pipette Pasteur hút lên rồi lại tia vào thành khí quản, làm như vậy 4 - 5 lần, rồi hút dịch rửa đưa

vào ống nghiệm lớn (20 ml), tiếp tục rửa lại như trên 2 - 3 lần. Dịch rửa ở mỗi lần được tập trung lại và ly tâm lấy cặn, trong cặn này có lẫn các dịch nhầy. Phá huỷ chất nhầy bằng cách cho tác dụng với dung dịch trypsin 0,25% có khuấy từ trong 15 phút ở nhiệt độ phòng.

Sau đó bổ sung vào dịch tế bào dung dịch Hanks để ức chế tác dụng của trypsin. Rửa tế bào hai lần bằng dung dịch Hanks. Khi rửa, ly tâm 1200 vòng/5 phút ở nhiệt độ 4°C.

Sau lần rửa cuối cùng, tế bào được hoà tan trong dung dịch Parker có 20% huyết thanh bê, có kháng sinh. Đếm số lượng tế bào, xác định tỷ lệ sống bằng dung dịch xanh trypan 0,2%.

Tách đại thực bào bằng cách này cũng nhận được một lượng lớn tế bào, và tỷ lệ sống có thể đạt trên 85%. Muốn có đại thực bào tinh khiết và loại bỏ tế bào chết, có thể tiếp tục để lắng trong bình nuôi cấy đáy rộng như đã mô tả.

KỸ THUẬT KẾT TỦA

1. Khái niệm cơ bản về kết tủa miễn dịch

Kết tủa miễn dịch là sản phẩm của phản ứng kháng nguyên - kháng thể. Nói một cách đúng hơn thì kết tủa miễn dịch là sản phẩm của một chuỗi phản ứng kế tiếp nhau giữa hai phân tử: giữa một kháng nguyên đa hoá trị và một kháng thể đa hoá trị hoặc ít nhất là hai hoá trị (kháng nguyên và kháng thể đều ở dạng hoà tan). Cũng như phản ứng tủa trong hoá học, để có kết tủa thì phải có chuỗi phản ứng xảy ra mà chuỗi phản ứng muốn xảy ra thì cần có một phản ứng liên kết mở màn ban đầu. tạo nên một phức hợp nhỏ ban đầu còn tan trong dung môi. Phức hợp ban đầu này làm nền để chuỗi phản ứng tiếp tục xảy ra và nhờ vậy đã tạo ra một phức hợp lớn không tan kiểu “mạng lưới”.

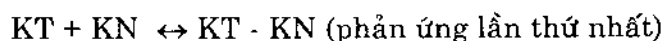
Trong phần này, chúng tôi trình bày một số điểm cơ bản về thuyết “mạng lưới” nhằm mục đích phục vụ cho các kỹ thuật của miễn dịch-huyết học về sau.

1.1. Thuyết mạng lưới trong phản ứng kháng nguyên - kháng thể

Thuyết “mạng lưới” hay là thuyết một giai đoạn, được Marrack giới thiệu lần đầu (1938) sau đó Pauling, Pressman, Camphel tiếp tục phát triển.

Khi trộn một dung dịch kháng nguyên với một dung dịch kháng thể (kháng huyết thanh) đặc hiệu thì: đầu tiên phân tử kháng nguyên tiếp xúc với phân tử kháng thể nhờ lực liên kết đặc hiệu, biểu lộ qua tính háo và ái lực của kháng thể.

Các nhóm quyết định trên hai phân tử kháng nguyên và kháng thể phản ứng liên kết với nhau nhờ các lực như lực tĩnh điện, lực Van der Waals, cầu liên kết hydro tạo nên phản ứng đầu tiên của quá trình tủa.



Phân tử kháng thể cũng như phân tử kháng nguyên trong phức hợp ban đầu này là loại đa hoá trị, cho nên còn có các hoá trị tự do, vì vậy phức hợp ban đầu này lại liên kết với phân tử kháng thể hoặc kháng nguyên tự do hoặc với một phức hợp ban đầu khác. Đó là chuỗi phản ứng lần thứ hai:

$KT - KN + KT \leftrightarrow KT - KN - KT$ hoặc

$KT - KN + KT - KN \leftrightarrow KT - KN - KT - KN$ (phản ứng lần thứ hai)

Chuỗi phản ứng liên kết lần ba cũng có thể xảy ra với một lượng lớn các phản ứng.

$KT - KN - KT - KN + KT \leftrightarrow KT - KN - KT - KN - KT$

$KT - KN - KT + KT - KN - KT \leftrightarrow KT - KN - KT$

$KT - KN - KT$

(phản ứng lần thứ ba) - theo Steffen (1968)

Chuỗi phản ứng lần thứ ba này xuất hiện trong trường hợp kháng thể thừa, nghĩa là khi có quá nhiều phân tử kháng thể thừa, tự do so với phân tử kháng nguyên.

Nếu nồng độ phân tử kháng nguyên và kháng thể tương đương nhau thì chỉ xảy ra phản ứng lần thứ nhất, rồi sau đó xảy ra phản ứng kiểu trùng hợp các phức hợp được tạo thành ở phản ứng lần thứ nhất.

Trong trường hợp kháng nguyên thừa thì khả năng liên kết ở phản ứng lần thứ hai kém hơn nhiều so với khi kháng thể thừa. Phức hợp được tạo thành dễ bị huỷ hoại vì các mối liên kết kém bền vững. Khi kháng nguyên quá thừa thì xuất hiện các phức hợp nhỏ hoà tan. Như vậy thuyết mạng lưới đã có một ứng dụng thực tiễn trong việc giải thích các phản ứng của cũng như phản ứng ngưng kết miễn dịch. Kháng thể có từ hai hoá trị trở lên mới có khả năng tạo được mạng lưới ngưng kết với kháng nguyên ; kháng thể một hoá trị (KT không hoàn toàn) không có khả năng tạo được mạng lưới ngưng kết với kháng nguyên, nghĩa là không tạo được phản ứng tủa và phản ứng ngưng kết miễn dịch.

1.2. Các đường biểu diễn kết tủa

1.2.1. Đường biểu diễn Heidelberger

Heidelberger và Kendal là những người đầu tiên nêu ra phản ứng kết tủa định lượng và đã đưa ra những khái niệm về động học của phản ứng kháng nguyên - kháng thể, tỷ lệ giữa kháng nguyên và kháng thể trong phức hợp miễn dịch cũng như về số nhóm quyết định của một phân tử kháng nguyên. Những hiểu biết về sự khác nhau trong quá trình phản ứng định lượng tủa có một ý nghĩa quan trọng về các hiện tượng bệnh lý miễn dịch, đặc biệt là quá mẫn nhanh.

Kháng thể có khả năng kết tủa với kháng nguyên gọi là kết tủa tố, hệ thống phản ứng liên kết kháng nguyên - kháng thể gọi là hệ thống kết tủa.

Kỹ thuật định lượng phản ứng kết tủa này bao gồm:

– Cho vào các ống nghiệm một nồng độ kháng thể xác định rồi cho vào đó lượng kháng nguyên tăng dần lên, phản ứng kháng nguyên - kháng thể sẽ xảy ra. Tủa được loại trừ bằng ly tâm rồi tiến hành xét nghiệm kháng nguyên tự do cũng như kháng thể tự do của dung dịch trong ở trên.

– Ở ống nghiệm thứ nhất, nồng độ kháng nguyên thấp, cho nên còn thấy kháng thể còn lại ở phần dung dịch trong. Do đó gọi là ống nghiệm có kháng thể thừa, trong lĩnh vực miễn dịch thì gọi là vùng kháng thể thừa.

– Ở các ống nghiệm tiếp theo, do tăng dần lượng kháng nguyên nên lượng kháng thể tự do của dung dịch trong ở trên liên tục giảm dần và đến một ống nghiệm mà ở đó kháng nguyên và kháng thể tương đương nhau, tất cả các kháng thể liên kết với các kháng nguyên làm cho dung dịch trong ở trên không còn kháng thể và kháng nguyên tự do, nghĩa là kết tủa hoàn toàn. Chính ở ống nghiệm này có lượng tủa lớn nhất, phức hợp tủa bền vững. Người ta gọi vùng này là vùng tương đương.

– Ở các ống nghiệm tiếp theo (sau ống tương đương) vẫn tiếp tục cho tăng dần lượng kháng nguyên lên thì thấy lượng tủa giảm xuống và phần dung dịch trong ở trên xuất hiện kháng nguyên tự do, được gọi là vùng kháng nguyên thừa. Ở đây nồng độ kháng thể không đủ để liên kết với tất cả kháng nguyên cho nên đã tạo nên các phức hợp nhỏ kháng nguyên - kháng thể hoà tan.

Từ các kết quả trên đây có thể biểu diễn trong một hệ thống tọa độ: trục hoành là nồng độ kháng nguyên tăng dần từ trái sang phải, trục tung là lượng tủa phát hiện. Đường biểu diễn này được gọi là đường biểu diễn tủa hay là đường biểu diễn Heidelberger.

Ngành lên của đường biểu diễn Heidelberger cho thấy lượng tủa tỷ lệ thuận với kháng nguyên. Đỉnh của đường biểu diễn là vùng tương đương kháng nguyên - kháng thể. Ngành xuống của đường biểu diễn là lượng tủa giảm dần với sự tăng nồng độ kháng nguyên vì xuất hiện phức hợp miễn dịch hoà tan.

1.2.2. Các loại đường biểu diễn kết tủa khác

Đường biểu diễn tủa khác nhau tùy theo nguồn gốc của huyết thanh miễn dịch và được xếp thành hai nhóm: nhóm kháng huyết thanh thỏ và nhóm kháng huyết thanh ngựa.

Trong nhóm kháng huyết thanh thỏ, hiện tượng ức chế kết tủa chỉ xảy ra ở vùng kháng nguyên thừa, còn ở vùng kháng thể thừa và vùng tương đương thì hiện tượng kết tủa xảy ra theo tỷ lệ thuận. Ngược lại, trong nhóm kháng huyết thanh ngựa, hiện tượng ức chế kết tủa không những chỉ xảy ra ở vùng kháng nguyên thừa mà ngay cả vùng kháng thể thừa. Qua đây cho thấy huyết thanh miễn dịch thuộc nhóm ngựa ít thích hợp cho hoá miễn dịch định lượng tủa. Trong khi sử dụng các loại huyết thanh miễn dịch đặc biệt, cần chú ý đến đặc điểm này và với mỗi loại cần tìm và sử dụng liều lượng tối ưu trong khu vực tương đương.

1.3. Cấu tạo của phức hợp tủa

Cấu tạo của phức hợp tủa phụ thuộc trước hết vào phản ứng kháng nguyên - kháng thể và hệ thống kháng nguyên - kháng thể. Trong trường hợp kháng

nguyên quá thừa thì xuất hiện phức hợp nhỏ hoà tan, phức hợp này chỉ gồm hai phân tử kháng nguyên liên kết với một phân tử kháng thể.

Như vậy, trong trường hợp kháng thể thừa thì một số lớn các nhóm quyết định của phân tử kháng nguyên sẽ liên kết với các phân tử kháng thể, trong trường hợp tương đương thì còn nhiều nhóm quyết định của phân tử kháng nguyên còn tự do (không liên kết với kháng thể), trong trường hợp kháng nguyên thừa thì hai nhóm quyết định của hai phân tử kháng nguyên liên kết với một phân tử kháng thể (KN - KT - KN). Trong thực tế, để đạt được sự tương đương giữa kháng nguyên và kháng thể (kết tủa hoàn toàn), nếu cho dần dần ít một kháng nguyên vào thì tổng lượng kháng nguyên cần thiết ít hơn tổng lượng kháng nguyên khi ta chỉ cho vào một lần (hiện tượng Danysz). Hiện tượng đó được giải thích là khi cho dần dần ít một kháng nguyên vào thì đa số các nhóm quyết định của phân tử kháng nguyên đa hoá trị liên kết với các phân tử kháng thể, cho nên lượng kháng nguyên cần thiết để kết tủa hoàn toàn đòi hỏi ít hơn. Ngoài ra, do cho vào ít một kháng nguyên như vậy nên không có một số kháng nguyên bị bao vây trong mạng lưới liên kết như khi cho vào một lần.

Điều này có một ý nghĩa quan trọng đối với phản ứng độc tố và kháng độc tố. Nếu đem trộn ngay một lần một lượng độc tố với một lượng kháng độc tố tương đương thì không còn độc, nhưng nếu ta chia lượng độc tố ấy ra nhiều phần nhỏ và trộn dần với kháng độc tố thì còn độc vì còn độc tố tự do chưa bị liên kết.

1.4. Quá trình phát triển của kỹ thuật kết tủa

1.4.1 Kết tủa ở môi trường lỏng

Phản ứng kết tủa miễn dịch được Kraus mô tả năm 1897 nhưng lúc đó chỉ tiến hành ở môi trường lỏng, tức là trộn dung dịch kháng nguyên với dung dịch kháng thể trong ống nghiệm. Phương pháp trộn đơn giản này đã phát hiện được sản phẩm phản ứng miễn dịch mà miễn dịch vi khuẩn đã đầu tiên ứng dụng để phát hiện kháng thể. Uhlenhuth (1927) đã phát triển kỹ thuật kết tủa ở môi trường lỏng này với kỹ thuật kết tủa vòng (nhấn) đơn giản. Sau đó, nhiều tác giả đã ứng dụng phương pháp này với nhiều hệ thống kháng nguyên - kháng thể khác nhau.

1.4.2. Kết tủa ở môi trường gel

Kết tủa trong môi trường gel hay là một trong môi trường có gia đỡ, là một bước phát triển quan trọng của kỹ thuật kết tủa miễn dịch. Năm 1905, Bechhold mô tả một phản ứng có nhiều đường ngưng kết khi cho huyết thanh dê (kháng nguyên)..... tán vào môi trường gel đã có chứa kháng huyết thanh đặc hiệu (huyết thanh chống huyết thanh dê toàn phần). 40 năm sau, kỹ thuật khếch tán tủa trong gel được hoàn chỉnh. Các thành phần tham gia phản ứng được khếch tán trong gel nên gọi là khếch tán miễn dịch, mặt khác sản phẩm của phản ứng lại kết tủa và gắn chặt trong gel nên được gọi là kết tủa miễn dịch. Gel thạch là loại thông dụng, ngoài ra còn có thể dùng gelatin, pectin, polyacrylamit, silicage... Sự phát triển của phương pháp tủa trong gel đã làm ra đời một loạt các kỹ thuật: Oudin, Ouchterlony, Mancini, điện di miễn dịch, điện di miễn dịch phóng xạ. Sau đây là một số mô hình kết tủa thường được sử dụng hiện nay (Hình 5.4 đến 5.7).

2. Một số yếu tố ảnh hưởng và các điều kiện quy định đối với quá trình khuếch tán và kết tủa

2.1. Khuếch tán

2.1.1. Định luật khuếch tán đối với khuếch tán miễn dịch

Khuếch tán miễn dịch tuân theo nguyên lý các định luật khuếch tán của các chất hoà tan.

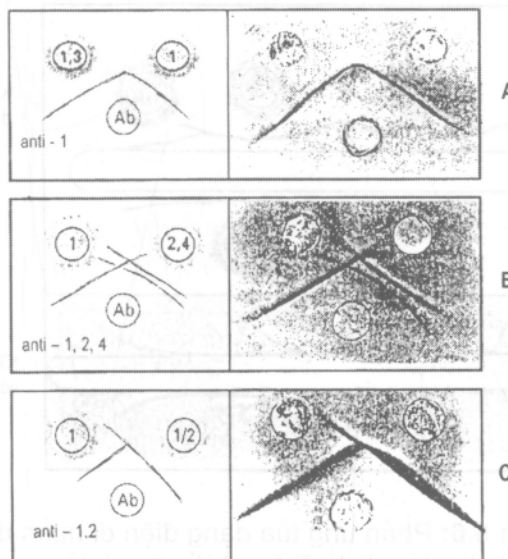
Sự khuếch tán trong gel tinh khiết có tốc độ gần giống như trong môi trường lỏng vì lúc đó thành phần tham gia phản ứng (kháng nguyên kháng thể) được coi là những cấu tử hình tròn, trọng lượng phân tử bé, còn môi trường gel được coi như một mạng lưới với mắt lưới to.

2.1.2. Nhiệt độ và thời gian khuếch tán

Kháng huyết thanh thử khuếch tán và tủa tốt ở 37°C và 4°C. Kháng huyết thanh của các chủng loại khác (ngựa) chỉ khuếch tán và tủa tốt ở 37°C. Ở 37°C, tốc độ khuếch tán tương đối nhanh thích hợp với những xét nghiệm đòi hỏi có kết quả sớm. Nhưng tốc độ khuếch tán nhanh lại ảnh hưởng đến quá trình kết tủa. Do đó nhiệt độ và thời gian khuếch tán quy định như sau: huyết thanh có hiệu giá kháng thể cao thì để 1 giờ ở 37°C và 24-48 giờ ở 4°C, huyết thanh có hiệu giá kháng thể thấp thì cần kéo dài 4-8 ngày ở 4°C. Khi cần kéo dài thời gian thì phải cho thêm chất chống vi khuẩn (methiolat, natriumazid).

2.1.3. Một số yếu tố khác

a. Tính chất của kháng nguyên và kháng thể



Hình 5.4: Miễn dịch tủa-khuếch tán hai chiều

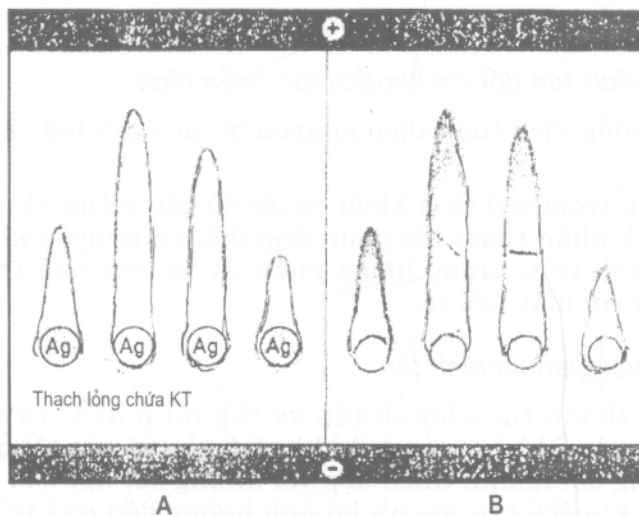
Trong phản ứng gồm có: Thạch lỏng có kháng thể đặc hiệu, trên đĩa phản ứng đục 3 lỗ, các lỗ này đặt kháng nguyên định tim. Khi khuếch tán hai chiều KT và KN gặp nhau sẽ phản ứng và tạo thành vạch tủa trên môi trường thạch.

A: Phản ứng (+) với 1 kháng nguyên (anti-1) 2 đường phản ứng khép kín

B: Phản ứng (+) với 3 kháng nguyên (anti1,2,4): Kết quả không khẳng định được kháng nguyên nào

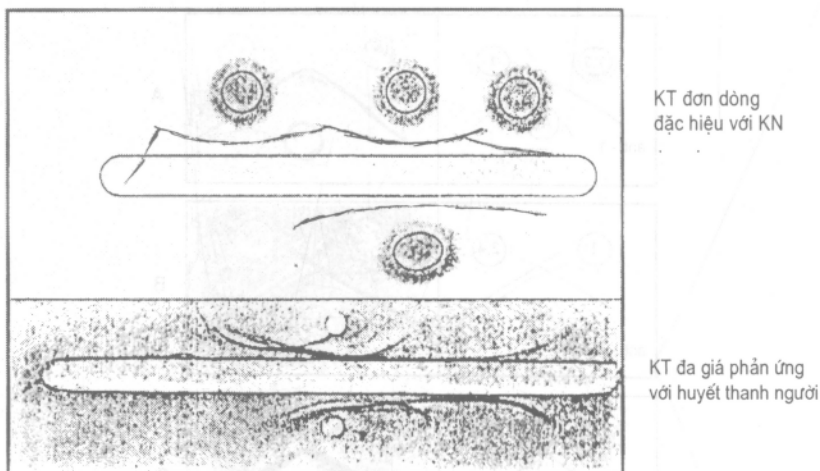
C: Phản ứng (+) với 2 kháng nguyên, trường hợp này cũng không khẳng định (anti 1,2).

Kỹ thuật này khá chuẩn, có thể dùng đánh giá độ tinh khiết của KN khi có KT đơn đặc hiệu.



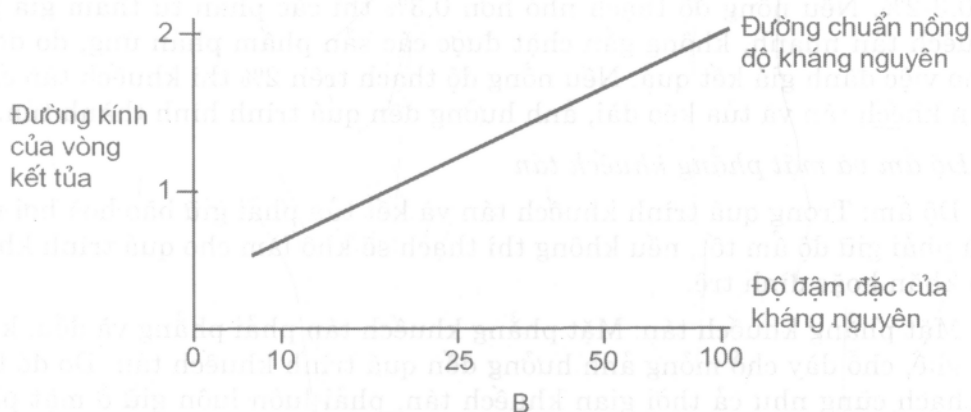
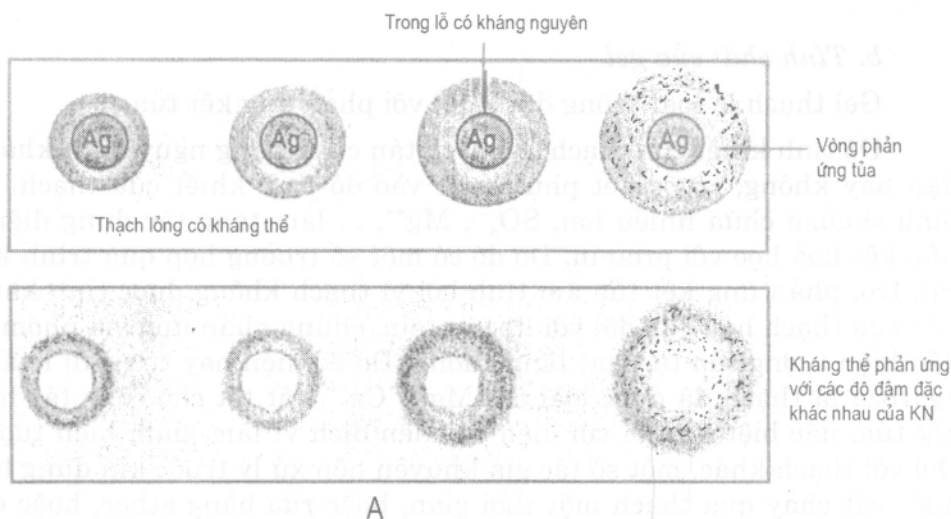
Hình 5.5: Phản ứng tua dạng "Rocket" (Điện di kiểu Rocket)

- A: Sơ đồ tua dạng Rocket, trên phiến thạch có kháng thể đặc hiệu. Trong các lỗ đục trên phiến thạch có chứa KN (Ag), KN sẽ khuếch tán vào môi trường thạch có KT đặc hiệu và tạo tua màu trắng đục như hình quả Rocket do đó gọi là điện di Rocket.
- B: Ảnh thật của tua Rocket



Hình 5.6: Phản ứng tua dạng điện di miễn dịch

Trên đây là hình ảnh điện di miễn dịch: Trên phiến thạch lỏng có các lỗ và rãnh dài dọc theo phiến. Trong lỗ có KN, chạy điện di để các thành phần KN dàn trải dọc phiến thạch, lấy bỏ thạch ở rãnh, sau đó cho KT vào rãnh. KT khuếch tán và phản ứng với KN đặc hiệu. Đây là kỹ thuật kết hợp giữa điện di và khuếch tán.



Hình 5.7: Phản ứng tủa dạng miễn dịch khuếch tán vòng (Mancini test).

Kháng thể đặc hiệu hoà trộn trong môi trường thạch agar, trên đó đục các lỗ có kích thước giống nhau, đặt vào các lỗ KN có độ pha loãng khác nhau (thí dụ pha loãng 10 lần, 25, 50, 100). Đĩa phản ứng để nhiệt độ 37°C/24-72 giờ. Đọc kết quả bằng cách đo đường kính vòng khuếch tán, vẽ đồ thị chuẩn về nồng độ pha loãng KN. Khi kiểm tra mẫu kháng nguyên bất kỳ, cần sử dụng nồng độ chuẩn, từ đó tính ra nồng độ của mẫu kiểm tra tương ứng.

A: Hình ảnh khuếch tán theo nồng độ khác nhau của KN

B: Đồ thị chuẩn về nồng độ KN pha loãng, sử dụng định lượng nồng độ KN hoặc KT.

Đặc tính miễn dịch, nồng độ, hiệu giá kháng thể đóng vai trò quan trọng đối với quá trình khuếch tán và kết tủa. Ngoài ra quá trình khuếch tán còn bị ảnh hưởng bởi các yếu tố:

(1) Trọng lượng phân tử: Trọng lượng phân tử càng cao thì khuếch tán càng chậm và ngược lại.

(2) Hình dạng phân tử: Phân tử hình tròn khuếch tán nhanh hơn phân tử hình bầu dục, hình thoi...

b. Tính chất của gel.

Gel thạch là loại thông dụng đối với phản ứng kết tủa.

Độ tinh khiết của thạch. Khuếch tán của kháng nguyên và kháng thể có đều đặn hay không, trước hết phụ thuộc vào độ tinh khiết của thạch. Thạch (agar) bình thường chứa nhiều ion, SO_4^{2-} , Mg^{++} , ... làm tăng tác dụng điện thẩm và dễ liên kết hoá học với protein. Do đó có một số trường hợp quá trình khuếch tán bị cản trở, phản ứng kết tủa âm tính bởi vì thạch không được tinh khiết. Tác dụng này của thạch hay gặp đối với lipoprotein, chúng phản ứng với nhóm sulfonin đưa đến hiện tượng tủa tự phát lắng xuống. Do đó hiện nay trên thị trường đã có loại agarosa là thạch đã được loại trừ Mg^{++} , Ca^{++} , rất tốt cho công tác hoá miễn dịch kết tủa, đặc biệt tốt đối với điện di miễn dịch vì làm giảm hiện tượng nội thẩm. Đối với thạch khác, một số tác giả khuyên nên xử lý trước khi dùng bằng cách cho nước cất chảy qua thạch một thời gian, hoặc rửa bằng ether, hoặc ethanol, hoặc diên phân.

Nồng độ thạch trong đệm. Nồng độ thạch thích hợp cho khuếch tán và kết tủa từ 0,3-2%. Nếu nồng độ thạch nhỏ hơn 0,3% thì các phân tử tham gia phản ứng khuếch tán nhanh, không gắn chặt được các sản phẩm phản ứng, do đó khó khăn cho việc đánh giá kết quả. Nếu nồng độ thạch trên 2% thì khuếch tán chậm, thời gian khếch tán và tủa kéo dài, ảnh hưởng đến quá trình hình thành tủa.

c. Độ ẩm và mặt phẳng khuếch tán

– Độ ẩm: Trong quá trình khuếch tán và kết tủa phải giữ bão hoà hơi nước, nghĩa là phải giữ độ ẩm tốt, nếu không thì thạch sẽ khô làm cho quá trình khuếch tán khó khăn hoặc đình trệ.

– Mặt phẳng khuếch tán: Mặt phẳng khuếch tán phải phẳng và đều, không được gồ ghề, chỗ dày chỗ mỏng ảnh hưởng đến quá trình khuếch tán. Do đó trong khi đổ thạch cũng như cả thời gian khuếch tán, phải luôn luôn giữ ở mặt phẳng thẳng bằng.

2.2. Kết tủa

Để quá trình kết tủa xảy ra tốt thì phải chú ý đến một số điều kiện nhất định.

2.2.1. pH

Quá trình kết tủa thường xảy ra tốt ở pH 6,5 - 8,5. Tuy theo hệ thống nghiên cứu mà một số tác giả thấy quá trình kết tủa có thể xảy ra ở phạm vi pH từ 4-12, song lượng tủa giảm rõ rệt khi pH quá thay đổi (acid hoặc kiềm quá).

2.2.2. Dung dịch kháng thể và kháng nguyên

Dung dịch kháng thể phải trong, không có lipid. Nếu dung dịch kháng thể vẫn đục hoặc có lipid thì phải loại trừ bằng cách ly tâm gạn bỏ.

Dung dịch kháng nguyên phải có pH trung tính ổn định.

2.2.3. Nồng độ muối

Quá trình kết tủa tốt ở nồng độ muối 0,15M. Nồng độ NaCl và KCl có thể tăng đến 1,5M vì ít ảnh hưởng đến quá trình kết tủa. Nhưng nếu nồng độ muối

quá cao (NaCl 15%) kết hợp với nhiệt độ tăng thì kết tủa bị phân ly. Kleinschmidt nghiên cứu ảnh hưởng của các anion trong các muối KCl, KBr, KI... đối với quá trình kết tủa, thấy kết tủa giảm rõ khi nồng độ các chất cao hơn 0,15M. Những dung dịch không có muối cũng làm giảm kết tủa hoặc không có kết tủa mặc dầu pH = 7 và vẫn có phản ứng kháng nguyên - kháng thể. Kháng huyết thanh chim là loại đặc biệt ngoại lệ, kết tủa xảy ra ở nồng độ NaCl 8-10%. Ở nồng độ 8-10%, hiện tượng kết tủa chỉ xảy ra đối với kháng thể thuộc IgG, còn IgM chỉ kết tủa ở nồng độ muối 0,15M.

2.2.4. Khử hoạt bổ thể

Bổ thể liên kết với phức hợp kháng nguyên - kháng thể có thể xảy ra trong quá trình kết tủa hay là sau khi ủ với huyết thanh tươi. Bổ thể liên kết trong phức hợp kháng nguyên - kháng thể không bị loại trừ trong khi rửa, mặt khác nó làm rối loạn phản ứng kết tủa định tính cũng như định lượng. Do đó cần khử hoạt bổ thể trước khi tiến hành thí nghiệm (để 30 đến 60 phút ở 56°C). Kháng huyết thanh có hiệu quả thấp thì hiệu giá càng giảm khi khử hoạt bổ thể, cho nên người ta khuyên nên hấp phụ bổ thể của huyết thanh này với một lượng kết tủa khác loại (với sản phẩm của một kháng huyết thanh khác khử hoạt). Kết tủa trong môi trường có 0,01 ethylen diamin tetraacetic sẽ hạn chế sự liên kết của bổ thể trên phức hợp kháng nguyên - kháng thể.

3. Kết tủa định tính

3.1. Thử nghiệm chuẩn bị

Định tính nhằm mục đích đánh giá sơ bộ phản ứng kháng nguyên - kháng thể mà ở đây là đánh giá kháng thể kết tủa trong kháng huyết thanh. Để đánh giá được chính xác, cần có thử nghiệm chuẩn bị trước nhằm sơ bộ đánh giá lượng kháng thể kết tủa trong kháng huyết thanh một cách nhanh chóng.

3.1.1. Dụng cụ, hoá chất. Cần có:

- Ống nghiệm nhỏ.
- Ống hút chia độ.
- Kháng nguyên.

Bảng 5.7: Tỷ lệ KN/KT trong kỹ thuật tủa định tính

	Ống thử	Ống chứng 1	Ống chứng 2
Kháng huyết thanh	0,2-0,5ml	0,2-0,5ml	
Kháng nguyên	10-15 μ g (trong 0,1-0,2ml NaCl 0,9%)		10-15 μ g (trong 0,1- 0,2ml NaCl 0,9%)
Huyết thanh bình thường hoặc NaCl 0,9%		0,1-0,2ml	0,1- 0,2ml

- Kháng huyết thanh.
- Huyết thanh bình thường.
- NaCl 0,9% trong nước cất.

3.1.2. Tiến hành

Tất cả các ống để ở 37°C trong 30-60 phút.

3.1.3. Đọc kết quả

So sánh với ống chứng

Ống thử có tua rõ: Kháng huyết thanh có kháng thể kết tua với kháng nguyên.

Tua không rõ mà dung dịch đục thì ly tâm 2000-3000 vòng/phút trong 30 phút rồi đọc kết quả.

Không có tua, dung dịch đục không rõ thì để tiếp ở 4°C qua một đêm. Hôm sau lấy ra ly tâm như trên và đọc kết quả.

Sau khi ly tâm như trên mà vẫn không có tua (không có hiện tượng kết hợp kháng nguyên - kháng thể) thì có thể nghĩ đến hiện tượng ức chế kết tua do kháng nguyên thừa hoặc hiệu giá kháng thể quá thấp. Trong những trường hợp này, cần tiến hành thử nghiệm với lượng kháng nguyên nhỏ (2-10 µg kháng nguyên cho 1ml kháng huyết thanh), trường hợp cần thiết có thể tăng thể tích kháng huyết thanh lên 2-3ml.

Trong thử nghiệm chuẩn bị này, có thể tiến hành thử nghiệm xác định hiện tượng kháng nguyên thừa, hoặc kháng thể thừa bằng cách chia phần dung dịch trong ở trên làm hai phần, một phần trộn với 5-10 microgam kháng nguyên (trong 0,1ml nước muối sinh lý), còn phần kia trộn với 0,1-0,2ml kháng huyết thanh).

Cũng để 37°C trong 30-60 phút và ly tâm như trên. Nếu có kết tua ở ống thứ nhất là có kháng thể thừa, nếu kết tua ở ống thứ hai là kháng nguyên thừa. Kinh nghiệm cho thấy, để đọc kết quả chính xác thì nên soi ống nghiệm trên nền đen.

3.2. Kết tua vòng đơn giản (theo Steffen 1968)

3.2.1. Nguyên lý

Phản ứng kết tua xuất hiện sớm nhất ở mặt tiếp xúc của dung dịch kháng nguyên và dung dịch kháng thể và với diện tiếp xúc hình tròn sẽ cho một vòng kết tua.

3.2.2. Dụng cụ và nguyên liệu

- Ống nghiệm nhỏ, ống hút Pasteur
- Kháng huyết thanh và kháng nguyên.

3.2.3. Tiến hành

Cho 0,5ml kháng huyết thanh vào ống nghiệm. Sau đó dùng ống hút Pasteur cho cẩn thận và nhẹ nhàng 0,5ml dung dịch kháng nguyên (nồng độ kháng nguyên 0,5-5mg/ml) lên trên bề mặt dung dịch kháng huyết thanh, không được xáo trộn. Để ở nhiệt độ của phòng.

3.2.4. Đọc kết quả

Đọc kết quả sau 30 phút, 60 phút, 120 phút hoặc 240 phút. Vùng tiếp xúc giữa kháng huyết thanh và dung dịch kháng nguyên xuất hiện một vành đục rõ: phản ứng dương tính. Nếu không có vành đục rõ: phản ứng âm tính.

Không nên đọc chậm hơn thời gian trên vì vòng ngưng kết sẽ bị xoá nhoà bởi hiện tượng khuếch tán.

Chú ý: Rối loạn ngưng kết do hiện tượng kháng nguyên thừa trong thí nghiệm này hoàn toàn không lo ngại. Thể tích dung dịch kháng nguyên không được lớn hơn thể tích kháng huyết thanh. Khi cho dung dịch kháng nguyên vào, nên tỳ nhẹ đầu ống hút Pasteur vào thành ống nghiệm gần mặt dung dịch kháng huyết thanh và cho chảy từ từ nhẹ nhàng theo chu vi ống nghiệm. Kết quả vòng đơn giản có thể cải tiến bằng cách tiến hành trong các ống mao quản.

4. Kết quả định lượng

4.1. Bán định lượng hiệu giá kháng thể, kháng nguyên

Xác định hiệu giá kháng thể, kháng nguyên dựa trên hai phương pháp cơ bản:

4.1.1. Phương pháp alpha (kỹ thuật Dean và Webb)

Cho vào mỗi ống nghiệm lượng kháng thể bằng nhau xác định, sau đó cho lần lượt từ ống thứ nhất trở đi một thể tích kháng nguyên có độ pha loãng tăng dần.

4.1.2. Phương pháp beta (kỹ thuật Ramon)

Cho vào mỗi ống nghiệm lượng kháng nguyên xác định bằng nhau, sau đó cho lần lượt từ ống thứ nhất trở đi một thể tích kháng thể có độ pha loãng tăng dần.

Hiệu giá chính là độ pha loãng của ống có kết tủa rõ.

Thí dụ: Xác định hiệu giá của huyết thanh miễn dịch (kháng một kháng nguyên nào đó) ta có thể tiến hành như sau:

Nếu kết tủa xuất hiện rõ ở ống số 9 chẳng hạn thì hiệu giá của kháng huyết thanh miễn dịch này là 1: 512. Tuy nhiên sự kết tủa đầu tiên (tỷ lệ kháng thể/kháng nguyên) còn phụ thuộc vào nồng độ chung của hỗn hợp kháng nguyên kháng thể. Phương pháp trên đây có nhanh chóng cho kết quả song có thể bị sai lệch bởi hiện tượng kết tủa không đặc hiệu như phản ứng chéo của các kháng nguyên đối với kháng thể. Vì thế, để xác định hiệu giá của kháng thể và kháng nguyên, đồng thời giúp phát hiện các phản ứng chéo hoặc sự tinh khiết của kháng nguyên, kháng thể thì người ta thường dùng phương pháp ngưng kết trong gel (kỹ thuật Ouchter lony) sẽ trình bày dưới đây.

Bảng 5.8: Tỷ lệ pha loãng KT trong kỹ thuật tủa định lượng

Ống nghiệm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dung dịch kháng nguyên 0,2 5mg/ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
0,2ml dung dịch kháng thể có độ pha loãng	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096

4.2. Các phương pháp kết tủa định lượng

Lý thuyết về đường biểu diễn kết tủa của Heidelberger và Kendall đã chỉ rõ, phản ứng kết tủa xảy ra tốt nhất ở vùng tương đương giữa kháng nguyên và

kháng thể. Do đó có một số tác giả trước khi định lượng kết tủa, còn tiến hành thử nghiệm cơ bản để xác định vùng tương đương của kháng nguyên, kháng thể.

4.2.1. Thử nghiệm chuẩn bị

Để xác định vùng tương đương, cho vào mỗi ống nghiệm 0,4ml dung dịch kháng nguyên có nồng độ tăng dần (50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$; có thể tăng đến 2000-3000 $\mu\text{g/ml}$) và dung dịch kháng thể có nồng độ cố định (0,4ml).

Để tất cả các ống nghiệm ở 37°C trong 60 phút và qua một đêm ở 4°C . Các ống nghiệm được ly tâm 30 phút với tốc độ 2000-3000 vòng/phút, rồi xác định kháng nguyên thừa và kháng thể thừa của dung dịch trong nước nổi ở trên.

Ống nào có lượng kết tủa nhiều nhất, không còn kháng nguyên thừa và kháng thể thừa ở phần dung dịch ở trên nữa, thì đó là phạm vi tương đương của kháng nguyên, kháng thể.

4.2.2. Thử nghiệm chính thức

Định lượng lượng kết tủa của một hệ thống phản ứng kháng nguyên kháng thể đòi hỏi kháng huyết thanh phải có chất lượng cao. Tổng thể tích của hỗn hợp không quá 3-4ml. Đối với kháng huyết thanh có hiệu giá thấp thì phải kéo dài thời gian kết tủa 6-8 ngày ở 4°C và có thể cho tăng thể tích kháng thể.

a. Nguyên lý của phương pháp

Kết tủa được tạo thành sau phản ứng kháng nguyên - kháng thể, được rửa với dung dịch NaCl 0,9% lạnh và hoà tan trong NaOH 0,1N rồi tiến hành định lượng protein của tủa bằng phương pháp vi Kjeldahl, phản ứng Folin hoặc phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 280nm.

b. Dụng cụ, hoá chất

- Ống nghiệm, ống hút chia độ
- Kháng huyết thanh, kháng nguyên
- NaCl 0,9%, NaOH 0,1N

c. Tiến hành

- Chuẩn bị kháng huyết thanh và kháng nguyên:
- + Khử hoạt bổ thể của kháng huyết thanh (30 phút ở 56°C).
- + Pha các dung dịch kháng nguyên 5-10% trong nước muối sinh lý (0,9%)
- Phản ứng kết tủa:

	Ống thử	Ống chứng
+ Kháng huyết thanh khử hoạt	0,4ml	0,4ml
+ Dung dịch kháng nguyên	0,4ml	
+ NaCl 0,9%		0,4ml

Có thể tiến hành thêm một ống chứng thứ hai: 0,4ml dung dịch kháng nguyên + 0,4ml NaCl 0,9% để xem có hiện tượng kết tủa làm sai lệch kết quả không.

Để tất cả các ống ở 37°C trong 30 phút và 24-48 giờ ở 4°C. Trong thời gian đó thỉnh thoảng phải lắc nhẹ.

4.2.3. Rửa và hoà tan tủa

Các ống được ly tâm 2000 - 3000 vòng/phút x 30 phút. Nhẹ nhàng chất phần dung dịch trong sang một ống nghiệm khác để kiểm tra kháng nguyên, kháng thể thừa. Phần cặn được rửa 2-3 lần với NaCl 0,9% lạnh, mỗi lần hoà cặn với 1-2ml NaCl 0,9% lạnh, ly tâm và chất bỏ phần dung dịch trong ở trên.

Hoà cặn với NaOH 0,1N để tiến hành định lượng. Đầu tiên cho 0,5ml NaOH 0,1N hoà cặn, sau đó cho thêm dần để tổng thể tích khoảng 2-3ml.

4.2.4. Định lượng protein tủa

Sau khi hoà tan cặn, có thể tiến hành định lượng protein của tủa bằng cách:

- Định lượng nitơ của tủa bằng phương pháp vi Kjeldahl. Từ lượng nitơ tính được lượng protein bằng cách nhân với 6,25. Phương pháp này chính xác nhưng phiền phức và mất thời gian, nên chỉ để tiến hành với chuẩn.

- Phản ứng Folin, khá nhạy nhưng mật độ quang thay đổi đối với các protein khác nhau, khác biệt tới 50%. Do đó phải tiến hành song song với chuẩn kháng nguyên, kháng thể cùng loại để điều chỉnh kết quả.

- Phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng 280nm. Phương pháp này đơn giản nhưng hệ số mật độ quang cũng thay đổi tùy theo loại protein.

Thí dụ: E 1% ở pH = 7 thì đối với albumin ở bước sóng 280nm là 5,8, đối với gamma globulin là 13,8... Đo mật độ quang so với ống trắng là NaOH 0,1N.

4.2.5. Kiểm tra dung dịch trong ở trên

	Kháng nguyên thừa	Kháng thể thừa
Dung dịch trong	0,3ml	0,3ml
Kháng huyết thanh	0,1ml	
Kháng nguyên		5-10 µg (trong 0,1ml NaCl 0,9%)

Nếu không có kháng nguyên thừa và kháng thể thừa ở phần dung dịch trong là quá trình định lượng đã tiến hành tốt ở vùng tương đương, kết quả đảm bảo chính xác. Nếu có kháng nguyên thừa hoặc kháng thể thừa, phải điều chỉnh lại.

4.2.6. Ứng dụng của phương pháp

Tính được lượng kháng thể ngưng kết trong kháng huyết thanh (lấy tổng lượng tủa trừ đi lượng kháng nguyên cho vào đã xác định trước).

Tính được tỷ lệ kháng nguyên/kháng thể ở vùng tương đương hoặc vùng kháng thể thừa. Đặt cơ sở cho việc điều chế phức hợp kháng nguyên, kháng thể có hoạt tính sinh vật học.

Phương pháp được áp dụng để định lượng kháng độc tố và độc tố vi khuẩn, có thể áp dụng nghiên cứu bệnh lý thực vật và thú y. (Kháng nguyên là các chất chiết xuất, kháng thể là huyết thanh động vật được gây miễn cảm bằng kháng nguyên tương ứng).

5. Kết tủa trong gel

Kết tủa miễn dịch trong gel là hiện tượng kháng nguyên, kháng thể (hoặc cả hai) khuếch tán vào một lớp gel và ở một vị trí xác định của gel xuất hiện đường kết tủa hoặc vùng kết tủa của kháng nguyên kháng thể.

Sự tạo thành kết tủa cũng như vị trí kết tủa phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Trước hết, nó tuân theo định luật khuếch tán trong môi trường lỏng của Fick 2 cũng như hệ số khuếch tán, có nghĩa là phụ thuộc vào tính chất của kháng nguyên, kháng thể, nồng độ và trọng lượng phân tử của kháng nguyên, kháng thể. (Đường kết tủa nằm gần vị trí kháng nguyên hơn nếu kháng nguyên có trọng lượng phân tử cao hơn trọng lượng phân tử kháng thể, và ngược lại). Ngoài ra còn phụ thuộc vào pH, ion lực, nhiệt độ, thời gian.

Ưu điểm của phương pháp. Với phương pháp kết tủa trong gel, có thể tiến hành nghiên cứu hệ thống kháng nguyên, kháng thể đa giá. Trong môi trường gel hỗn hợp, kháng nguyên và kháng thể đa giá sẽ cho nhiều đường tủa độc lập bởi đặc tính khuếch tán và điện di khác nhau của chúng.

Khuếch tán trong gel giúp cho sự đánh giá một cách chính xác độ tinh khiết của kháng nguyên kháng thể, phát hiện được tính đồng tính, phản ứng chéo... của các kháng nguyên. Các đường tủa được gắn trong gel làm cho việc đánh giá kết quả và lưu lại được thuận lợi. Kết tủa miễn dịch trong gel, ngoài tác dụng xác định định tính, còn dùng định lượng cũng như bán định lượng kết tủa miễn dịch. Chúng tôi chỉ giới thiệu những kỹ thuật thông dụng nhất.

5.1. Khuếch tán vòng đơn giản (kỹ thuật Mancini)

Kỹ thuật khuếch tán miễn dịch vòng trong gel thạch được Mancini, Carbonara và Heremans nêu ra năm 1965 với một hệ thống so sánh để xác định định lượng kháng nguyên từ một ngưng kết miễn dịch đặc hiệu.

5.1.1. Nguyên tắc của phương pháp

Kháng nguyên hoà tan từ một lỗ hình tròn khuếch tán ra xung quanh một cách đều đặn vào một lớp gel thạch có độ dày nhất định chứa kháng thể tương ứng. Sự tiếp xúc kháng nguyên với kháng thể tương ứng đặc hiệu sẽ tạo thành một vùng kết tủa hình tròn không tan.

Diện tích hình tròn tỷ lệ thuận với nồng độ kháng nguyên.

Phương pháp Mancini được sử dụng trong hoá miễn dịch để định lượng các protein trong một hệ thống kháng huyết thanh đơn đặc hiệu với kháng nguyên tương ứng. Thí dụ định lượng IgG, IgA với kháng huyết thanh đơn đặc hiệu kháng IgG, kháng IgA.

5.1.2. Thiết bị, nguyên liệu, hoá chất

- Bàn thẳng bằng, buồng ẩm,
- Thước kẹp đo hoặc kính hiển vi có thước đo.
- Giấy kẻ ô ly (mm)
- Ống nghiệm, ống hút vi lượng, ống hút chia độ
- Đĩa thuỷ tinh có đường kính 8,5cm, hoặc các phiến kính phẳng 8 x 10cm
- Thạch 1,5% trong đệm 8,6 với ion lực 0,1
- Kháng huyết thanh đơn đặc hiệu, kháng nguyên chuẩn
- Huyết thanh cần thử (huyết thanh bệnh nhân)
- NaCl 0,9%
- Dung dịch nhuộm: có thể dùng dung dịch 0,5% Amidoschwarz 10B (trong methanol: acid acetic tỷ lệ 9:1) hoặc dung dịch 0,2% xanh Coomassie trong nước.
- Dung dịch cố định: acid acetic 2% trong nước hoặc acid tricloacetic 12,5%.
- Dung dịch rửa: methanol/acid acetic (9/1) hoặc ethanol/acid acetic/nước (4/1/5)

5.1.3. Tiến hành

- Điều chế thạch chứa kháng thể. Đun sôi cách thuỷ thạch 1,5% để thạch tan ra, sau đó để vào nồi ấm cách thuỷ 56°C để nhiệt độ thạch giảm xuống gần 56°C. Đồng thời để kháng huyết thanh vào nồi cách thuỷ ấm 56°C.

Cho vào ống nghiệm hoặc lọ penicillin một thể tích thạch và kháng huyết thanh theo tỷ lệ: kháng huyết thanh trong thạch là 2-5%, hoặc có thể 10%. Tất cả đều tiến hành ở 56°C.

- Đổ thạch chứa kháng thể vào đĩa thuỷ tinh có đáy phẳng và đặt lên mặt phẳng đã thẳng bằng, làm sao thạch dàn đều đặn có độ dày khoảng 2mm; để ở nhiệt độ phòng 20-30 phút, sau đó để vào tủ lạnh (4°C) khoảng 20 phút cho thạch đông tốt.

- Đục lỗ. Dùng khuôn hoặc một ống có đường kính 2mm đục các lỗ trên bản thạch đục và hút phải cẩn thận để lỗ thạch tròn, nhẵn và sạch. Khoảng cách giữa các lỗ từ: 7-10mm tùy nồng độ kháng nguyên của mẫu thử.

- Cho dung dịch kháng nguyên vào lỗ. Bằng ống hút vi lượng, cho vào mỗi lỗ 3-5 microlit dung dịch kháng nguyên (mỗi lỗ là một mẫu kháng nguyên, tức là mỗi mẫu huyết thanh bệnh nhân). Tùy theo yêu cầu mà pha loãng huyết thanh. (Thí dụ: để định lượng IgG thì huyết thanh bệnh nhân cần pha loãng 1/10, định lượng IgA thì pha loãng 1/2, còn định lượng IgM không pha loãng.

Đồng thời cho vào ba lỗ ba nồng độ kháng nguyên chuẩn tương ứng đã biết rõ nồng độ để vẽ đường chuẩn.

Thời gian khuếch tán: để vào hộp có độ ẩm cao (bảo hoà hơi nước) ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ.

Loại bỏ protein thừa không ngưng kết: ngâm 2 ngày trong NaCl 0,9%, hàng ngày thay 2 đến 3 lần dung dịch NaCl 0,9%.

Cố định: ngâm 30 phút trong dung dịch acid acetic 2%.

Nhuộm màu: ngâm 10 phút trong dung dịch 0,5% Amidoschwarz 10B hoặc Coomassie 0,2%.

Loại bỏ màu thừa. Ngâm lần lượt ở nhiều chậu methanol: acid acetic (9:1) hoặc ethanol: acid acetic nước (4:1:5) mỗi lần khoảng 2 phút.

Để khô ở nhiệt độ phòng.

5.1.4. Đọc kết quả

Dùng thước kẹp ly mét hoặc kính hiển vi có chia độ để đo đường kính khuếch tán.

Vẽ đường biểu diễn. Căn cứ vào nồng độ kháng nguyên chuẩn biết trước và đường kính đo được của các nồng độ kháng nguyên chuẩn, ta vẽ được đường biểu diễn trên giấy kẻ ly (ít nhất phải có 3 điểm). Từ đó tính ra nồng độ kháng nguyên tương ứng của mẫu thử.

Có thể vẽ đường chuẩn theo các cách sau đây: Thí dụ:

- Đường kính khuếch tán IgG của huyết thanh bệnh nhân A là 5mm.
- Nồng độ IgG tương ứng trên trục hoành là 30,
- Độ pha loãng huyết thanh: 40

Vậy: nồng độ IgG của huyết thanh bệnh nhân A là: $30 \times 40 = 1200\text{mg}/100\text{ml}$.

5.1.5. Các yếu tố ảnh hưởng

– Không để thẳng bằng trong quá trình làm và quá trình khuếch tán nên lớp thạch dày mỏng khác nhau do đó khuếch tán không đều, diện khuếch tán méo mó, lồi lõm hoặc hình bầu dục.

– Đồ thừa dung dịch kháng nguyên tràn ra ngoài lỗ hoặc nồng độ kháng nguyên quá thừa làm cho diện khuếch tán mờ, giới hạn không rõ (do tạo phức hợp tan).

– Để ở nhiệt độ quá cao không đủ độ ẩm nên thạch bị khô, ảnh hưởng đến tốc độ khuếch tán.

– Thời gian khuếch tán để quá lâu mà khoảng cách giữa các lỗ thì bé nên có thể xảy ra hiện tượng khuếch tán chồng lên nhau.

– Huyết thanh có nhiều lipid hoặc có nhiều fibrinogen gây nên sự kết tủa tự phát.

5.1.6. Giới hạn của phương pháp

Phương pháp này chỉ phù hợp đặc biệt đối với việc nghiên cứu định lượng các protein trong trạng thái sinh lý, bệnh lý mà có trọng lượng phân tử không quá lớn.

Để khắc phục sự không đều đặn của lớp thạch khi đổ, chúng tôi đã dùng hai miếng kính phẳng chồng lên nhau và lót giữa hai kính ở ba cạnh những băng nhỏ

chất dẻo hoặc cao su dày độ 1,5-2mm và cố định chặt bằng cặp phôi quần áo. Như vậy hai miếng kính phẳng đã cách nhau khoảng 2mm, ba phía đã kín, còn một phía không lót cao su là khu vực để đổ thạch chứa kháng thể. Sau khi đổ thạch chứa kháng thể vào thì để nghiêng khoảng 30° trong 10 phút ở nhiệt độ phòng rồi để vào tủ lạnh 4°C trong 20 phút cho thạch chứa kháng thể đông tốt. Sau khi thạch đã đông tốt thì bỏ đi một phiến kính bằng cách vừa miết nhẹ nhàng phiến kính đó trên lớp thạch, vừa kéo ra. Ta sẽ được một lớp thạch chứa kháng thể dày khoảng 2mm nằm lại trên phiến kính kia. Tiến hành đục lỗ và cho kháng nguyên vào các lỗ như phần trên.

5.2. Khuếch tán vòng kép

Từ 1949, kỹ thuật Ouchterlony được ứng dụng một cách phổ biến trong nghiên cứu kết tủa miễn dịch bởi kỹ thuật khá đơn giản và cho kết quả nhanh.

5.2.1. Nguyên lý của phương pháp

Kháng nguyên và kháng thể hoà tan từ hai vị trí khác nhau khuếch tán vòng vào trong môi trường gel thạch tạo nên những đường kết tủa hình cung khi kháng nguyên và kháng thể tương ứng tiếp xúc nhau.

Hình dạng độ cong của đường tủa phụ thuộc vào hệ số khuếch tán của phân tử kháng nguyên và phân tử kháng thể.

5.2.2. Thiết bị, dụng cụ, hoá chất

- Mặt phẳng thẳng bằng, buồng ẩm như đối với kỹ thuật Mancini.
- Hộp quan sát với nền đen, lam kính, bình nón
- Ống hút chia độ: 0,1ml, 1ml, 5ml, 10ml
- Ống hút mao quản, khuôn đục lỗ
- Dung dịch thạch 1,5% trong đệm pH 8,6 ion lực 0,05.
- Dung dịch kháng nguyên: huyết thanh bệnh nhân hoặc các thành phần protein.
- Kháng thể: kháng huyết thanh tương ứng.
- NaCl 0,9%
- Dung dịch nhuộm và dung dịch rửa như trong kỹ thuật Mancini.

5.2.3. Tiến hành

- Chuẩn bị các lam kính. Các lam kính được rửa và lau khô sạch, đánh số và đặt lên trên mặt phẳng thẳng bằng.

- Đun sôi cách thuỷ dung dịch thạch 1,5% để thạch tan đều.

- Dùng ống hút dải lên mỗi lam kính 2,5ml thạch làm sao cho lớp thạch dàn đều và có độ dày khoảng 3mm. Để ở nhiệt độ phòng cho thạch đông lại, sau đó để vào tủ lạnh khoảng 15-20 phút cho thạch đông chắc.

Nếu chưa kịp làm thí nghiệm thì để các lam thạch vào buồng ẩm.

- Đục lỗ. Dùng khuôn hoặc các ống đồng để đục các lỗ trên bản thạch.
- Dùng ống hút mao quản cho kháng huyết thanh đầy lỗ giữa, còn các lỗ xung quanh cho đầy dung dịch kháng nguyên có độ pha loãng khác nhau.
- Để các lam kính vào buồng ẩm trên một tiết diện bằng và ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ.

5.2.4. Đọc kết quả

Dùng ánh sáng tự nhiên hoặc hộp quan sát (hộp có bóng đèn, đáy nền đen và trên là mặt kính) để đọc kết quả các đường kết tủa.

Để tiến hành định lượng tiếp hoặc để giữ làm tài liệu thì loại protein thừa không ngưng kết (ngâm 2 ngày trong dung dịch NaCl 0,9%). Sau đó nhuộm 10 phút với dung dịch Amidoschwarz và rửa bằng hỗn hợp ethanol: acid acetic + nước và để khô như đối với kỹ thuật Mancini.

5.2.5. Ứng dụng của kỹ thuật Ouchterlony.

- Kiểm tra độ tinh khiết của kháng nguyên. Để tiến hành kiểm tra độ tinh khiết của một hỗn hợp kháng nguyên hoặc một kháng nguyên đơn giá (một thành phần protein) sau khi được điều chế thì người ta có thể sử dụng kỹ thuật Ouchterlony.

Để có kết quả chính xác, cần pha loãng kháng nguyên thành nhiều nồng độ khác nhau để có thể tạo được một phạm vi tương đương của kháng nguyên, kháng thể.

- So sánh các kháng nguyên. Kỹ thuật Ouchterlony giúp cho việc nghiên cứu so sánh tính đồng nhất (sự giống nhau) phản ứng chéo và tính khác loại của hai kháng nguyên.

Nhóm 1: Cả hai kháng nguyên hoàn toàn giống nhau, tức là chúng có cùng nhóm quyết định của kháng nguyên, do đó hai đường tủa khép kín (tính đồng nhất).

Nhóm 2: Không đồng nhất. Hai kháng nguyên có những nhóm quyết định khác nhau nghĩa là mỗi một kháng nguyên phản ứng với một thành phần kháng thể trong kháng huyết thanh. Hai đường tủa cắt nhau.

Nhóm 3: Đồng nhất một phần thứ nhất. Hai kháng nguyên có chung một nhóm quyết định. Ngoài ra kháng nguyên I còn có một nhóm quyết định phản ứng với một thành phần kháng thể chứa trong kháng huyết thanh mà ở kháng nguyên II không có. Kháng thể chống lại nhóm quyết định này tạo thành một đường kết tủa đi qua kháng nguyên II cho hình ảnh một cửa gà.

Nhóm 4: Đồng nhất một phần thứ hai. Hai kháng nguyên có chung một nhóm quyết định. Đồng thời mỗi kháng nguyên lại có một nhóm quyết định khác nhau và phản ứng với hai thành phần khác nhau trong kháng huyết thanh và tạo nên hình ảnh "cửa gà kép". Loại đồng nhất một phần này tương đối khó phân biệt với nhóm không đồng nhất.

5.3. Kỹ thuật điện di miễn dịch (xem bài riêng)

KỸ THUẬT NGƯNG KẾT

1. Nguyên lý cơ bản của phản ứng ngưng kết

1.1. Định nghĩa

Ngưng kết là hiện tượng kết lại thành đám và ngưng thành cặn (từ một hỗn dịch) của các vi khuẩn, huyết cầu hoặc các tiểu phần khác.

1.2. Cơ sở lý hóa của phản ứng ngưng kết

Một hỗn dịch bao gồm những tiểu phần lơ lửng trong dung môi. Các tiểu phần giữ trạng thái phân tán đều như vậy là nhờ ở tình trạng ion hoá trong dung môi, các phân tử nước bám xung quanh cũng ion hoá hình thành một lớp bao bọc làm mức độ ion hoá xung quanh lớn, nhưng giảm dần cho đến khi bằng nước thường của dung môi. Mức độ ái thủy nhiều ít quyết định độ ổn định của hỗn dịch. Một hỗn dịch ái thủy ít thì quá trình hydrat hoá tiểu phần nói trên chỉ tiến hành trên mặt do sức hút điện mà có hút nước, còn hỗn dịch ái thủy nhiều khi nước đi sâu vào cấu tạo của tiểu phần hình thành một lớp nước đệm dày bao quanh. Chính vì thế mà khi cho một dung dịch điện giải vào hỗn dịch thì hỗn dịch càng ít ái thủy càng dễ ngưng kết, trái lại hỗn dịch ái thủy nhiều khi không ngưng kết. Nhưng nếu cho vào đây một chất lấy nước đi như rượu thì lớp nước đệm xung quanh mất và hỗn dịch ái thủy cũng sẽ dễ dàng bị ngưng kết.

1.3. Những yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng ngưng kết

Cơ sở lý hoá vừa nói trên cho thấy ngay phản ứng ngưng kết chịu ảnh hưởng chủ yếu vào lực ion và pH của dung môi, sau đến một số yếu tố thứ yếu hơn như nhiệt độ và những chất khác cho thêm vào đó.

1.3.1. Độ đậm độ ion của môi trường

Như trên đã nói, các tiểu phần do có tải điện, nên đã hình thành những lực đẩy thắng lực hút lẫn nhau làm cho tiểu phần phân tán đều trong dung môi. Nay nếu làm giảm hiệu thế bề mặt xuống thì sẽ làm giảm lực đẩy và tăng sức hút lẫn nhau dẫn đến kết tụ. Do đó cho thêm một chất điện giải vào trong hỗn dịch tiểu phần sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho hiện tượng ngưng kết hình thành. Đó chính là cơ sở lý hoá của các phản ứng lên bông kết tủa trong huyết thanh học, hay đó là hiện tượng ngưng kết hoá học.

1.3.2. pH của môi trường

pH của môi trường ảnh hưởng nhiều ít đến phản ứng ngưng kết tùy theo độ chênh lệch của nó với điểm đẳng điện của tiểu phần. Sự khác biệt càng ít thì lớp nước điện xung quanh tiểu phần càng vững chắc và hỗn dịch càng bền vững; sự

khác biệt càng xa thì lớp ion quanh tiểu phần bị trung hoà và như vậy chúng dễ dàng hợp lại với nhau đưa đến ngưng kết. Nhưng trong phản ứng ngưng kết sinh học, yếu tố pH ảnh hưởng không lớn lắm vì nó vẫn có thể xảy ra trong một vùng pH rất rộng so với điểm đẳng điện của chất sinh học.

1.3.3. Nhiệt độ

Nhiệt độ làm thay đổi chuyển động Brown, ảnh hưởng đến độ phân tán của tiểu phần trong dung môi. Nó cũng ảnh hưởng đến sức tải điện. Riêng đối với phản ứng ngưng kết sinh học thì nhiệt độ quá cao (trên 60°C) sẽ gây thoái hoá và tủa, nhiệt độ quá thấp gây đông đặc dung môi.

1.3.4. Chất keo khác

Trong phản ứng ngưng kết, ngoài những yếu tố vừa kể trên thì nếu cho vào đây bất kỳ một chất gì có ảnh hưởng đến những yếu tố đó, đều ảnh hưởng đến phản ứng. Đặc biệt trong phản ứng ngưng kết sinh học thì người ta thường tiến hành trong dung môi keo loại như huyết thanh, dung dịch chất cao phân tử... cho nên những chất này có ảnh hưởng như làm cho các tiểu phần dễ dính với nhau, làm hiện tượng ngưng kết dễ hình thành hơn.

1.4. Phân loại phản ứng ngưng kết

Có thể phân biệt hai loại phản ứng ngưng kết chính sau:

- Phản ứng ngưng kết hoá học, phụ thuộc chủ yếu vào pH và đậm độ ion của môi trường. Đó là phản ứng hay dùng để xác định cân bằng keo loại huyết thanh trong các bệnh gan.
- Phản ứng ngưng kết sinh học hay đặc hiệu, xảy ra khi trong hỗn hợp dịch có kháng nguyên là tiểu phần và có kháng thể hoà tan. Nó phụ thuộc vào cả 4 yếu tố đã nói trên, song tuy mỗi trường hợp cụ thể, có mức độ khác nhau.

2. Phản ứng ngưng kết đặc hiệu

2.1. Khái niệm về phản ứng ngưng kết

Trong miễn dịch học, phản ứng kết hợp kháng nguyên - kháng thể rất hay xảy ra và là cơ sở của rất nhiều kỹ thuật huyết thanh dùng để chẩn đoán cũng như để nghiên cứu. Nếu đem trộn một kháng huyết thanh đặc hiệu với một kháng nguyên dưới hình thức tiểu phần (tế bào, huyết cầu, hạt trơ có gắn kháng nguyên lên trên...) thì các tiểu phần sẽ kết lại thành đám, ngưng lại thành cặn, tách khỏi pha dịch thể của hỗn dịch.

Phản ứng ngưng kết đặc hiệu lần đầu tiên được Gruber và Durham phát hiện vào năm 1896 khi hai ông đem trộn một giọt hỗn dịch vi khuẩn thương hàn với một giọt huyết thanh bệnh nhân mắc bệnh ấy thì thấy vi khuẩn bị ngưng kết lại thành từng đám trong giọt lơ lửng. Ngày nay hiện tượng này do có đủ mọi tiêu chuẩn đặc hiệu của tất cả các phản ứng miễn dịch cho nên được dùng để phát hiện một trong hai yếu tố chính tham gia vào phản ứng kết hợp kháng nguyên-kháng thể.

Khi kháng nguyên đã biết thì có thể tìm trong huyết thanh nhất định nào đó sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu tương ứng.

Ngược lại, khi người ta có những kháng huyết thanh đặc hiệu đã biết rõ có chứa những kháng thể đặc trưng thì có thể xác định tính chất kháng nguyên tương ứng có trong một thành phần nào đó chưa biết.

2.2. Cơ chế của phản ứng ngưng kết đặc hiệu

2.2.1. Giả thuyết của Bordet

Năm 1899, Bordet đã cho rằng phản ứng ngưng kết miễn dịch xảy ra qua hai thì:

- Thì kết hợp kháng nguyên - kháng thể trong đó kháng thể được cố định trên mặt các tế bào mang kháng nguyên; thì này có thể xảy ra ngay trong dung dịch nước và hoàn toàn không chịu ảnh hưởng của các yếu tố chi phối phản ứng ngưng kết.

- Thì kết tụ và ngưng đọng xảy ra tiếp theo, đòi hỏi phải có dung môi điện giải. Trong thì này, phản ứng ngưng kết tuân theo những quy luật của phản ứng ngưng kết hoá học, nghĩa là thay đổi theo lực ion, pH, nhiệt độ...

Nhưng giả thuyết của Bordet không giải thích được hiện tượng kháng nguyên kháng thể kết hợp trong một vùng pH khá rộng, không giải thích được hiện tượng khu vực.

2.2.2 Giả thuyết mạng lưới của Marrack và Pauling

Trong cơ chế kết hợp kháng nguyên - kháng thể, hiện tượng ngưng kết cũng như hiện tượng kết tủa được quyết định bởi sự kết hợp giữa các nhóm quyết định đặc hiệu có trên tiểu phần kháng nguyên với các nhóm tương ứng có trên phân tử kháng thể. Hai tiểu phần kháng nguyên được nối với nhau bằng một phân tử kháng thể có hai hoá trị và cứ như thế, cái nọ mắc với cái kia hình thành một mạng lưới cách quãng cứ một kháng nguyên lại đến một kháng thể. Ngày nay, qua kính hiển vi điện tử, người ta thấy giả thuyết này là đúng với sự thật. Qua khuếch đại lớn đã thấy là những cục ngưng kết giữa kháng thể đặc hiệu và virus, cho hình cách quãng kháng nguyên-kháng thể trong đó phân tử kháng thể là những hình ống có chiều dài khoảng 250 - 270 Angstrom ($1 \text{ Angstrom} = 1.10^{-7} \text{ mm}$). Điều đó cho thấy là khi kết hợp, hai cánh Fab của kháng thể đã mở hẳn ra 180° như trong phần lý thuyết đã nói.

Như vậy cơ chế của ngưng kết cũng giống như kết tủa chỉ có khác là trong phản ứng này cỡ khổ của tiểu phần kháng nguyên to hơn rất nhiều phân tử kháng thể vì chúng là những tế bào. Cũng vì thế mà trên mặt tiểu phần kháng nguyên có rất nhiều nhóm quyết định kháng nguyên khác nhau.

2.2.3. Những yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng ngưng kết miễn dịch

Qua cơ chế vừa nói trên thì có hai loại lực ảnh hưởng đến phản ứng ngưng kết đặc hiệu: các lực ảnh hưởng đến kết hợp kháng nguyên - kháng thể và các lực ảnh hưởng đến phản ứng ngưng kết.

a. Các lực ảnh hưởng đến kết hợp kháng nguyên - kháng thể

Ngoài những lực như lực Van der Waals, liên kết hydro, lực điện Coulombs đã nói trong phần lý thuyết cũng cần phải kể hai yếu tố chính sau:

Tính đa hoá trị của kháng thể. Phải là những kháng thể tối thiểu có hai hoá trị thì mới tạo được phản ứng ngưng kết trực tiếp. Nếu dùng men mà cắt một phân tử kháng thể IgG chẳng hạn thành hai mảnh Fab, thì chúng vẫn có khả năng kết hợp với nhóm quyết định kháng nguyên trên mặt tiểu phần, song không tạo nổi hiện tượng ngưng kết. Mandy đã thành công trong việc cắt hai kháng thể khác nhau, sau đó lại ghép mảnh Fab của cái nọ vào với Fab của cái kia, thu được một phân tử kháng thể lại có hai hoá trị nhưng khác nhau về tính đặc hiệu. Song kháng thể lai ấy cũng không gây ngưng kết được.

Liều lượng tương đương và hiện tượng khu vực. Nếu trong một loạt nhiều ống nghiệm người ta cho một lượng nhất định kháng nguyên (ví dụ 1, 1/2, 1/4...1/n) thì sẽ thấy hiện tượng ngưng kết xảy ra rõ nhất ở một số ống ở giữa, còn trong những ống ở hai đầu ngưng kết rất ít hoặc không có. Đó là hiện tượng khu vực. Ở những ống nghiệm giữa, do liều lượng kháng nguyên và kháng thể tương đương với nhau, hình thành mạng lưới rộng khắp gây ngưng kết toàn bộ kháng nguyên (hồng cầu), phần dung dịch còn lại bên trên gần như trong suốt. Còn trong những ống đầu có chứa kháng thể. Một tiểu phần kháng nguyên có thể kết hợp với nhiều phân tử kháng thể, hay nói một cách khác mỗi phân tử kháng thể không sử dụng hết hoá trị của nó, vẫn còn hoá trị thừa không hình thành được mạng lưới lớn, không kết được thành những đám đủ lớn mà ngưng đọng. Ở những ống sau thì lại thừa kháng nguyên và như vậy không đủ kháng thể để nối tất cả các kháng nguyên với nhau thành mạng lưới, kết quả cũng tương tự như khi thừa kháng thể (xem thêm phần kỹ thuật kết tủa).

b. Các lực ảnh hưởng đến phản ứng ngưng kết

Đây là những lực đã nói trong phản ứng ngưng kết không đặc hiệu tức đậm độ ion, pH của môi trường, nhiệt độ và các chất cao phân tử.

- Đậm độ ion rất cần thiết để đảm bảo phản ứng tiến hành được tốt. Trước tiên phản ứng ngưng kết thường dùng các tế bào có mang kháng nguyên, cho nên cần có một đậm độ ion tối ưu để cho tế bào khỏi bị hư hại (đẳng trương), sau nữa là để các tế bào giữ được trạng thái phân tán đồng đều tương đối ổn định trước sự xảy ra phản ứng kết hợp với kháng thể. Như thế mới tránh được hiện tượng ngưng kết ngẫu phát.

- Vai trò của pH rất rõ khi kháng thể ở đậm độ thấp. Nếu đối với các loại kháng huyết thanh có kháng thể đậm đặc thì không cần chú ý đến pH, song khi pha loãng nhiều hoặc khi dùng những kháng huyết thanh mà hoạt tính kháng thể yếu thì cần duy trì phản ứng ở một pH tối ưu. Do đó mà những phản ứng nhạy đòi hỏi phải dùng dung dịch đệm.

- Nhiệt độ tăng thông thường làm tăng chuyển động Brown và như thế làm cho sự tiếp xúc giữa kháng nguyên và kháng thể được tốt hơn, sự kết hợp giữa các nhóm quyết định kháng nguyên và kháng thể nhiều hơn, làm phản ứng xảy ra nhanh hơn. Song cũng có những kết hợp kháng nguyên - kháng thể đòi hỏi một nhiệt độ tối ưu để hình thành, ví dụ như đối với loại kháng thể nóng thì là 37°C, còn với kháng thể lạnh là 4°C.

- Các chất cao phân tử mà thông thường là các protein không đặc hiệu của huyết thanh có trong kháng huyết thanh giữ một vai trò rất quan trọng trong phản ứng ngưng kết. Các globulin có vẻ làm cho phản ứng ngưng kết dễ xảy ra hơn. Vai trò của các chất cao phân tử được thấy rõ ràng nhất khi làm phản ứng với các kháng thể không hoàn toàn. Lần đầu tiên Race và Wiener (1944) nhận thấy kháng thể chống Rh vẫn bám lên hồng cầu Rh(+) nhưng không gây ngưng kết nếu tiến hành trong nước muối. Về sau, Diamond và Abelson thấy chắc chắn sẽ ngưng kết nếu cho xảy ra trong huyết thanh AB của người, huyết thanh bò hoặc các chất cao phân tử tổng hợp đã được dùng để thay thế (như dextran, PVP...).

Đến nay thì người ta đã rõ là kháng thể không hoàn toàn thường là loại IgG quá ngắn, không chọc thủng được màng tải điện bao quanh hồng cầu, và không làm tròn nhiệm vụ cầu nối giữa hai tiểu phần kháng nguyên. Theo Pollack thì các chất cao phân tử, tùy theo khả năng của mỗi thứ, sẽ giúp phá cái vỏ bọc ion âm quanh hồng cầu làm giảm bớt các lực đẩy giữa chúng với nhau, giúp chúng đến gần nhau hơn để kháng thể IgG đủ sức nối chúng lại. Có lẽ các men tiêu đạm thường dùng để xử lý hồng cầu trước khi cho kết hợp với kháng thể không hoàn toàn như trypsin, bromelin cũng là làm thay đổi lực tải điện âm quanh hồng cầu.

Song trong các chất cao phân tử cũng có những chất gây ức chế phản ứng ngưng kết. Ví dụ như huyết thanh tươi. Theo giả thuyết lý hoá thì chúng làm tăng mức tải điện âm quanh hồng cầu. Cũng có ý kiến cho rằng hiện tượng khu vực chính là do các chất ức chế gây ra cho nên khi pha loãng làm bớt hoạt năng của chúng thì ngưng kết có thể xảy ra được.

2.2.4. Giá trị của phản ứng ngưng kết

Phản ứng ngưng kết là một kỹ thuật rất thông dụng trong miễn dịch vì đơn giản và độ nhạy cao. Tùy theo hệ thống sử dụng, trong những điều kiện tối ưu thì phản ứng cho phép phát hiện những đậm độ khoảng 0,003 microgam nitơ kháng thể trong 1 ml. Độ nhạy đó phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đặc biệt phụ thuộc vào số lượng các nhóm quyết định kháng nguyên trên bề mặt tiểu phần, thể tích các tiểu phần.

2.3. Các hình thức hoạt động của phản ứng ngưng kết

Mặc dù có nhiều loại kỹ thuật khác nhau áp dụng cho từng hoàn cảnh riêng biệt, nhưng nguyên tắc chung đều rất đơn giản và chính nhờ tính chất giản đơn ấy mà kỹ thuật ngưng kết trở nên rất phổ cập. Phản ứng ngưng kết có thể thực hiện dưới hình thức đại thể hay vi thể.

2.3.1. Phản ứng ngưng kết đại thể

Được thực hiện trong những ống nghiệm nhỏ 10 - 100 mm, thường được dùng trong vi khuẩn học. Cách tiến hành nói chung đã được mô tả sơ bộ ở trên và kết quả được đọc ngay hoặc sau khi ủ một thời gian, hoặc sau khi ly tâm nhẹ. Nếu có ngưng kết thì khi lắc nhẹ, những đám ngưng kết sẽ bông bênh nổi lên trong lớp nước trong bên trên, trông rất rõ. Khi phản ứng không xảy ra thì lắc như vậy, đám ngưng tụ sẽ tan ra và các tiểu phần phân tán đều trong dung môi thành một

hỗn dịch như lúc chưa làm phản ứng. Có thể sử dụng một cái gương lõm (gương Kahn) để chiếu dưới đáy ống với luồng ánh sáng chéo nhìn thấy rất rõ những đám ngưng tụ kết nhỏ nếu có.

Đối với một số kháng huyết thanh tạo phản ứng nhanh chóng thì có thể làm ngay trên các lam kính hay trên miếng gạch men trắng như trong việc xác định nhóm máu. Khi này thì nên lắc nhẹ miếng kính, phản ứng ngưng kết sẽ nhanh chóng hình thành.

2.3.2. Phản ứng ngưng kết vi thể

Hiện nay để tiết kiệm thời gian cũng như kháng huyết thanh, nhiều phản ứng ngưng kết được thực hiện trong những ống rất nhỏ hay nói cho đúng hơn là trong những khay bằng chất dẻo trong đó đã đúc sẵn hàng loạt những giếng nhỏ có sức chứa từ 0,5ml đến 1,5ml. Việc pha loãng được bằng những ống hút mao quản 0,2ml hoặc bằng những ống nhỏ tự động cho khoảng 0,025ml hay ít hơn cho mỗi lần nhỏ. Người ta còn sử dụng những “bông pha loãng” giống như chiếc khuy có cán, mỗi lần nhúng xuống dung dịch thì phần rỗng của nó chứa được đúng 0,025ml. Kết quả ngưng kết vi thể không thể tiến hành đọc như với phản ứng đại thể, mà chủ yếu nhìn từ trên xuống, đánh giá cận động trong đáy các giếng của khay. Khi không có ngưng kết thì các tiểu phần lắng xuống đáy thành một hình tròn kín, đều, sắc cạnh. Khi có ngưng kết thì cũng lắng như vậy song cạnh lõm chồm, hoặc hình thành vành ngăn. Khi có ngưng kết mạnh thì thấy rõ những đám tủa dải rộng ra khắp đáy giếng.

Trong trường hợp nghi ngờ thì nên lấy một giọt ở đáy ống (cho phản ứng đại thể) hay ở đáy giếng (cho phản ứng vi thể) dần lên lam kính mà xem dưới kính hiển vi.

2.3.3. Phản ứng ngưng kết trong gel (gelcard) sử dụng định nhóm máu ABO và phát hiện kháng thể bất thường (xem phần định nhóm máu, chương 6)

2.3.4. Phản ứng ngưng kết định lượng

Bằng phương pháp pha loãng có thể đánh giá tương đối lượng kháng thể hoặc kháng nguyên có trong một chất sinh học nào đó. Cũng như đối với phản ứng kết tủa, người ta pha loãng kháng thể hai lần một, trong nhiều ống và để phản ứng ngưng kết hình thành với một lượng kháng nguyên cố định. Trong những ống đầu có thể phản ứng rất yếu vì thừa kháng thể (tiền khu vực). Tiếp đến khu vực có phản ứng rõ ràng rồi phản ứng lại trở nên không rõ ràng ở đầu kia. Như vậy độ pha loãng cao nhất của kháng thể mà còn cho hiện tượng ngưng kết rõ ràng được dùng để biểu thị đậm độ pha kháng thể. Người ta thường dùng con số đảo của độ pha loãng để chỉ hiệu giá kháng huyết thanh. Ví dụ độ pha loãng cao nhất còn gây ngưng kết rõ là $1/n$ thì hiệu giá của kháng huyết thanh ấy sẽ là n .

Song cũng phải nhớ rằng phản ứng ngưng kết khác phản ứng kết tủa là không thể định lượng cận tủa như trong phương pháp Heidelberger Kendall; hơn nữa liều lượng tương đương rất rộng cho nên phản ứng ngưng kết định lượng chỉ có tính chất tương đối, thường cho phép so sánh kết quả của hai thời điểm khác nhau trên cùng một bệnh nhân hoặc so sánh hai huyết thanh khác nhau. Cũng

cần nhấn mạnh rằng muốn những kết quả thu được có thể so sánh được thì cần thiết phải tiêu chuẩn hoá cao kỹ thuật cũng như các thuốc thử. Hơn nữa còn yếu tố con người khi đọc kết quả, cho nên người ta thường khuyên là chỉ nên coi trọng những thay đổi hiệu giá lớn hơn hai lần pha loãng.

2.3.5. Giá trị của phản ứng ngưng kết

Mặc dù những thiếu sót vừa nói trên, phản ứng ngưng kết vẫn là một kỹ thuật rất thông dụng trong miễn dịch học bởi vì nó đơn giản và có độ nhạy cao. Tùy theo hệ thống sử dụng, trong những điều kiện tối ưu thì phản ứng cho phép phát hiện những đậm độ khoảng 0,003 microgam nitơ kháng thể trong 1ml. Độ nhạy đó phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đặc biệt là vào lượng các nhóm quyết định kháng nguyên có trên bề mặt tiểu phần, thể tích của tiểu phần dù nó chỉ làm nhiệm vụ mang các quyết định kháng nguyên mà thôi.

3. Phân loại phản ứng ngưng kết

Tùy theo tiểu phần mang kháng nguyên mà có thể phân biệt hai loại phản ứng sau:

- Phản ứng ngưng kết trực tiếp hay chủ động khi kháng nguyên đã sẵn có trên tiểu phần như kháng nguyên nhóm máu ABO trên hồng cầu, kháng nguyên tự nhiên của vi khuẩn (Hình 5.8).
- Phản ứng ngưng kết gián tiếp, khi kháng nguyên được gắn một cách nhân tạo trên bề mặt của tiểu phần trước khi tiến hành phản ứng. Tiểu phần khi ấy có thể là tế bào ít nhiều đã được xử lý hoặc là chất cao phân tử tổng hợp (như hạt latex).

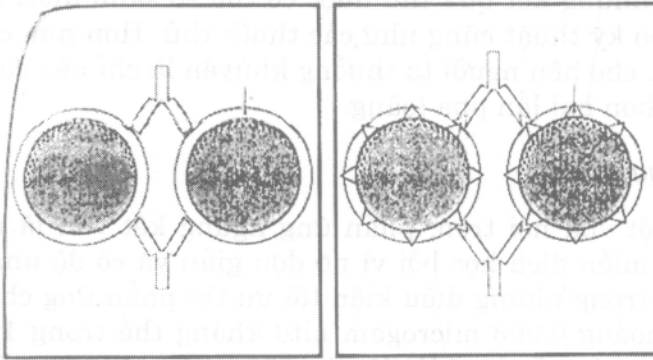
3.1. Phản ứng ngưng kết trực tiếp (hay chủ động)

Phản ứng ngưng kết chủ động hay trực tiếp được dùng rộng rãi trong vi sinh học và huyết học. Trên mặt các vi khuẩn và huyết cầu có mang nhóm quyết định kháng nguyên, có thể bị ngưng kết khi gặp kháng thể tương ứng đặc hiệu. Nhưng trên cùng một tế bào lại có nhiều kháng nguyên khác nhau, cho nên cùng loại tế bào đó có thể bị ngưng kết bởi nhiều kháng huyết thanh, mỗi thứ đặc hiệu cho một kháng nguyên.

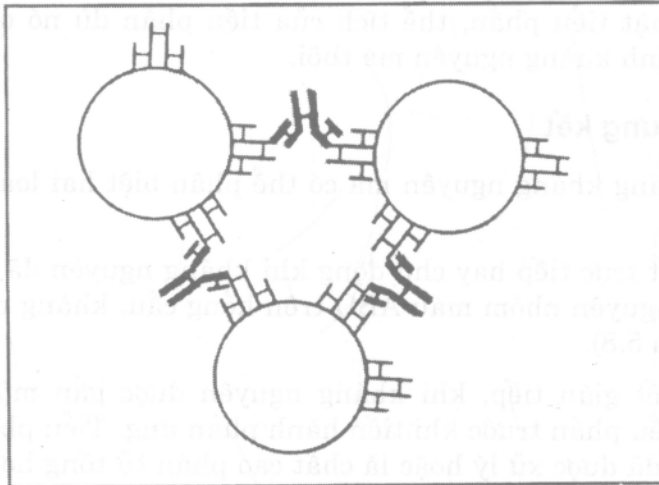
Mặt khác, một kháng huyết thanh có thể chứa nhiều kháng thể cho nên khi muốn có một loại kháng huyết thanh đơn đặc hiệu (tức chỉ phản ứng với một nhóm quyết định kháng nguyên) thì phải hấp phụ nó, loại bỏ những kháng thể không cần thiết.

3.1.1. Phản ứng ngưng kết trực tiếp hồng cầu và vi khuẩn

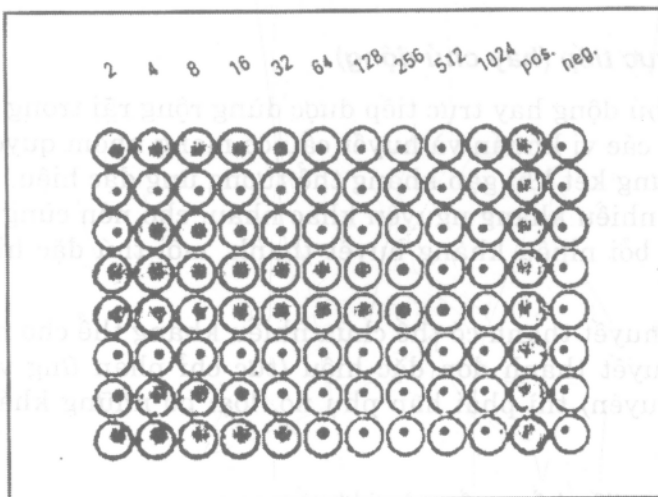
Một số chủng vi khuẩn gây ngưng kết hỗn dịch hồng cầu, hiện tượng này không do cơ chế miễn dịch vì không có ngưng kết tổ mà là do cấu trúc đặc biệt của một số chủng vi khuẩn. Nếu đem trộn hỗn dịch vi khuẩn ấy với hỗn dịch hồng cầu thì sẽ có ngưng kết. Phản ứng thường được dùng trong nghiên cứu để phân loại chủng vi khuẩn có fimbriae hay không, như để phân biệt *Hemophilus aegyptius* với *Hemophilus influenza*.



A: Kháng thể IgG đã phản ứng với KN trên bề mặt HC tạo nên hạt ngưng kết



B: Kháng thể thiếu (đơn hoá trị) có mặt trên mặt HC không tạo hạt ngưng kết. Nhưng khi cho thêm anti-globulin hạt ngưng kết tức khắc được tạo thành (nét đậm là anti-yglobulin)



C: Đĩa phản ứng ngưng kết:
- Huyết thanh pha loãng 1/2, 1/4, ...
- Các lỗ chứng (+), chứng (-)
- Lỗ không ngưng kết: HC lắng gọn xuống đáy lỗ
- Lỗ có ngưng kết (+) HC lắng lan toả toàn bộ đáy lỗ.

Hình 5.8: Mô hình phản ứng ngưng kết trực tiếp

A: Phản ứng ngưng kết trực tiếp của KT typ IgG với KN hồng cầu

B: Phản ứng ngưng kết bởi kháng globulin (anti-globulin) với kháng thể thiếu đã phản ứng với KN trên bề mặt hồng cầu-anti-globulin đã liên kết với kháng thể thiếu tạo thành các hạt ngưng kết (Coombs trực tiếp)

C: Đĩa phản ứng ngưng kết

3.1.2. Phản ứng ngưng kết trực tiếp trong huyết học

Các tế bào máu đều mang trên bề mặt rất nhiều kháng nguyên đặc hiệu cho nên về nguyên tắc, phản ứng ngưng kết trực tiếp có thể áp dụng cho chúng được nếu ta có kháng huyết thanh tương ứng. Đối với bạch cầu và tiểu cầu, do bản thân chúng cũng dễ tự nhiên kết dính với nhau cho nên phản ứng ngưng kết mất tính chính xác và thường phải dùng kỹ thuật tế bào. Đối với hồng cầu thì phản ứng này được dùng rất rộng rãi để phát hiện kháng nguyên khi biết kháng thể hoặc ngược lại. Các kỹ thuật bao gồm:

- Xác định nhóm máu hệ ABO (xem phần kỹ thuật xác định nhóm máu hệ ABO).

- Phản ứng ngưng kết chéo (xem phần phương pháp thử phản ứng chéo người cho và người nhận).

- Xác định nhóm máu thuộc các hệ thống khác (xem phần kỹ thuật định nhóm máu khác của hệ hồng cầu).

- Xác định ngưng kết tổ không hoàn toàn. Nghiệm pháp Coombs (xem phần nghiệm pháp Coombs).

- Những nhầm lẫn trong nhận định phản ứng ngưng kết định nhóm máu

Trong việc đọc kết quả ngưng kết cũng có thể có nhầm lẫn. Sau đây là một số nhầm lẫn có thể gặp cần biết để đề phòng.

(1) Trường hợp có ngưng kết mà đọc nhầm là không có. Sai lầm này có mấy nguyên nhân chính sau:

- Đọc quá vội vàng nên không chú ý cẩn thận, nhất là khi sử dụng những ống nghiệm nhỏ. Không lắc kỹ, trộn đều nên khi ly tâm hồng cầu lắng xuống trước khi có kết hợp kháng nguyên - kháng thể. Cho nên có nơi người ta không ly tâm mà để tủ ấm 37° trong một giờ rồi đọc kết quả. Kết quả cho chính xác hơn song mất nhiều thời gian hơn.

- Hiện tượng ngưng kết quá yếu do kháng huyết thanh yếu, hồng cầu xấu, hay là do tỷ lệ giữa hồng cầu và kháng huyết thanh không thích hợp cho nên xuất hiện hiện tượng khu vực đã nói trên.

(2) Trường hợp ngưng kết giả. Có đôi khi phản ứng cho kết quả đại thể như là có ngưng kết, nhưng nếu nhìn qua kính hiển vi thì không thấy hồng cầu ngưng tụ với nhau mà chỉ thấy chúng tập hợp dính chặt nhau làm thành từng chuỗi như chuỗi tiền. Hiện tượng này thường thấy trong những trường hợp dùng loại kháng huyết thanh mẫu có đậm độ protein hoặc hiệu giá cao, hay khi hồng cầu định thử bị thay đổi (của bệnh nhân viêm phổi, sốt rét, cúm, bệnh đa u tủy...). Muốn phân biệt, có thể pha loãng giọt máu trong dung dịch sinh lý, nếu ngưng kết thật thì đám hồng cầu sẽ lắng xuống dưới. Nếu là ngưng kết giả thì hồng cầu sẽ trộn đều với huyết thanh mà cho mỗi hỗn dịch màu hồng.

(3) Hiện tượng Thomsen hay là ngưng kết do vi khuẩn. Hiện tượng này xảy ra khi hồng cầu mẫu hay kháng huyết thanh mẫu dùng lâu bị nhiễm khuẩn. Ngưng kết xảy ra không phải do kết hợp kháng nguyên - kháng thể đặc hiệu nhóm máu

mà là do những thay đổi do vi khuẩn gây ra trên mặt hồng cầu và trong huyết thanh. Cho nên những thứ dùng nhiều lần trong phản ứng phải giữ cho được vô trùng và bảo quản trong tủ lạnh. Khi nghi ngờ có nhiễm khuẩn thì phải bỏ.

(4) Hiện tượng loạn ngưng kết. Có tác giả cho rằng hiện tượng này và hiện tượng Thomsen là một song thực ra loạn ngưng kết có thể gặp không phải trong nhiễm trùng mà là do dùng hồng cầu trữ lâu ngày trong nhiệt độ cao. Đây là hiện tượng ngưng kết lan tràn với tất cả mọi loại kháng huyết thanh hợp cũng như không hợp. Cách đề phòng là trữ hồng cầu trong nhiệt độ thích hợp và thay hồng cầu mới.

(5) Hiện tượng tự ngưng kết. Đôi khi giữa hồng cầu và huyết thanh của cùng một người có phản ứng ngưng kết. Hiện tượng này có thể gặp ở những người bị đau gan, vàng da sung huyết hay bị mẫn cảm với thuốc. Đó là bệnh tự miễn và cần phát hiện tự ngưng kết tố (xem phần dưới).

(6) Ngưng kết tố lạnh. Trong mùa lạnh, khi nhiệt độ của một số người gây ngưng kết với các loại hồng cầu. Nhưng khi cho phản ứng tiến hành trong nhiệt độ ấm thì không xuất hiện. Đó là trong huyết thanh có ngưng kết tố lạnh, một loại kháng thể chỉ hoạt động trong nhiệt độ thấp. Có thể khử bằng cách đun huyết thanh lên 56°C trong một giờ.

(7) Ngưng kết do phụ loại: Các phụ loại của nhóm máu A có thể gây nên những hiện tượng ngưng kết không rõ ràng hoặc ngưng kết giả. Ví dụ như ngưng kết tố chống A_2 có phản ứng với hồng cầu loại O hoặc như hồng cầu loại A_2B dễ nhầm với loại B.

3.2. Phản ứng ngưng kết gián tiếp (thụ động)

3.2.1. Nguyên lý: Phản ứng này có độ nhạy cao nên dùng để phát hiện các kháng thể chống lại các KN hoà tan mà phản ứng tủa không phát hiện được. Người ta gắn các phân tử KN hoà tan lên bề mặt các tiểu phần tự nhiên (hồng cầu) hay nhân tạo (latex, bentonit...), các tiểu phần có tác dụng như giá đỡ. Phản ứng xảy ra khi trộn với huyết thanh có KT tương ứng.

3.2.2. Các phản ứng ngưng kết thụ động

Phản ứng ngưng kết thụ động được sử dụng nhiều trong vi sinh vật, huyết học để phát hiện KT hoà tan. Gần đây, người ta áp dụng nguyên lý này để sản xuất kit SERODIA để sàng lọc HIV trong truyền máu.

KỸ THUẬT ĐO HOẠT TÍNH BỔ THỂ

1. Nguyên lý

Hồng cầu khi được mẫn cảm đầy đủ với kháng thể tan máu (hemolyzin) sẽ bị dung giải nhiều hay ít tùy theo lượng bổ thể có mặt, nghĩa là tùy theo hoạt tính bổ thể. Như vậy đây là đo hoạt tính tổng hợp của tất cả các thành phần bổ thể.

Chỉ cần một trong các thành phần của bổ thể giảm hoặc thiếu cũng đủ làm hoạt tính chung bị ảnh hưởng, vì phản ứng dây chuyền bị gián đoạn, tế bào kháng nguyên không bị tan.

2. Dụng cụ, thuốc thử, hoá chất

- Ly tâm
- Ống nghiệm
- Hồng cầu cừu (máu cừu chống đông)
- Huyết thanh tan máu
- Huyết thanh cần xét nghiệm (xét nghiệm trong vòng 6 giờ sau khi lấy máu).
- Nước muối sinh lý 0,9%

3. Quy trình kỹ thuật

- Cắm nhiễm hồng cầu: Hồng cầu cừu rửa 3 lần bằng NaCl 0,9% (ly tâm 1500-2000 vòng/phút/10 phút), pha thành hỗn dịch hồng cầu 5% với huyết thanh mặn đẳng trương. Sau đó trộn huyết thanh tan máu với hồng cầu cừu đã pha loãng 5%, tỷ lệ bằng nhau, ủ 37°C trong một giờ, cứ 30 phút lắc một lần.

- Tiến hành phản ứng: Lấy 10 ống nghiệm nhỏ, dùng pipette lần lượt đóng các dung dịch (Bảng 5.9).

Bảng 5.9: Độ pha loãng huyết thanh trong kỹ thuật đo hoạt tính bổ thể

Số ống	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Huyết thanh xét nghiệm (giọt)	4	4 -->	4	4	4	4	4	4	4	4 -->
Nước muối sinh lý	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Hỗn dịch hồng cầu 5% đã cảm nhiễm	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Độ pha loãng	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512

- Trừ ống nghiệm đầu, các ống nghiệm còn lại đều nhỏ 4 giọt nước muối. Ở ống số 10, lấy 4 giọt dung dịch bỏ đi.

- Ủ ở tủ ấm 37°C/30 phút, sau đó quay ly tâm 2000 vòng/1 phút, đọc kết quả.

4. Kết quả

- Đọc kết quả bằng mắt thường, xem hiện tượng tan máu (không thấy còn hồng cầu lắng xuống đáy ống nghiệm). Tìm ống nào ở đó, lượng bổ thể vừa đủ để làm tan 100% hồng cầu.

- Với huyết thanh người bình thường, tan máu ở hiệu giá 1/16; 1/32 (ống 5,6)

- Hiệu giá bổ thể tăng trong một số bệnh, một số trạng thái: viêm khớp, nhiễm nóng, nhiễm xạ.

– Hiệu giá bổ thể giảm do tham gia các phản ứng kết hợp kháng nguyên - kháng thể: bệnh thiếu máu tan máu do kháng thể lạnh, tan máu do miễn dịch... hoặc bị sử dụng nhiều trong một số trường hợp viêm (viêm phổi, thương hàn...).

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Lượng hồng cầu không chuẩn được một cách chính xác
- Huyết thanh được thử pha loãng theo hệ số 2, vì vậy khó phát hiện những hiệu giá trung gian làm tan hết hồng cầu.

KỸ THUẬT PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ KHÁNG NHÂN

1. Nguyên lý

Trong bệnh lý tự miễn, cơ thể tự sinh ra kháng thể chống lại các kháng nguyên của bản thân. Dựa trên nguyên lý sự kết hợp giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu để phát hiện các kháng thể kháng nhân trong cơ thể. Ở đây, chúng tôi giới thiệu hai kỹ thuật để phát hiện: Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang và kỹ thuật ngưng kết. Có nhiều loại tự kháng thể:

- Loại chống deoxyribonucleoprotein, biểu hiện bằng hình ảnh huỳnh quang đồng nhất phủ lên toàn bộ nhân tế bào. Hiệu giá cao rất có giá trị trong chẩn đoán và tiên lượng.
- Loại chống phân tử ADN xoắn kép biểu hiện bằng mẫu phát quang hình vòng (kháng thể đặc hiệu nhất cho bệnh lupus).
- Loại chống các thành phần khác trong nhân biểu hiện bằng sự phát quang lốm đốm, tính đặc hiệu không cao trong lupus, bao gồm: kháng nguyên Smith (Sn), kháng nguyên protein ribonucleo (có trong nhiều bệnh: lupus, xơ cứng bì, nhiễm collagen...), kháng nguyên Ro (do Robert phát hiện) và kháng nguyên Lane (do Lane phát hiện).

2. Phát hiện kháng thể kháng nhân bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang

2.1. Dụng cụ, hoá chất

- Tiêu bản gắn kháng nguyên (Dùng các lam kính gắn sẵn các tế bào nuôi cấy như tế bào Wil-2 hoặc tế bào Hep-2, hoặc dùng hồng cầu gà, hồng cầu chim xử lý trước).
- Anti-IgG-FITC
- Kính hiển vi huỳnh quang
- Dung dịch đệm PBS
- Xanh Evans, Glycerin, lamen.

- Huyết thanh chứng:
- + Chứng dương: huyết thanh bệnh nhân lupus giai đoạn cấp.
- + Chứng âm: Huyết thanh người bình thường, càng trẻ càng tốt.

2.2. Quy trình kỹ thuật

- Nhỏ mẫu huyết thanh cần thử, chứng dương, chứng âm lên tiêu bản đã gắn sẵn kháng nguyên.
- Ủ tiêu bản trong tối ở nhiệt độ phòng (30 phút)
- Dùng đệm PBS rửa sạch kháng thể thừa.
- Phủ anti-IgG-FITC
- Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng
- Rửa lại 3 lần bằng đệm PBS, để khô tự nhiên
- Nhỏ glycerin, phủ lamén, đọc kết quả trên kính hiển vi huỳnh quang

2.3. Nhận định kết quả

Xét nghiệm dương tính khi có một trong các mẫu phát quang sau:

- Mẫu phát quang đồng nhất (lan toả hoặc dày đặc): phản ánh các kháng thể chống deoxyribonucleoprotein. Nếu có hiệu giá cao thì thường có bệnh lupus ban đỏ hệ thống hoạt động. Khi bệnh thoái lui thì hiệu giá giảm.
- Mẫu phát quang hình vòng: phản ánh các kháng thể chống ADN kép xoắn, có tính đặc hiệu cao nhất trong bệnh lupus ban đỏ hệ thống (dễ nhận thấy khi dùng bạch cầu người làm nền).
- Mẫu phát quang lốm đốm: phản ánh nhiều loại kháng thể chống lại nhiều loại kháng nguyên là thành phần của nhân tế bào (kháng nguyên: Sm, n-RNP, Ro, La).
- Ngoài 3 mẫu phát quang trên, còn có mẫu phát quang hạt nhân (điểm sáng tập trung trong nhân, không trải đều trên toàn bộ nhân tế bào), đây là các kháng thể chống hạt nhân.

2.4. Các yếu tố ảnh hưởng

- Độ pha loãng huyết thanh: Đối với kháng nguyên là tiêu bản tế bào Hep-2, độ pha loãng huyết thanh bệnh nhân là 1/80 để tránh dương tính giả.
- Phát quang giả: Cần luôn luôn tiến hành chứng âm và chứng dương kèm theo để so sánh kết quả.

3. Phát hiện kháng thể kháng nhân bằng kỹ thuật ngưng kết

Trong bộ kit phát hiện kháng thể kháng n-DNA (native deoxyribonucleic acid) của hãng Human đã có đủ hoá chất và vật liệu để tiến hành phản ứng phát hiện kháng thể kháng nhân. Sau đây, chúng tôi xin tóm tắt thành phần kit và quy trình tiến hành xét nghiệm.

3.1. Thành phần

- Huyền dịch hạt latex có gắn n-DNA (lọ nút trắng)
- Chứng dương (lọ nút đỏ)
- Chứng âm (lọ nút xanh)
- 01 tấm nhựa có 6 ô để tiến hành phản ứng
- Que khuấy

Bảo quản: 2-8°C

Mẫu thử: Dùng huyết thanh bệnh nhân cho phản ứng. Nếu huyết thanh lấy trong vòng 48 giờ thì bảo quản ở 2-8°C.

3.2. Quy trình kỹ thuật

Mang hoá chất và huyết thanh cần thử về nhiệt độ phòng, lắc đều lọ đựng hạt latex trước khi sử dụng

Trên phiến nhựa phản ứng, đặt trong mỗi ô (giọt):

Hoa chất	ô 1	ô 2	ô 3
Chứng dương	1		
Chứng âm		1	
Mẫu huyết thanh cần thử			1
Hạt latex gắn kháng nguyên	1	1	1

Dùng que khuấy trộn đều huyền dịch gắn kháng kháng nguyên và huyết thanh thử (hoặc chứng dương, chứng âm), đọc phản ứng ngưng kết trong vòng 2 phút.

3.3. Nhận định kết quả

Đọc kết quả chứng trước, chứng dương có các hạt ngưng kết thành từng đám nhỏ và chứng âm không có các đám ngưng kết. So sánh kết quả mẫu huyết thanh cần thử và chứng dương, chứng âm để kết luận.

3.4. Các yếu tố ảnh hưởng

- Tấm phản ứng bẩn, ướt có thể làm sai kết quả, cần rửa sạch, sấy khô trước khi tiến hành phản ứng.
- Huyết thanh bệnh nhân cần thử phải được tách cẩn thận, tránh vỡ hồng cầu.

4. Phản ứng Waaler-Rose

4.1. Nguyên lý

Phản ứng Waaler-Rose là phản ứng ngưng kết thụ động để phát hiện yếu tố dạng thấp xuất hiện trong huyết thanh của các bệnh nhân bị bệnh viêm khớp dạng thấp. Yếu tố dạng thấp là một loại protein có khả năng ngưng kết các hồng cầu đã được ủ với globulin hoặc kháng thể. Lấy huyết thanh của bệnh nhân viêm khớp dạng thấp trộn với hồng cầu đã phủ IgG người, yếu tố dạng thấp sẽ kết hợp với IgG và kéo theo ngưng kết hồng cầu.

4.2. Dụng cụ, hoá chất

- Hồng cầu O, Rh (-) đã rửa sạch với nước muối 0,9%
- Huyết thanh thô kháng hồng cầu O
- Ống nghiệm
- Pipette Pasteur
- Mẫu huyết thanh bệnh nhân cần thử.

4.3. Quy trình kỹ thuật

- Chuẩn bị dung dịch hệ thống phát hiện:
 - + Hồng cầu O rửa 4 lần bằng NaCl 0,9%, pha thành huyền dịch hồng cầu 5%
 - + Pha 1 thể tích huyền dịch hồng cầu 5% với 1 thể tích huyết thanh thô kháng hồng cầu O (đã hiệu giá), để ở tủ ấm 37°C/1 giờ.

- Tiến hành phản ứng:

Trong 12 ống nghiệm được đánh số từ 1 - 12, nhỏ dung dịch theo thứ tự (Bảng 5.10).

Bảng 5.10: Độ pha loãng huyết thanh trong kỹ thuật Waaler-Rose

Ống	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Huyết thanh bệnh nhân (giọt)	4	4	-->									
NaCl 0,9% (giọt)		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Độ pha loãng	1	1/ 2	1/ 4	1/ 8	1/ 16	1/ 32	1/ 64	1/ 128	1/ 256	1/ 512	1/ 1024	1/ 2048

Sau khi pha xong, cho vào mỗi ống 2 giọt dung dịch hệ thống phát hiện đã chuẩn bị ở trên. Lắc đều, để vào tủ ấm 37°C/1 giờ.

Lấy ra xem hiện tượng ngưng kết bằng kính lõm (đọc sơ bộ kết quả lần 1)

Đặt vào 4°C trong 18 giờ, đọc kết quả lần 2.

4.4. Nhận định kết quả

Với phương pháp này:

- Nếu ở độ pha loãng 1/16 trở xuống ngưng kết coi như phản ứng âm tính
- Nếu ở độ pha loãng 1/32 trở nên có ngưng kết là phản ứng dương tính

4.5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Xét nghiệm dương tính từ 70-90% các trường hợp viêm khớp dạng thấp, nhưng chỉ dương tính > 6 tháng sau khi khởi phát bệnh. Ngoài ra, xét nghiệm còn dương tính trong một số bệnh khác như xơ gan, bệnh phong, giang mai, các bệnh hệ thống (SLE 35%, cứng bì 40%...).

- Xét nghiệm âm tính trong một số bệnh khớp khác: Thấp khớp cấp tính, hư khớp, viêm cứng khớp sống.

KỸ THUẬT ĐIỆN DI MIỄN DỊCH

1. Nguyên lý

Trong một điện trường, các thành phần protein sẽ di chuyển đến những vị trí khác nhau tùy theo sự tích điện của chúng (quá trình điện di). Sau khi điện di, nếu cho kháng huyết thanh tương ứng vào một rãnh dọc theo sự di chuyển của hỗn hợp protein thì các thành phần protein (kháng nguyên) và kháng huyết thanh (kháng thể) sẽ khuếch tán và tạo thành các đường kết tủa đặc hiệu tại các vị trí chúng tiếp xúc (quá trình miễn dịch).

2. Dụng cụ, hoá chất

- Máy điện di
- Bàn thẳng bằng
- Dung dịch đệm Veronal pH = 8,2-8,6, ion lực 0,05
- Thạch 2% pha trong đệm pH = 8,2-8,6
- Kháng huyết thanh đã được miễn dịch đạt tiêu chuẩn
- Lam kính trong 2,5-7,5cm
- Dung dịch tẩy
- Dung dịch nhuộm protein: amidoschwars

3. Quy trình kỹ thuật

- Pha thạch trong dung dịch đệm Veronal pH = 8,2-8,6 trong bình thủy tinh. Nếu thạch Việt Nam pha 2%, nếu thạch ngoại pha 1,5%. Cứ 100 ml thạch cho 0,2ml dung dịch methiolat để chống nhiễm khuẩn. Đun thạch cho đến khi không còn bọt khí là được, đổ thạch lên lam dùng ngay hoặc chia vào các ống nghiệm để dùng dần.

- Đun cách thuỷ ống thạch cho tan hoàn toàn rồi nhỏ 1 giọt lên lam, dùng que thuỷ tinh sạch phết thành 1 lớp mỏng trên lam rồi để khô trong tủ sấy 56°C/15-20 phút làm chân thạch.

- Lấy lam thạch đã phết chân ra, đặt trên bàn thẳng bằng, đổ mỗi lam 4 ml thạch pha như trên.

- Để thạch đông hoàn toàn khoảng 1 giờ rồi đục lỗ và rãnh theo mẫu
- Nhỏ vào mỗi lỗ 20 microlit huyết thanh bệnh nhân và huyết thanh chứng
- Đặt lam thạch vào bể điện di, dùng giấy thấm làm cầu nối với dung dịch đệm
- Nhỏ eosin để đánh dấu điểm dừng.
- Chạy điện di với hiệu thế 15 Von/1 lam, thời gian chạy tùy khoảng từ 1 giờ 30 - 2 giờ.

– Lấy lam thạch ra, hớt bỏ rãnh, nhỏ kháng huyết thanh vào đáy rãnh, rồi cho vào buồng ẩm, đọc kết quả sau 24 giờ.

– Nếu cần lưu tiêu bản, đem sấy khô và nhuộm như sau:

+ Sau khi đọc kết quả xong, ngâm lam thạch vào NaCl 0,9% trong 3 ngày, mỗi ngày thay NaCl 0,9% 1-2 lần cho sạch các protein thừa.

+ Vớt lam ra, hút hết nước muối có trong rãnh và lỗ rồi đổ bù thạch 1% cho đáy rãnh và lỗ. Phủ lên lam thạch một lớp giấy thấm, để khô tự nhiên.

+ Bóc bỏ lớp giấy thấm, rửa sạch sợi giấy thấm

+ Nhuộm protein: ngâm lam thạch trong dung dịch Amidoschwarz 10 phút.

+ Tẩy bỏ thuốc nhuộm thừa bằng cách ngâm lam thạch trong dung dịch acid acetic 2% (có 10% glycerin). Nên có 4 - 5 bể nhuộm liên tiếp để ngâm lần lượt mỗi bể 2 phút. Để khô ở nhiệt độ phòng, đọc kết quả.

4. Nhận định kết quả

Kỹ thuật điện di miễn dịch có thể tách được tới 35 thành phần khác nhau của protein huyết thanh.

So sánh giữa vạch tua của huyết thanh chứng và vạch tua của huyết thanh bệnh nhân cần thử để kết luận sự có mặt hay tăng, giảm của các chuỗi gamma globulin (chuỗi nặng, chuỗi nhẹ).

Điện di miễn dịch được sử dụng để chẩn đoán các tình trạng bệnh lý như không có gamma globulin, giảm protein huyết thanh, các bệnh nhiễm khuẩn, bệnh Kahler...

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Kháng huyết thanh không tinh khiết hoặc quá hạn sử dụng.
- Huyết thanh bệnh nhân bị vỡ hồng cầu
- Cát thạch không cân đối làm đường tua không chính xác
- Điều chỉnh điện thế và cường độ dòng điện không đúng làm cho quá trình điện di chạy nhanh quá hoặc chậm quá dẫn đến đường tua không chính xác.

KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN BIỆT HOÁ TRÊN BỀ MẶT TẾ BÀO MÁU

1. Nguyên lý

Kháng nguyên biệt hoá (cluster differentiation antigen) ký hiệu CD hiểu theo nghĩa rộng bao gồm tất cả các loại protein xuất hiện trên bề mặt tế bào bạch cầu trong suốt trong quá trình biệt hoá từ khi được sinh ra từ tế bào nguồn (stem cell) đến khi hoàn thành chức năng. Phát hiện được các kháng nguyên biệt hoá

giúp nhận biết được giai đoạn phát triển của từng loại tế bào cũng như quá trình bệnh lý của chúng. Một trong những ứng dụng cơ bản của kỹ thuật xác định kháng nguyên biệt hoá (CD) là phân loại leukemia và nghiên cứu tình trạng bệnh lý có liên quan đến rối loạn miễn dịch. Dựa trên nguyên lý kỹ thuật miễn dịch đánh dấu: dùng một chất đánh dấu (chất màu huỳnh quang, chất phóng xạ hay men...) gắn vào kháng nguyên hoặc kháng thể để phát hiện ra kháng thể hoặc kháng nguyên tương ứng ở mức vi thể (tổ chức, tế bào...) hoặc định lượng chất đó ở mức vi lượng. Kỹ thuật xác định kháng nguyên biệt hoá dùng chất màu huỳnh quang để đánh dấu nên còn gọi là kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang.

2. Dụng cụ, hoá chất

Ở đây, chúng tôi trình bày kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trực tiếp (MDHQT), một kỹ thuật phổ biến hiện nay ứng dụng trong phân loại leukemia và xác định tình trạng miễn dịch của cơ thể trong một số bệnh lý.

- Kính hiển vi huỳnh quang
- Máy ly tâm lạnh
- Máy đếm tế bào (đếm số lượng bạch cầu)
- Ống nghiệm
- Lamen, lam kính
- Các loại kháng thể kháng CD - tùy theo mục đích nghiên cứu
- Các loại hoá chất khác: Dung dịch ficoll-Isopaque 1,060, dung dịch phá hồng cầu, dung dịch cố định tế bào, dung dịch đệm PBS, bộ kit chứng...

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Quy trình kỹ thuật MDHQT phân loại leukemia

3.1.1. Kỹ thuật phân lập tế bào blast trong mẫu nghiệm tuỷ xương

- Điều chỉnh số lượng tế bào có nhân trong dịch hút tuỷ xương ở mật độ $10 - 15 \times 10^9/l$
- Chuẩn bị dung dịch ficoll-Isopaque 1.060, đặt 2 ml ficoll vào đáy ống nghiệm $10 \times 100mm$.
- Đặt nhẹ nhàng 4 ml huyền dịch tế bào lên bề mặt lớp ficoll, tránh trộn lẫn giữa hai lớp.
- Ly tâm 2200 vòng x 20 phút ở $16^{\circ}C$, hút bỏ dịch nổi
- Thu hoạch lớp tế bào màu trắng đục ở giữa, rửa 3 lần trong đệm PBS
- Kiểm tra tỷ lệ tế bào sống chết bằng xanh trypan 0,1%: tế bào chết sẽ bị nhuộm xanh trypan trong nguyên sinh chất. Đảm bảo tỷ lệ tế bào sống trên 90%. Có thể kiểm tra tỷ lệ tế bào blast bằng cách huyền dịch lại với huyết tương của chính bệnh nhân và dần tiêu bản, nhuộm Giemsa và đọc tiêu bản. Tiến hành xét nghiệm MDHQT ngay sau khi tách. Nếu tỷ lệ blast tuỷ xương cao $> 90\%$ tế bào có nhân thì không cần tách blast.

3.1.2. Kỹ thuật MDHQT

- Điều chỉnh huyền dịch tế bào ở mật độ $5 - 10 \times 10^9/l$, lắc đều
- Trong các ống nghiệm sạch, kích thước 10×100 mm, đánh dấu mẫu nghiệm, đặt nhẹ nhàng $0,1ml$ huyền dịch tế bào xuống đáy ống, tránh dính mẫu nghiệm lên thành ống. Đặt tiếp $0,02ml$ dung dịch anti-CD tương ứng vào đáy ống, trộn đều.
- Ủ trong tối ở nhiệt độ phòng thời gian 30 - 45 phút, cứ 10 phút lại lắc đều 1 lần.
- Phá hồng cầu bằng dung dịch phá hồng cầu, trong 7 - 10 phút đến khi màu của huyền dịch trong suốt là được.
- Rửa bằng dung dịch PBS: ly tâm 1500 vòng x 15 - 20 phút ở $25 - 25^\circ C$, hút bỏ dịch nổi. Rửa liên tiếp 3 lần.
- Cố định cặn tế bào còn lại bằng dung dịch cố định ($0,05ml$), bảo quản trong tối ở nhiệt độ $2 - 6^\circ C$ đến khi đọc kết quả (trong vòng 24 giờ).
- Đọc kết quả trên kính hiển vi huỳnh quang, bước sóng 450-492nm, vật kính 40:
 - Anti-CD gắn FITC (CD3, CD10): màu xanh lục
 - Anti-CD gắn PE (CD5 hoặc CD7, CD14, CD19, CD16/56, CD33, CD34): màu vàng cam.
 - Các kit chứng đều gắn cả FITC lẫn PE. Đọc chứng âm, xác định nền tế bào âm tính. Đánh giá tỷ lệ % blast dương tính.

3.2. Quy trình kỹ thuật MDHQT trong nghiên cứu phân bố tế bào miễn dịch

- Đếm số lượng tế bào có nhân trong mẫu nghiên cứu (máu hoặc dịch hút tủy xương) bằng máy đếm tế bào. Điều chỉnh mật độ tế bào ở mức $5 - 10 \times 10^9/l$.
- Trong các ống nghiệm sạch kích thước $7 \times 10mm$, đánh dấu mẫu nghiên cứu, đặt $0,1ml$ huyền dịch tế bào xuống đáy ống nghiệm (tránh dính lên thành ống), sau đó đặt tiếp $0,02ml$ anti-CD tương ứng, trộn đều nhẹ nhàng.
- Các bước tiến hành tiếp theo như kỹ thuật MDHQT phân loại leukemia.

4. Nhận định kết quả

- Chứng âm: để xác định tình trạng gắn huỳnh quang không đặc hiệu và tình trạng tự phát quang của tế bào.
- Đọc kết quả, đếm từ 200 tế bào có nhân trở lên, tính tỷ lệ phần trăm tế bào phát quang trên số tế bào có nhân. Các tế bào sẽ phát màu xanh lục (chất màu huỳnh quang FITC) (CD3, CD4) và màu vàng cam (chất màu huỳnh quang PE) (CD 8, CD16/56, CD34).
- Tính số lượng tuyệt đối: nhân tỷ lệ tế bào phát quang từng loại với số lượng tuyệt đối tế bào có nhân (đếm trên máy đếm tế bào).

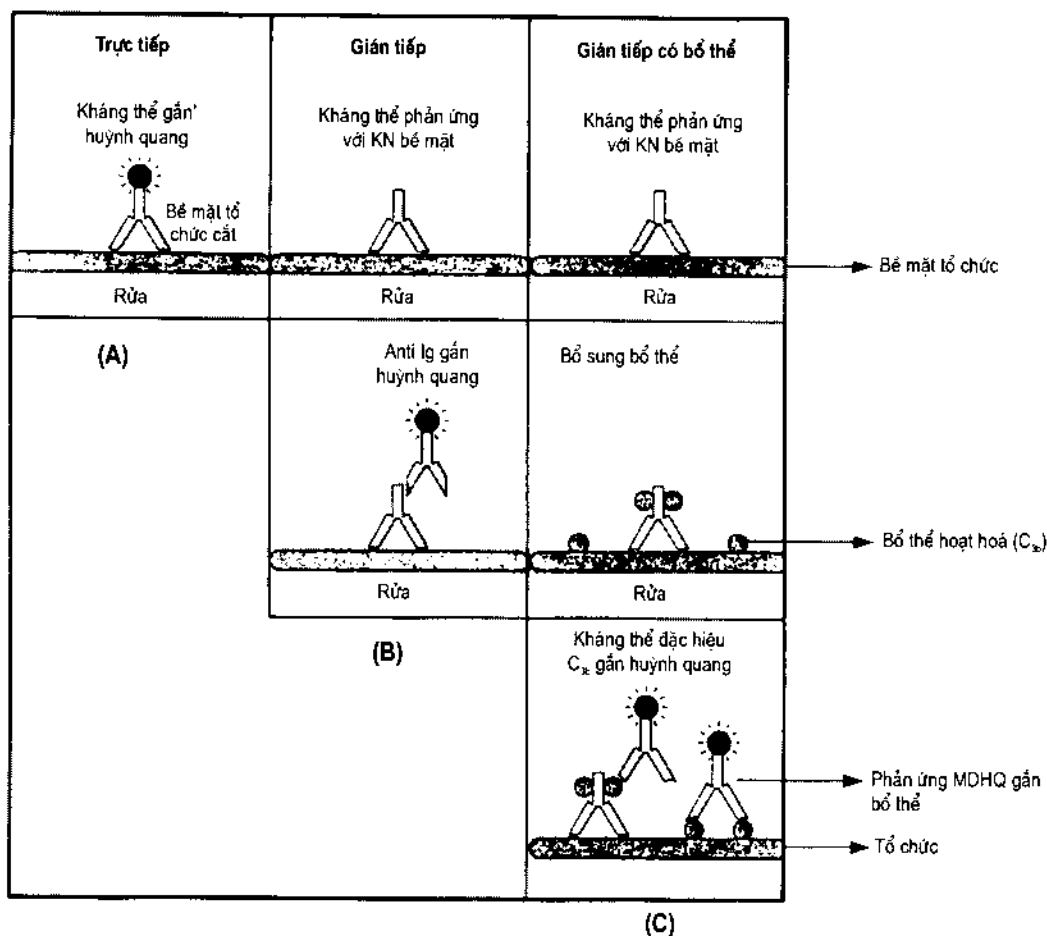
5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Đếm số lượng tế bào có nhân không chính xác
- Tình trạng tự phát quang của tế bào trong bệnh lý ác tính của tế bào máu

- Quá ít tế bào
- Phát quang giả

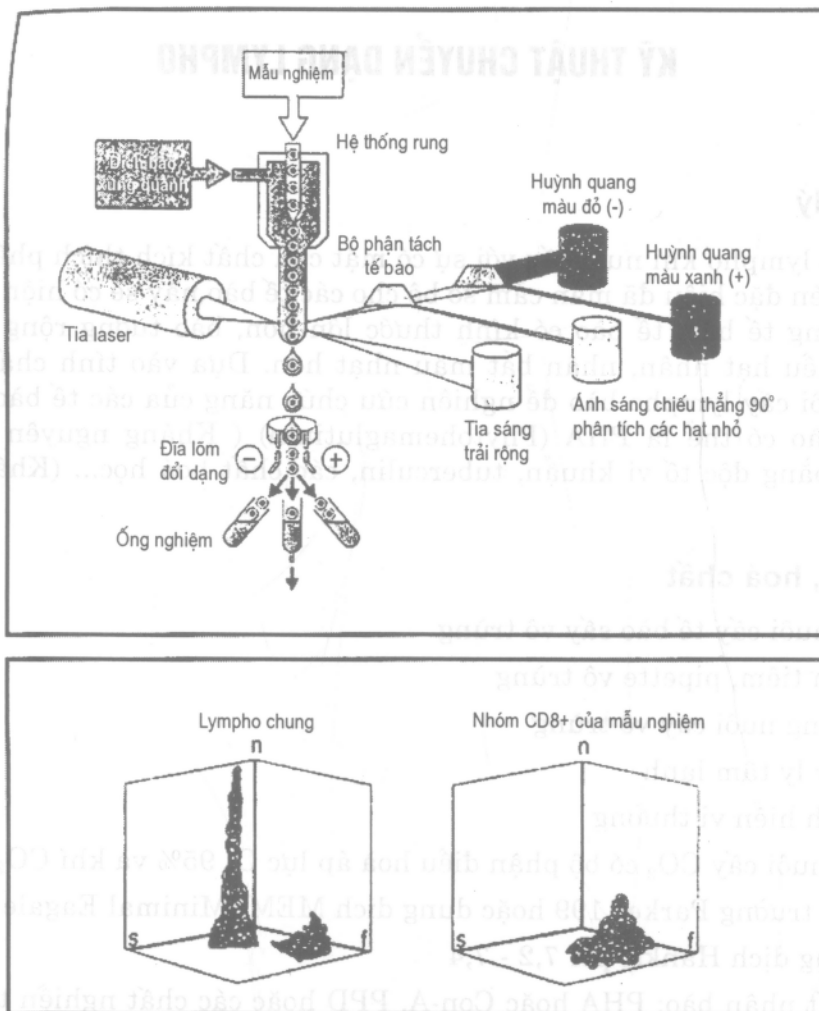
6. Ghi chú

Kỹ thuật MDHQ là kỹ thuật nhanh nhằm phát hiện kháng nguyên đặc hiệu trên bề mặt tế bào hoặc tổ chức cắt. Phương pháp này bao gồm 4 kỹ thuật: MDHQTT dùng KT đặc hiệu gắn HQ; MDHQGT dùng anti- γ -globulin gắn huỳnh quang phát hiện KT đặc hiệu; MDHQTT khuếch đại bằng bổ thể; MDHQ phân tích qua dòng chảy tế bào (FACS) (hình 5.9 và 5.10)



Hình 5.9: Mô hình phản ứng miễn dịch huỳnh quang phát hiện KN bề mặt tế bào và tổ chức

- A: Mô hình MDHQ trực tiếp: Dùng kit kháng thể gắn huỳnh quang ủ trực tiếp với tế bào đích hoặc tổ chức đích.
- B: Mô hình MDHQ gián tiếp: Sử dụng anti- γ -globulin miễn dịch (anti-Immunoglobulin) gắn huỳnh quang phát hiện kháng thể typ IgG đã phản ứng đặc hiệu với KN tế bào đích.
- C: MDHQ gián tiếp khuếch đại bằng bổ thể hoạt hoá: Đây là phản ứng làm tăng độ nhạy của kháng thể cố định bổ thể. Phản ứng KN+KT với sự có mặt của bổ thể, bổ thể bị hoạt hoá, tạo nhiều thành phần C3b. C3b gắn vào phần Fc của IgG và trực tiếp hấp phụ trên bề mặt tế bào đích. Sau đó, kháng bổ thể đặc hiệu C3b gắn huỳnh quang được bổ sung, phản ứng (+) sẽ xuất hiện ở nhiều vị trí có gắn bổ thể trên bề mặt tế bào đích. Nhờ vậy phản ứng khuếch đại bổ thể làm tăng độ nhạy của MDHQGT.



Hình 5.10: Mô hình MDHQ sử dụng máy FACS
(Fluorescence – activated – cell – sorter)

- Đưa vào buồng đếm tế bào dịch tế bào đã nhuộm với kháng thể huỳnh quang
- Nhờ có hệ thống “rung” tế bào tách ra và chuyển động theo dòng chảy
- Dòng chảy tế bào chạy qua bộ phận phân tích bằng tia laser, ở đây mỗi tế bào được tách riêng, được đo kích thước (size), các hạt nhỏ được xác định, màu xanh huỳnh quang (+) và màu đỏ (-) được xác định và ghi trên băng giấy.
- Nhờ hệ thống rung, dịch tế bào lại được tách ra từng giọt, mỗi giọt là 1 tế bào. Các giọt tế bào này chạy qua đĩa lõm đôi dạng, hai nhóm tế bào (+) và (-) được thu hoạch vào ống nghiệm, hệ thống máy được rửa lại, tiếp tục kiểm tra mẫu khác.
- Trên cơ sở 3 chỉ tiêu thu được: kích thước tế bào (s), số lượng tế bào (n) và màu huỳnh quang (f) tính ra được số tế bào tham gia phản ứng.

KỸ THUẬT CHUYỂN DẠNG LYMPHO

1. Nguyên lý

Tế bào lympho khi nuôi cấy với sự có mặt của chất kích thích phân bào hoặc kháng nguyên đặc hiệu đã miễn cảm sơ bộ cho các tế bào này sẽ có hiện tượng thay đổi hình dạng tế bào: tế bào có kính thước lớn hơn, bào tương rộng hơn, trong nhân có nhiều hạt nhân, nhân bắt màu nhạt hơn. Dựa vào tính chất trên đây, người ta nuôi cấy lympho bào để nghiên cứu chức năng của các tế bào này. Chất gây phân bào có thể là PHA (Phytohemagglutinin) (Kháng nguyên không đặc hiệu) hay bằng độc tố vi khuẩn, tuberculin, các chất hoá học... (Kháng nguyên đặc hiệu).

2. Dụng cụ, hoá chất

- Lọ nuôi cấy tế bào sậy vô trùng
- Bơm tiêm, pipette vô trùng
- Buồng nuôi cấy vô trùng
- Máy ly tâm lạnh
- Kính hiển vi thường
- Tủ nuôi cấy CO₂ có bộ phận điều hoà áp lực O₂ 95% và khí CO₂ 5%.
- Môi trường Parker 199 hoặc dung dịch MEM (Minimal Eagle Medium)
- Dung dịch Hanks: pH 7,2 - 7,4
- Chất phân bào: PHA hoặc Con-A, PPD hoặc các chất nghiên cứu, tùy theo mục đích nghiên cứu.
- Huyết thanh AB đã khử bổ thể ở 56°C /30 phút hoặc huyết thanh bào thai bê.
- Cồn cố định, dung dịch nhuộm Giemsa.

3. Quy trình kỹ thuật

- Dùng bơm tiêm tráng heparin, lấy 4 ml máu tĩnh mạch, cho vào 1 ống nghiệm đã khử khuẩn.
- Phân lập tế bào qua ficoll hoặc để lắng tự nhiên với độ nghiêng 45° trong 20 phút sau đó để đứng 90° trong 5 phút. Lấy 2/3 trên nước mặt, hỗn hợp này có trên 80% là lympho, lẫn một ít bạch cầu đa nhân và hồng cầu. Đếm số lượng tế bào lympho và xác định tỷ lệ sống chết của tế bào, chỉ dùng nuôi cấy khi tỷ lệ tế bào sống trên 95%, số lượng tế bào trong huyền dịch 10⁶ tế bào/1 ml.
- Chuẩn bị hai nhóm lọ cấy (mỗi nhóm cần 3 lọ):

- + Nhóm lọ (+) gồm có:
 8 ml môi trường Parker
 0,05 ml PHA hoặc kháng nguyên cần kiểm tra
 0,5 ml dung dịch nuôi có 10^6 tế bào lympho, lắc đều.
- + Nhóm lọ (-) gồm có:
 8 ml môi trường Parker
 0,5 ml dung dịch nuôi có 10^6 tế bào lympho, lắc đều.

Chú ý: Nếu dùng kháng nguyên đặc hiệu thì cần xác định liều kháng nguyên thích hợp cho 10^6 tế bào.

– Đậy kín các lọ nuôi cấy, để ủ ấm 37° trong 72 giờ (nếu là kháng nguyên không đặc hiệu, lâu hơn nếu là kháng nguyên đặc hiệu), mỗi ngày lắc nhẹ một lần tất cả các lọ, tốt nhất là nuôi cấy trong tủ ấm CO_2 .

– Thu hoạch: Hết thời gian nuôi cấy, lấy các lọ ra, dùng pipette Pasteur thuần nhất để làm tan các đám tế bào, chuyển vào ống ly tâm, ly tâm nhẹ 1000 vòng/phút/10 phút, hút bỏ nước nổi, lắc nhẹ cho tế bào bong ra, lấy cặn dần tiêu bản, để khô tự nhiên, cố định bằng cồn tuyệt đối trong 5 phút, nhuộm Giemsa.

4. Nhận định kết quả

- Đối với mỗi lọ, đọc 1000 tế bào để tính tỷ lệ phần trăm số lượng tế bào chuyển dạng.
- Bình thường, nhóm lọ (-) không có tế bào chuyển dạng
- Nếu chất kích thích phân bào là PHA thì tỷ lệ chuyển dạng là $80\% \pm 5$, tỷ lệ chuyển dạng $< 20\%$ là bệnh lý
- Nếu chất kích thích là các loại kháng nguyên khác thì tỷ lệ chuyển dạng $> 5\%$ là dương tính

Chú ý: Đọc kết quả ở 3 lọ, tính tỷ lệ trung bình.

Tiêu chuẩn để đánh giá tế bào chuyển dạng: các tế bào lympho chuyển dạng là các tế bào lympho non, đường kính $10 - 12 \mu\text{m}$, nguyên sinh chất bắt màu kiềm, trong nhân có 2 - 3 hạt nhân, nguyên sinh chất có vài không bào, tỷ lệ giữa nhân và nguyên sinh chất lớn. Ta còn có thể thấy các giai đoạn khác nhau của quá trình chuyển dạng.

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Nuôi cấy bị nhiễm trùng
- Dàn tiêu bản không đều hoặc không thuần nhất tế bào trước khi làm tiêu bản.
- Đếm tế bào chuyển dạng không chính xác, nếu chỉ đếm ở đuôi tiêu bản thì nhiều tế bào lympho không chuyển dạng, ở ngọn tiêu bản thì nhiều tế bào lympho chuyển dạng, do đó nên đếm cả hai khu vực và lấy giá trị trung bình.

KỸ THUẬT GÂY ĐỘC BẠCH CẦU TRONG ỐNG NGHIỆM

1. Nguyên lý

Khi tế bào đích (tế bào mang kháng nguyên đặc hiệu) phản ứng với kháng huyết thanh đặc hiệu cùng với sự có mặt của bổ thể thì tế bào đích sẽ bị độc và chết. Phức hợp kháng nguyên-kháng thể-bổ thể làm thay đổi tính thấm màng tế bào, tổn thương màng, nước sẽ ngấm vào bào tương làm tế bào trương to và chết. Bằng cách nhuộm với các chất màu (xanh trypan hoặc eosin), có thể xác định được số lượng tế bào sống chết, từ đó biết được hiệu giá gây độc tế bào của kháng huyết thanh.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Ống nghiệm, pipette chính xác, bain-marie, phiến nhựa
- Dung dịch ficoll tách lympho
- Dung dịch đệm PBS
- Dung dịch Parker 199
- Dung dịch Hanks pH 7,2
- Dung dịch nhuộm tế bào xanh trypan 0,2%
- Bổ thể thỏ: thường lấy máu tĩnh mạch tai của 9 - 10 con thỏ, để riêng ống máu của từng con một. Để máu tự đông 30 phút/37°C và 2 giờ/4°C. Ly tâm 3000 vòng/phút/10 phút. Tách huyết thanh của tất cả các ống máu thỏ, trộn đều. Ly tâm lại 4000 vòng/phút/10 phút. Chia đều huyết thanh thu được vào các ống nhỏ dùng dần. Bảo quản ở -80°C hoặc tốt nhất là bảo quản dưới dạng đông khô. (Chú ý: tất cả các bước thực hiện ở 4°C, đông lạnh ngay ở -80°C, huyết thanh thỏ đã lấy ra khỏi -80°C thì không đông lại nữa).
- Dầu paraffin
- Dung dịch đệm bạch cầu
- Kháng huyết thanh đặc hiệu cần thử

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Tập trung bạch cầu lympho

- Lấy máu tĩnh mạch, chống đông bằng heparin (20 đơn vị heparin cho 1 ml máu), lắc đều trong ống nghiệm, để lắng từ 15 - 30 phút.
- Ly tâm 1000 vòng/phút/10 phút, hút lấy phần huyết tương, cách lớp hồng cầu 2 mm, để tránh hút phải lớp bạch cầu đa nhân và hồng cầu.
- Cho huyết tương vào ống nghiệm đã có sẵn dung dịch ficoll, ly tâm 1800-2000 vòng/phút/10 phút, lấy vòng bạch cầu sát lớp ficoll cho vào ống nghiệm khác.

– Rửa bạch cầu bằng dung dịch PBS 2 lần (lấy tâm 1500 vòng/phút/10 phút), hút bỏ dịch nổi, huyền dịch lại dung dịch bạch cầu sao cho số bạch cầu từ $5 \times 10^9/l$ trong dung dịch Parker.

3.2. Pha loãng kháng huyết thanh: Lấy 0,5 ml kháng huyết thanh, pha loãng như sau: Lấy 10 ống nghiệm, đánh số từ 1 - 10, cho vào mỗi ống 0,5 ml dung dịch Parker. Sau đó đưa vào ống số 10,5 ml huyết thanh, trộn đều, chuyển 0,5ml sang ống số 2, trộn đều, chuyển 0,5 sang ống số 3..., cứ như vậy, đến ống số 10, bỏ đi 0,5 ml cuối cùng (chú ý: tất cả các bước được tiến hành ở nhiệt độ nước đá đang tan).

3.3. Tiến hành phản ứng

- Dùng micropipette đưa vào mỗi ống 5 μl huyền dịch tế bào (mỗi ống có 25.000 tế bào), lắc đều, ủ chậu nước ấm $37^\circ C/30$ phút.
- Lấy ra, rửa lại 2 lần bằng dung dịch Hanks, loại bỏ nước mặt
- Bổ sung vào căn tế bào 0,2 ml huyết thanh thô tươi (bổ thể) pha loãng 1/8 trong dung dịch Parker, lắc đều, ủ chậu nước ấm $37^\circ C/45$ phút.
- Bổ sung vào mỗi ống 0,3 ml dung dịch xanh trypan, lắc đều, để trong chậu nước đá, đợi 5 phút sau đọc kết quả.

4. Nhận định kết quả

- Dùng pipette Pasteur đầu nhọn, hút 1 giọt nhỏ vào buồng đếm bạch cầu, đếm số tế bào chết dưới kính hiển vi, vật kính 40, các tế bào trương to, bắt màu xanh là tế bào chết.
- Đếm từ 200 - 400 tế bào, tính tỷ lệ phần trăm tế bào chết, từ đó suy ra hiệu giá kháng huyết thanh.

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Số lượng bạch cầu không đủ để tiến hành phản ứng
- Xanh trypan không đúng nồng độ
- Kháng huyết thanh cần thử không có kháng thể

KỸ THUẬT TÌM KHÁNG THỂ KHÁNG TIỂU CẦU

1. Tìm kháng thể kháng tiểu cầu bằng kỹ thuật ELISA

1.1. Nguyên lý

Kháng nguyên tiểu cầu khi được gắn vào giếng phản ứng sẽ kết hợp với kháng thể kháng tiểu cầu đặc hiệu có trong huyết thanh bệnh nhân cần thử, sau khi thêm anti-IgG-peroxydase sẽ tạo nên phức hợp: Tiểu cầu-KT kháng tiểu cầu-anti IgG-peroxydase. Khi thêm cơ chất OPD (O-phenylene Diamine), phản ứng đổi màu, căn cứ vào màu sắc phản ứng để nhận định kết quả.

1.2. Dụng cụ, hoá chất

- Máy ly tâm
- Ống nhựa tách tiểu cầu
- Pipette chính xác
- Phiến nhựa gắn tiểu cầu
- Buồng đếm tiểu cầu hoặc máy đếm tế bào
- Dung dịch đệm PBS
- Dung dịch đệm PBS-BSA 2%
- Dung dịch đệm PBS-Tween-20/0,05%
- Dung dịch PBS-EDTA Na₂
- Tiểu cầu lấy từ người cho máu nhóm O
- Dung dịch EDTA Na₂
- Dung dịch cộng hợp anti-IgG-peroxydase
- OPD
- Nước muối sinh lý
- Dung dịch NaN₃ chống nấm

1.3. Quy trình kỹ thuật

1.3.1. Kỹ thuật gắn kháng nguyên tiểu cầu

- Lấy máu người cho nhóm O, từ 5 - 10ml, của 10 người, chống đông bằng EDTA (1 thể tích EDTA - 9 thể tích máu).
- Ly tâm 1200 vòng/phút/10 phút/22°C để có huyết tương giàu tiểu cầu
- Tách huyết tương giàu tiểu cầu sang túi khác (tránh lẫn hồng cầu)
- Ly tâm 2500 vòng/phút/10 phút để có khối tiểu cầu
- Rửa tiểu cầu 3 lần bằng đệm PBS-EDTA Na₂
- Hút bỏ dịch nổi, lấy cặn tiểu cầu, cho thêm NaN₃ 0,1% chống nhiễm trùng
- Hoà loãng khối tiểu cầu bằng đệm PBS-EDTA Na₂ để có huyền dịch tiểu cầu mật độ tiểu cầu $1,5-2 \times 10^9/l$.
- Nhỏ vào mỗi giếng 0,1ml huyền dịch tiểu cầu, để 12-16 giờ ở 4°C (qua đêm)
- Lấy ra, vẩy sạch nước trong giếng và nhỏ 0,2ml PBS-BSA 2%, để nhiệt độ phòng 60 phút.
- Rửa 3 lần bằng đệm PBS-Tween-20/0,05%
- Để 37°C/30 phút (làm khô)
- Bảo quản ở -20°C trong vòng 6 tháng

1.3.2. Kỹ thuật phát hiện kháng thể kháng tiểu cầu

- Rửa phiến nhựa đã gắn tiểu cầu bằng đệm PBS Tween-20, thấm khô

- Nhỏ 0,1ml huyết thanh cần thử (có chứng âm và chứng dương kèm theo)
- Ủ 37°C/60 phút, rửa 3 lần bằng đệm PBS Tween-20, thấm khô
- Nhỏ 0,05ml anti-IgG-peroxydase, để 45 phút ở nhiệt độ phòng
- Rửa 3 lần bằng đệm PBS Tween-20, ở lần rửa sau cùng, ngâm dung dịch rửa từ 10 - 15 phút. Rửa lại một lần nữa, thấm khô.
- Nhỏ 0,05ml OPD, để 10 phút ở nhiệt độ phòng.
- Đọc kết quả bằng mắt thường hoặc máy đọc ELISA, bước sóng 492nm.

1.4. Nhận định kết quả

- Kết quả dương tính khi mật độ quang ở mẫu thử bằng hoặc đậm hơn chứng dương
- Kết quả âm tính khi mật độ quang của mẫu thử như mật độ quang của chứng âm.

1.5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Gắn kháng nguyên tiểu cầu vào phiến nhựa không đạt yêu cầu.
- Phiến nhựa gắn tiểu cầu quá thời gian sử dụng cho phép.
- Phản ứng dương tính giả khi rửa không sạch anti-IgG-peroxydase ở bước 5
- Cơ chất không thích hợp

2. Tìm kháng thể kháng tiểu cầu bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang

2.1. Nguyên lý

Kháng thể kháng tiểu cầu khi xuất hiện trong cơ thể có thể tồn tại trong huyết thanh hay trên màng tiểu cầu bệnh nhân. Kháng thể này khi kết hợp với anti-Ig-FITC thì có thể phát hiện được trên kính hiển vi huỳnh quang.

2.2. Dụng cụ, hoá chất

- Đệm PBS, pH = 7,4
- PBS/EDTA/BSA 0,2%
- Dung dịch NH₄Cl (tách hồng cầu từ huyền dịch tiểu cầu)
- Paraformaldehyd (PFA) 1% trong PBS (trọng lượng /thể tích)
- Anti-Ig-FITC
- Glycerol 33,3% trong PBS (thể tích/thể tích)
- Phiến nhựa đáy tròn

2.3. Quy trình kỹ thuật

2.3.1. Phân lập tiểu cầu

- Lấy 10ml máu chống đông bằng EDTA, ly tâm trong 1500-1800 vòng/phút/10 phút, chuyển huyết tương giàu tiểu cầu sang ống nhựa khác, ly tâm 3000-4000 vòng/phút/7 phút, hút phần plasma sang một ống khác.

- Nhỏ 1ml PBS/EDTA/BSA vào cặn tiểu cầu và lắc đều, thêm dung dịch PBS/EDTA/BSA cho đầy ống và ly tâm ở 3000-4000 vòng/phút/7 phút.

Chú ý: Nếu còn hồng cầu trong huyền dịch tiểu cầu, nhỏ 2,5ml dung dịch NH_4Cl và ủ 5 phút trong đá lạnh đang tan.

- Rửa tiểu cầu 2 lần với dung dịch PBS/EDTA/BSA và điều chỉnh số lượng tiểu cầu $3 \times 10^8/\text{ml}$.

2.3.2. Cố định tiểu cầu

Thêm 2,5ml dung dịch paraformaldehyd và dung dịch tiểu cầu, lắc đều và ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng, rửa 2 lần với dung dịch PBS/EDTA/BSA và điều chỉnh mật độ tiểu cầu ở $3 \times 10^8/\text{ml}$ trong PBS/EDTA/BSA.

2.3.3. Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang trực tiếp

- Đặt 0,02ml huyền dịch tiểu cầu bệnh nhân trong một lỗ của phiến nhựa đáy tròn

- Thêm 0,02ml anti-Ig-FITC, lắc đều và ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. Sau khi ủ, thêm 0,15ml dung dịch PBS/EDTA/BSA, lắc đều và ly tâm 1500-1800 vòng/phút/5 phút. Rửa thêm 2 lần như vậy. Ở lần rửa sau cùng, hút bỏ dịch nổi, thêm 0,015ml dung dịch glycerol 33,3% và cặn tiểu cầu, lắc đều và nhỏ lên lam kính.

- Phủ la men lên và để 15 phút, đọc kết quả trên kính hiển vi huỳnh quang.

2.3.4. Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp

- Đặt 0,02ml huyền dịch tiểu cầu đã cố định PFA và 0,02ml huyết thanh cần thử trong một giếng đáy tròn tròn và lắc đều, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.

- Thêm 0,15ml PBS/EDTS/BSA, rửa 3 lần.

- Các bước tiếp theo tiến hành như kỹ thuật trực tiếp.

2.4. Nhận định kết quả

- Phản ứng dương tính khi thấy hình ảnh phát quang màu xanh lục quanh tiểu cầu

- Phản ứng âm tính khi không thấy hình ảnh phát quang quanh tiểu cầu

2.5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Quá trình rửa không sạch gây dương tính giả

- Tiểu cầu quá ít do đếm không chính xác làm cho không gắn hoặc gắn không đủ kháng thể kháng tiểu cầu

KỸ THUẬT ĐỊNH NHÓM KHÁNG NGUYÊN BẠCH CẦU

(kỹ thuật định nhóm HLA)

1. Nguyên lý

Kháng nguyên bạch cầu người (Human Leucocyte Antigens - HLA) là hệ kháng nguyên mang tính đặc hiệu loài. Hệ kháng nguyên HLA có thể sử dụng như một dấu ấn nhân chủng học và dấu ấn bệnh lý. Kháng nguyên HLA lớp I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) được phát hiện bằng kỹ thuật vi độc tế bào. Kháng nguyên HLA lớp II (HLA- DR, DP, DQ) được phát hiện bằng kỹ thuật PCR (Polymerase chain reaction).

2. Quy trình kỹ thuật

2.1. Kỹ thuật vi độc lympho

2.1.1. Dụng cụ hoá chất

- Khay nhựa nuôi cấy tổ chức (Terasaki)
- Bơm tiêm Hamilton gồm 3 cỡ: 100, 250, 500 microlit
- Pipette Pasteur, kính hiển vi
- Ống ly tâm cỡ 1x 10cm
- Dung dịch Hanks pH 7,2; nước muối sinh lý
- Dung dịch formalin 35% có pH 7,2
- Dung dịch xanh trypan 0,2% (pha trong nước muối sinh lý)
- Dung dịch ficoll tách bạch cầu.

2.1.2. Kháng huyết thanh chống lympho bào

Kháng huyết thanh lấy từ các cá thể truyền máu nhiều lần hoặc máu của các bà mẹ chứa đề nhiều lần có bất đồng hệ kháng nguyên HLA giữa mẹ và con hoặc kháng huyết thanh được sản xuất theo phương pháp kháng thể đơn dòng của các labo HLA trên thế giới đã được thương mại hoá. Kháng huyết thanh được khử bổ thể ở 56°C/30 phút. Bảo quản ở - 80°C.

2.1.3. Bố thể: thường dùng bố thể thỏ. Lấy máu động mạch thỏ, tách huyết thanh bằng ly tâm 3000 vòng/phút/15 phút ở 4°C. Huyết thanh thỏ được hấp phụ một lần với hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu của người có nhóm máu AB. Lấy máu AB, rửa 3 lần bằng NaCl 0,9%, lấy cận tế bào ủ với huyết thanh thỏ 1 giờ ở 4°C, thể tích như nhau. Sau khi hấp phụ, ly tâm 3000 vòng/phút/15 phút ở 4°C. Lấy nước mặt (huyết thanh thỏ) bảo quản ở -80°C.

2.1.4. Tiến hành tách bạch cầu: như trong kỹ thuật độc tế bào.

2.1.5. Tiến hành phản ứng

Dùng phiến nhựa có lỗ, tiến hành phản ứng như sau:

- Nhỏ đều dầu paraffin vào mỗi lỗ (1 μ l)
- Cho 1 μ l dung dịch kháng huyết thanh vào mỗi lỗ
- Cho 1 μ l dung dịch bạch cầu 5×10^6 , trộn đều, sau đó để 30-45 phút ở nhiệt độ phòng.
- Cho thêm 5 μ l bổ thể thỏ, ủ 37°C từ 60 - 90 phút, lấy ra vẩy sạch dầu paraffin, cho vào mỗi lỗ 2 μ l xanh trypan đã pha ở trên, trộn đều, để nhiệt độ phòng 5 phút
- Lắc đều, để nhiệt độ phòng 5 phút
- 5 μ l formalin để cố định tế bào.
- Đọc kết quả trên kính hiển vi đảo ngược

2.1.6. Nhận định kết quả

Bạch cầu chết là những bạch cầu ngấm độc, trương to, bắt màu xanh. Đếm số tế bào chết và tính tỷ lệ:

- Từ 0 - 15% là (-)
- Từ 15 - 20% là ($\pm$)
- Từ 20 - 30% là (+)
- Từ 30 - 50% là (++)
- Từ 50 - 80% là (+++)
- Từ 80% trở lên là (++++)

Đối chứng: Gồm chứng dương và chứng âm:

Chứng dương: dùng kháng huyết thanh ở độ pha loãng 100% tế bào chết

Chứng âm: chỉ có lympho, không có kháng huyết thanh.

Khi đọc kết quả, cần đọc chứng trước.

2.1.7. Các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả

- Mật độ tế bào bạch cầu
- Hiệu giá bổ thể
- Nồng độ xanh trypan
- Nhiệt độ phản ứng
- Cường độ dòng điện điện di

2.2. Kỹ thuật PCR

2.2.1. Nguyên lý

Nhờ cặp mồi đặc hiệu (Primer), một đoạn DNA được tổng hợp từ nguồn nguyên liệu là các nucleotid tự do với sự xúc tác của DNA polymerase.

2.2.2. Dụng cụ, hoá chất

- Máy PCR
- Máy điện di
- Láy ly tâm
- Tủ ấm (có thể điều chỉnh nhiệt độ 37°C và 52°C)
- Máy lắc
- Máy đọc kết quả điện di (có ánh sáng đèn UV)
- Các loại micropipette
- Ống Eppendorf (1 ml và 1,5ml)
- Dung dịch phá hồng cầu, bạch cầu
- Proteinase K, NaCl 0,9%
- Ethanol 99%, Agarose
- Ethidium bromid
- DNA size marker, d NTD
- DNA polymearase
- Primer (tùy thuộc đoạn DNA cần khuếch đại)

2.2.3. Quy trình kỹ thuật

- Chiết tách DNA

Có rất nhiều phương pháp chiết tách DNA khác nhau nhưng nói chung đều theo một số bước cơ bản sau:

- + Lấy máu tĩnh mạch, chống đông bằng EDTA (3 - 5ml)
- + Phá hồng cầu, bạch cầu
- + Xử lý bạch cầu đã được phá bằng proteinase K
- + Tủa protein bằng dung dịch NaCl bão hoà
- + Loại bỏ tủa protein bằng ethanol 99%
- + Tái hoà tan tủa DNA trong đệm TE (Tris-EDTA)
- Thực hiện quá trình khuếch đại

Số chu kỳ khuếch đại, nhiệt độ và thời gian của các giai đoạn trong một chu kỳ hoàn toàn phụ thuộc vào từng cặp mồi. Quá trình này thường gồm các bước cơ bản sau:

- Chuẩn bị hỗn hợp khuếch đại: tổng thể tích 50 - 100 µl (dùng eppendorf chuyên dụng), các thành phần trong hỗn hợp bao gồm: DNA, DNA polymerase, dNTP, primer (có thể thêm một vài thành phần khác tùy theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

- Thực hiện sự khuếch đại trên máy chuyên dụng: thường có số chu kỳ khuếch đại là 30 -60 (tùy theo từng kỹ thuật).

- Mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn: giai đoạn tháo chuỗi xoắn kép của DNA tạo chuỗi đơn DNA, giai đoạn gắn cặp mỗi vào chuỗi đơn DNA, giai đoạn kéo dài chuỗi bổ cứu mới được tổng hợp.

- Điện di kiểm tra sản phẩm khuếch đại

Sản phẩm khuếch đại được kiểm tra bằng điện di trên gel thạch agarose, kết quả được xem là dương tính khi thấy vệt trắng đục trên đường chạy của sản phẩm trong gel thạch.

KỸ THUẬT CÂY CỤM TẾ BÀO **(Colony forming units)**

1. Nguyên lý

Các tế bào gốc tạo máu (Hemopoietic Stem cells) khi gặp các yếu tố kích thích tạo máu (trong môi trường điều kiện hoá) sẽ phân chia và nhân lên tạo các cụm tế bào khác nhau tùy thuộc vào tế bào đích và chất kích thích phát triển. Dựa vào tính chất này, người ta nuôi cấy tạo cụm để đánh giá khả năng tạo máu ở một số bệnh máu, hoặc của dịch tế bào gốc sử dụng cho ghép tủy, đánh giá khả năng mọc của tế bào tủy ghép.

2. Dụng cụ, hoá chất

- Ống nghiệm vô trùng, đĩa nuôi cấy, pipette Pasteur
- Tủ ấm CO₂, máy ly tâm lạnh, kính hiển vi ngược
- Môi trường MEM, dịch McCoy's, thạch, huyết thanh bào thai bê.
- Tế bào lympho người khoẻ mạnh bình thường

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Làm môi trường điều kiện hoá (tạo môi trường kích thích phát triển)

Máu ngoại vi chống đông bằng heparin (5UI/1 ml máu), để lắng, lấy phần trên đếm rồi điều chỉnh nồng độ tế bào sao cho có $7,5 \times 10^6$ / ml môi trường.

- Hỗn dịch tế bào 10 ml gồm có:
- Môi trường MEM (× 2) 3,0 ml.
- Huyết thanh thai bê 1,0 ml.
- Dịch tế bào ($7,5 \times 10^6$ /ml) 3,0 ml.
- Thạch 1,5% 3,0 ml.

Cho 10 ml này vào hộp petri đường kính 94 mm. Để ở nhiệt độ phòng 5-10 phút cho thạch đông.

Cho vào tủ ấm 37°C trong 7 ngày trong điều kiện ẩm mạnh có 5% CO₂.

Thu hoạch môi trường điều kiện hoá: lấy đĩa nuôi cấy để 24-48 giờ ở 4°C cho thạch lắng xuống. Hút phần trên (môi trường điều kiện hoá) bảo quản ở -20°C. Môi trường này cũng có thể sản xuất được bằng cách nuôi cấy gai bánh rau trong RPMI.

3.2. Cấy tế bào tủy

– Lấy tủy: chọc tủy và lấy tủy toàn phần đã được chống đông giống máu ngoại vi để lắng rồi lấy phần trên, đếm số lượng tế bào và điều chỉnh nồng độ tế bào $6,5 \times 10^6/\text{ml}$ môi trường.

– Chuẩn bị hỗn dịch tế bào: 5 ml gồm có:

Môi trường Mc Coy's ($\times 2$), MEM ($\times 2$) 1,5 ml

Huyết thanh thai bê 1,0 ml

Môi trường điều kiện hoá 0,6 ml

Thạch 0,9% 1,5 ml

Tế bào ($6,5 \times 10^6/\text{ml}$) 0,4 ml

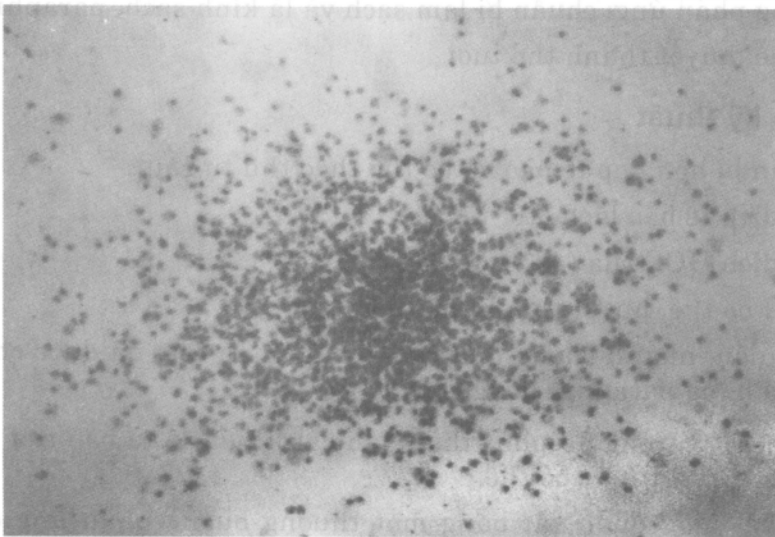
Trộn hỗn dịch tế bào, sau đó cho 1ml vào đĩa petri (đường kính 34mm) $\times 3$ đĩa, chờ thạch đông rồi nhẹ nhàng chuyển vào tủ nuôi cấy 37°C , 5% CO_2 độ ẩm cao, nuôi cấy trong 14 ngày lấy ra đọc kết quả.

4. Kết quả

Đếm các tế bào dưới kính hiển vi đảo ngược độ phóng đại 20-40 lần. Tập hợp tế bào > 20 tế bào, được coi là một cụm (colony) và cấy đạt yêu cầu (hình 5.11).

5. Những yếu tố ảnh hưởng

- Điều kiện vô trùng: tủ ấm, tủ sấy...
- Hoá chất: độ pH của môi trường, chất chống đông đúng tỷ lệ (tốt nhất là heparin).
- Kỹ thuật: làm môi trường điều kiện hoá, tách lymphocyt...



Hình 5.11: Cụm (Colony) tế bào được tạo thành từ 1 tế bào gốc nuôi cấy 14 ngày trong môi trường thạch lỏng (Somisolid medium). Trên đây là một đơn vị tạo cụm (Colony forming unit) của tế bào gốc 2 dòng (Bipotent stem cells): bạch cầu hạt/mono. (Trích dẫn từ luận án TSKH của Đỗ Trung Phấn, Budapest 1987).

Ghi chú: Hiện nay trên thương trường có môi trường cấy cụm tế bào được sản xuất sẵn từ methylcellulose với đủ các chất kích thích sinh sản và biệt hoá, có hai dạng môi trường đơn dòng và môi trường đa dòng rất thuận tiện cho người sử dụng, chất lượng tốt. Đây là tiến bộ mới về kỹ thuật nuôi cấy tạo cụm sử dụng cho nghiên cứu tế bào gốc.

PHƯƠNG PHÁP TẠO QUẢNG DUNG HUYẾT PHÁT HIỆN TẾ BÀO LÁCH SẢN XUẤT KHÁNG THỂ

1. Nguyên lý

Trên đĩa nuôi cấy tế bào, bao gồm tế bào lách đã được miễn cảm và hồng cầu cừu (HCC) là kháng nguyên đặc hiệu, tế bào lách sản xuất kháng thể sẽ khuếch tán ra xung quanh và phản ứng với HCC với sự có mặt của bổ thể, các tế bào HCC sẽ bị ly giải tạo một vành đai không có HCC xung quanh tế bào lách. Hình ảnh này gọi là “quảng dung huyết”

2. Nguyên vật liệu

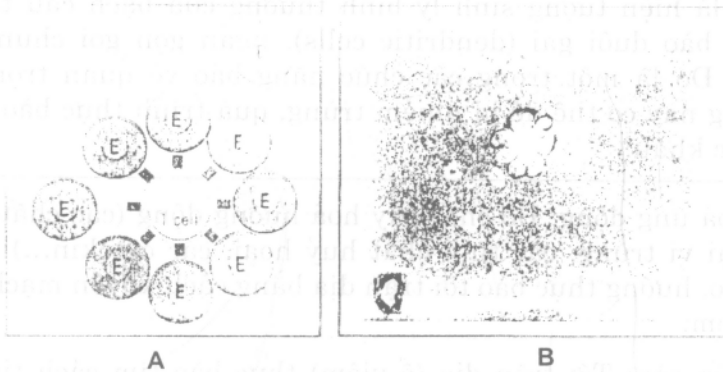
1. Chuột nhắt trắng đã miễn cảm HCC, 21 ngày sau lấy lách chuẩn bị dịch tế bào lách ($10^6/\text{ml}$).
2. HCC tươi rửa 3 lần bằng nước muối, chuẩn bị đậm đặc $5,0 \times 10^7$ tế bào/ml
3. Buồng phản ứng: chuẩn bị lam sạch và lá kính sạch, paraffin rắn
4. Bổ thể: huyết thanh thỏ tươi

3. Quy trình kỹ thuật

1. Chuẩn bị hỗn hợp tế bào và bổ thể theo thứ tự sau:
 - 1ml dịch tế bào lách (10^6 tế bào)
 - 1ml dịch HCC rửa (4×10^7 tế bào)
 - 0,5ml bổ thể, huyết thanh thỏ tươi
 2. Trộn đều, nhanh chóng đưa vào buồng phản ứng đã được chuẩn bị trước, hàn lại 4 phía bằng paraffin nóng chảy.
 3. Ủ ấm 37°C trong 45 phút thời gian cần thiết để tế bào tiết KT đồng thời phản ứng với KN là HCC + bổ thể.
 4. Đọc kết quả: quan sát bằng mắt thường buồng phản ứng đếm số lượng quảng dung huyết và số lượng tế bào bạch cầu không tạo quảng dung huyết.
- Sau đó tính ra số tế bào tạo kháng thể/ 10^6 tế bào lách (cả tế bào tạo quảng dung huyết và bạch cầu không sản xuất KT).

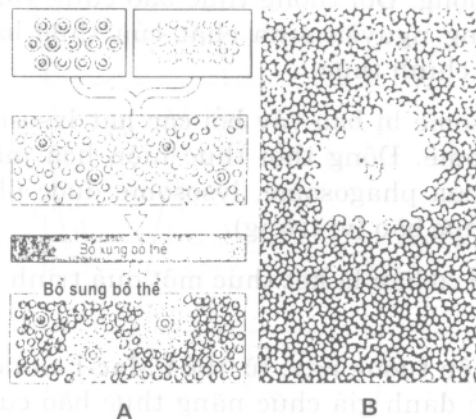
4. Chú ý

- Vì là lớp đơn tế bào cho nên cần hàn kỹ để tránh xô đẩy tế bào khi vận hành kỹ thuật.
- Cần đếm chính xác số lượng bạch cầu trong buồng phản ứng và cần khẳng định số lượng hỗn hợp tế bào lách đã đưa vào phản ứng.
- Tế bào tạo quầng rất dễ nhận định: Trung tâm là bạch cầu, xung quanh là vùng không có HCC (Hình 5.12).



Hình 5.12: Mô hình tạo hoa hồng (HH=Rosette) tự nhiên với HC cừu (HCC) của T lympho

- A: T lympho có thụ thể đặc hiệu với HCC, khi ủ lympho T với HCC chúng sẽ gắn kết với nhau tạo hình hoa hồng, gọi là E-rosette.
- B: Ảnh tạo HH với HCC của T lympho: Trung tâm là T lympho, xung quanh là HCC



Hình 5.13: Mô hình tạo quầng dung huyết phát hiện tế bào sản xuất kháng thể

- A: Mô tả quy trình thí nghiệm: Hỗn hợp lympho với HCC theo tỷ lệ 1/40, ủ trong buồng kín với sự có mặt của bổ thể. Nếu có tế bào sản xuất kháng thể quầng dung huyết sẽ được tạo thành. Nếu tế bào không sản xuất kháng thể đặc hiệu HCC sẽ không có quầng dung huyết.
- B: Quầng dung huyết: Trung tâm là tế bào tiết KT, quầng trắng là HCC bị ly giải với sự có mặt của bổ thể.

KỸ THUẬT THỰC BÀO (Phagocytosis)

1. Nhắc lại hiện tượng thực bào (cơ chế thực bào)

Thực bào là hiện tượng sinh lý bình thường của bạch cầu trung tính, đại thực bào và tế bào đuôi gai (dendritic cells), ngắn gọn gọi chung là thực bào (Phagocytes). Đó là một trong các chức năng bảo vệ quan trọng của cơ thể. Thiếu chức năng này cơ thể dễ bị nhiễm trùng, quá trình thực bào diễn biến liên tục, bao gồm các khâu:

	Hoá ứng động: Do chất gây hoá hướng động (các chất gây viêm, các loại vi trùng, các tính chất huỷ hoại, các cytokin...) hoạt hoá thực bào, hướng thực bào tới trận địa bằng cách xuyên mạch, di động tới ổ viêm.
	Tiếp cận: Tới trận địa (ổ viêm) thực bào tìm cách tiếp cận với đối tượng thực bào.
	Bao vây: Khi tiếp cận được với các đối tượng thực bào, thực bào thò ra đôi tay từ màng bào tương, ôm lấy đối tượng. Thể này gọi là phagosome tiền thân.
	Nuốt đối tượng: Đối tượng thực bào cùng với phần màng bào tương lọt vào trong nguyên sinh chất của thực bào. Thể này gọi là thể phagosome chính thức.
	Thể phagosome bị bao vây bởi các hạt lysosome, thể này gọi là thể phagolysosome. Đồng thời thực hiện hoà màng lysosome và màng bào tương của phagosome, lysosome được phóng thích và tiêu huỷ đối tượng thực bào (vi trùng).
	Đến đây, về cơ bản là kết thúc một quá trình thực bào và cơ thể được bảo vệ. Lợi dụng hiện tượng này, từ 1964 Mac-Faland đã xây dựng kỹ thuật thực bào để đánh giá chức năng thực bào của bạch cầu trung tính, đại thực bào.

2. Nguyên lý kỹ thuật thực bào

Sử dụng tụ cầu trắng không gây bệnh hoặc hạt latex làm đối tượng thực bào. Khi ủ bạch cầu tươi với đối tượng thực bào ở 37°C, bạch cầu thực hiện quá trình thực bào. Kết quả được đánh giá bằng 3 chỉ tiêu:

- Phần trăm tế bào có thực bào (gọi tắt là phần trăm thực bào)

- Chỉ số thực bào là số trung bình đối tượng thực bào có trong 1 tế bào có thực bào.
- Tỷ lệ đối tượng thực bào bị tiêu hủy là số tụ cầu chết/ tổng số tụ cầu bị thực bào.

3. Chuẩn bị

3.1. Dụng cụ cần thiết

- Ống nghiệm cỡ 10 x 75^m/ml
- Ly tâm dạng ống nằm ngang
- Tủ ấm 37°C
- Kính hiển vi ánh sáng thường
- Lam kính pipette Pasteur

3.2. Các chất liệu cần thiết

- Tụ cầu trắng không gây bệnh
- Hạt latex
- Dung dịch đệm PBS
- Dung dịch dextran 6%
- Dung dịch phá hồng cầu NH_4Cl
- Dung dịch nhuộm AO/EB (Acridin Orange/ Ethidium bromide)
- Ficoll (hypaque) 400.000.

4. Tiến hành

4.1. Chuẩn bị đối tượng thực bào

- Tụ cầu trắng: Tụ cầu được nuôi cấy trong môi trường canh thang ở 37°C trước 24 giờ. Lấy tụ cầu và rửa tụ cầu bằng nước muối sinh lý 3 lần bằng cách ly tâm 3000 vòng/10 phút. Chuẩn bị dịch tụ cầu có độ đậm đặc bằng 2×10^8 /ml, được xác định trên máy so màu, bước sáng... tụ cầu trong ống chuẩn được bất hoạt và cố định bằng formalin 5%.

- Hạt latex: Pha hạt latex đạt được nồng độ 2×10^8 /ml bằng phương pháp so màu như với tụ cầu nói trên.

4.2. Chuẩn bị tế bào thực bào (bạch cầu hạt trung tính)

- 4ml máu tĩnh mạch chống đông bằng heparin
- Loại lympho bằng dung dịch Ficoll (xem kỹ thuật phân lập tế bào miễn dịch, chương V).
- Loại hồng cầu qua hai bước:
 - + Bước 1: Loại bớt hồng cầu bằng dextran 6%: dịch tế bào đã loại lympho 3ml + 3ml PBS + 400 μ l dextran 6%, lắc đều, để nghiêng 45° trong 30 phút ở 37°C,

loại bỏ hồng cầu lắng lấy dịch tế bào ở lớp trên, ly tâm 1.500 vòng/5 phút, lấy cận tế bào, lắc nhẹ ống nghiệm cho cận tế bào tan đều.

+ Bước 2: Phá hồng cầu: Cận tế bào được hoà tan trong 2ml dung dịch NH_4Cl , lắc đều, khi thấy hồng cầu tan đều, nhanh chóng bổ sung 4ml dung dịch đệm, lắc đều, ly tâm 1.500 vòng/5 phút rửa lại 2 lần bằng PBS, thu lấy cận, chuẩn dịch bạch cầu có độ đậm đặc là $2 \times 10^6/\text{ml}$.

4.3. Tiến hành kỹ thuật thực bào

- Trong 1 ống nghiệm hemolyse có 0,5ml dung dịch tụ cầu 2×10^8 tụ cầu/ml, 0,5ml dịch tế bào bạch cầu trung tính $2 \times 10^6/\text{ml}$, ủ hỗn hợp trên ở $37^\circ\text{C}/1$ giờ (cứ 10 phút lắc lại 1 lần), với hạt latex cũng tiến hành tương tự.

- Rửa 3 lần bằng PBS để loại bỏ đối tượng thực bào không bị thực bào bằng cách ly tâm 1.500 vòng/5 phút, thu cận tế bào, kéo tiêu bản (giọt đàn), nhuộm Giemsa.

- Trả lại dịch tế bào là 1ml, bổ sung 5 μl AO/EB, lắc đều, ủ $37^\circ\text{C}/5$ phút làm tiêu bản giọt đàn, đọc kết quả.

4.4. Đọc kết quả dưới kính hiển vi (ảnh minh hoạ)

- Đếm số lượng tế bào có thực bào trên tổng số tế bào bạch cầu, đếm từ 100 - 200 bạch cầu, dùng kính hiển vi ánh sáng thường, độ phóng đại $\times 100$.

- Đếm số lượng đối tượng thực bào có trong 1 tế bào có thực bào, đếm khoảng 10 - 20 bạch cầu có thực bào, dưới kính hiển vi huỳnh quang, độ phóng đại $\times 100$, đếm số lượng vi trùng bị tiêu diệt (màu nâu đỏ), tế bào sống (bắt màu xanh).

- Đếm số lượng tụ cầu chết trên tổng số tụ cầu bị thực bào. Số tụ cầu chết bắt màu vàng, đỏ; tụ cầu sống bắt màu xanh, đến khoảng 10 - 20 bạch cầu có thực bào.

4.5. Đánh giá kết quả: Tính 3 chỉ số sau đây:

$$1. \text{Tỷ lệ \% thực bào} = \frac{\text{Số tế bào có thực bào} \times 100}{\text{Tổng số tế bào đếm được}}$$

$$2. \text{Chỉ số thực bào} = \frac{\text{Tổng số vi khuẩn hoặc hạt latex có trong số thực bào}}{\text{Số lượng tế bào có thực bào đếm được}}$$

3. Tỷ lệ diệt khuẩn (tỷ lệ tụ cầu bị tiêu diệt)

$$\text{Tỷ lệ diệt khuẩn} = \frac{\text{Tổng số vi khuẩn chết (màu đỏ cam)}}{\text{Tổng số vi khuẩn sống + chết đếm được}}$$

4.6. Chỉ số thực bào ở người bình thường

- Tỷ lệ thực bào : $>70\%$
- Chỉ số thực bào : >3
- Tỷ lệ diệt khuẩn : $>60\%$

Chương 6

AN TOÀN TRUYỀN MÁU

VẬN ĐỘNG HIẾN MÁU NHÂN ĐẠO

1. Đại cương

Truyền máu là một khâu trọng yếu của hệ thống cấp cứu và điều trị thương bệnh binh, bệnh nhân và nạn nhân. Muốn truyền máu hiệu quả và an toàn, điều cấp thiết là phải có đủ số lượng máu và đảm bảo đúng chất lượng.

Không thể có được chất lượng và an toàn trong truyền máu nếu không đủ số lượng máu truyền. Nguồn người cho máu tự nguyện thiếu thì khâu tuyển chọn, sàng lọc các bệnh lây lan qua đường máu sẽ không thể thực hiện một cách bài bản như quy chế truyền máu.

Trong truyền máu cấp cứu vì không có máu dự trữ (Ngân hàng máu) nên phải lấy máu cấp cứu. Mà đã lấy máu cấp cứu thì không thể đảm bảo được đầy đủ các quy chế khám tuyển và sàng lọc như lấy máu thường quy, và lúc này đứng trước sự sống và cái chết thì người ta chọn lấy cái sống trước đã. Máu người còn phải lấy từ người. Đã lấy từ người thì phải phụ thuộc vào lòng nhân đạo của con người, vì lòng vị tha bỏ tính ích kỉ, tự vệ cá nhân, đầu óc lợi nhuận mà mang đạo lí tốt đẹp “Thương người như thể thương thân”, mình vì mọi người mọi người vì mình.

Theo công ước Quốc tế của Hội chữ thập đỏ (CTĐ), trăng lưỡi liềm đỏ (TLLĐ) năm 1949 việc hiến máu nhân đạo (HMND) phải được thực hiện trên phạm vi toàn cầu. Mà các tổ chức CTĐ và TLLĐ của từng nước từng quốc gia có nhiệm vụ đứng ra tổ chức cuộc vận động này.

2. Nguyên tắc vận động hiến máu nhân đạo

1. Công tác truyền thông giáo dục cần làm cho mọi người trong cộng đồng hiểu rõ ý nghĩa nhân văn, nhân đạo cao cả, đạo lí nhân ái để tự nguyện hiến máu nhân đạo với tinh thần không chỉ là trách nhiệm mà là nghĩa vụ cao quý đối với cuộc sống đồng loại thân yêu, không chịu bất cứ một sự ràng buộc nào, điều kiện nào.

2. Người tình nguyện hiến máu nhân đạo phải được khuyến cáo về mọi nguy cơ trong việc cho máu. Về sức khoẻ và an toàn của tình nguyện phải được quan tâm hàng đầu.

3. Hiến máu nhân đạo không có một động cơ nào về vụ lợi kể cả người hiến máu tự nguyện đến người thực hiện.

4. Không có một sự phân biệt đối xử nào trong việc hiến máu như:

- Chủng tộc
- Quốc tịch
- Tôn giáo
- Đẳng cấp
- Giàu, nghèo, sang, hèn.

5. Phải đưa vào quy chế quốc gia về: số lần hiến máu và khối lượng máu mỗi lần lấy máu phải được xác định dựa trên cơ sở:

- Giới tính
- Trọng lượng cơ thể
- Giới hạn tuổi tác, cao nhất và thấp nhất của người hiến máu

6. Phải được ưu tiên lấy máu ở vùng có nguy cơ thấp nhất để tránh giai đoạn cửa sổ, lấy máu phải được khám xét cẩn thận để tìm ra được các yếu tố bất thường, để chăm sóc sức khỏe và tư vấn cho người hiến máu.

7. Công tác vận động hiến máu phải trở thành một phong trào thường xuyên, rộng khắp, như vết dầu loang lan rộng khắp cộng đồng, với phương châm “mưa dầm ngấm lâu, mưa lâu ngấm dần” phong trào phải kiên tục ngày một tăng, tránh đầu voi đuôi chuột.

8. Phong trào phải kế tiếp, nghĩa là cần có truyền thông giáo dục trong các trường mẫu giáo, cấp cơ sở, cấp II, cấp III để kế tiếp các lớp cha anh làm cho nguồn máu ổn định ngày càng tăng.

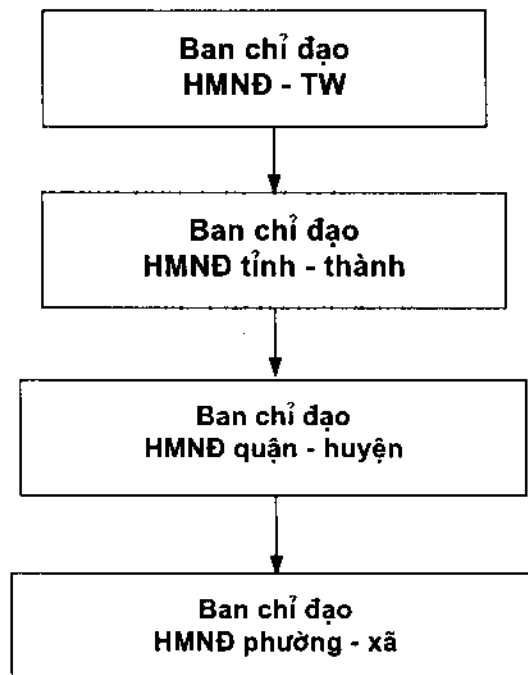
9. Vận động hiến máu phải được nâng cao không chỉ là máu toàn phần mà phải vận động cả gạn huyết tương, gạn tế bào để sử dụng - cần gì truyền nấy, không cần không truyền, để thực hiện theo nguyên tắc là “lấy máu tối thiểu, sử dụng tối đa”.

10. Vận động hiến máu phải biết dựa vào phong trào để nuôi dưỡng và phát triển mạnh mẽ phong trào, bằng cách dựa chính vào những người hiến máu an toàn thành những tuyên truyền viên để làm cơ sở cho sự sống còn của công tác vận động hiến máu nhân đạo.

3. Biện pháp thực hiện

3.1. Biện pháp và tổ chức

- Phải thành lập Ban chỉ đạo hiến máu nhân đạo từ Trung ương đến địa phương và pháp chế thành: Ủy ban truyền máu quốc gia (UBTMQG) theo sơ đồ sau:



– Thành lập liên đoàn những người cho máu nhân đạo từ Trung ương đến cơ sở, để sử dụng có hiệu quả những người cho máu tự nguyện an toàn.

– Tổ chức một hệ thống mạng lưới tuyên truyền viên (TTV) ở các cơ sở, cơ quan phường xã, trường học. Các tuyên truyền viên này phải được đào tạo một cách chu đáo về công tác vận động hiến máu nhân đạo (VDHMND).

3.2. Công tác tuyên truyền giáo dục (TTGD)

• Công tác tuyên truyền giáo dục phải được tiến hành rộng khắp trên bình diện quảng đại quần chúng làm cho họ hiểu sâu sắc hơn phong trào HMND về tầm quan trọng của nó, nhất là ý nghĩa đạo lý của nó đối với đại biểu Quốc hội, vì chỉ những người này mới đưa ra được những luật trên bình diện quốc gia.

• Các biện pháp truyền thông giáo dục.

– Báo chí:

+ Phải có một tờ báo chuyên trách về HMND

+ Tờ báo của chữ thập đỏ

+ Báo sức khỏe của Bộ y tế.

– Đài phát thanh về hỏi đáp HMND, trước lúc phát thanh có nhạc, nhạc đặc trưng cho chương trình (nghe nhạc, người nghe có thể đoán được chương trình).

– Đài truyền hình Trung ương:

+ Mỗi tuần có 10 phút phát hình nói về HMND của các cơ sở - có nhạc đặc trưng cho chương trình kiểu như truyền thanh.

+ Có những bài hát, bản nhạc do những nhạc sĩ có tiếng sáng tác và các ca sĩ nổi tiếng hát nhằm động viên những người HMND, thì chắc chắn sẽ có tính hấp dẫn và đi vào lòng người.

- Cần biên soạn tài liệu, giáo trình và xuất bản tài liệu sư phạm đưa vào chương trình giảng dạy trong các trường.

- Tổ chức các buổi đối thoại với thanh niên, sinh viên, học sinh đó là tiềm lực cho máu rất quan trọng.

- Cần có những cuốn phim nói về mối liên quan đến máu, trong đó nhắc đến nguồn gốc, các khó khăn, nhu cầu, thành công và sự cần thiết phải hiến máu tự nguyện nhân đạo.

Phim này cũng cần nhờ các tác giả có tên tuổi viết kịch bản và một nhóm nghệ sĩ quen biết sắm vai và đạo diễn. Việc này phải được bảo trợ do các cấp có uy tín.

- Cần có những chiếc xe tuyên truyền khắp đường phố phân phát các tài liệu bỏ túi tờ rơi về HMNĐ.

- Dùng loa phóng thanh để thông báo những buổi lấy máu. Các trung tâm văn hoá, du lịch nên có áp phích, băng-rôn, khẩu hiệu về HMNĐ.

4. Thái độ tiếp xúc với người cho máu

- Thái độ vui vẻ niềm nở, hoà nhã thể hiện lòng tôn trọng và kính mến với người HMNĐ để làm vui lòng người hiến máu lúc đến và lúc ra về.

- Nơi tiếp đón phải thuận lợi cho việc đi lại, nơi gửi xe.

- Ngày giờ tiếp xúc vào tất cả các ngày trong tuần (từ 7 giờ 30 đến 22 giờ).

- Điện thoại thường trú 24/24 giờ để vừa tiếp đón, giải đáp, vừa tư vấn cho người cho máu.

- Nhân viên lấy máu phải ăn mặc lịch sự gọn gàng đúng với quy chế phòng xét nghiệm lấy máu.

- Nhân viên lấy máu trẻ khoẻ, có kỹ thuật tay nghề cao (lấy máu là được ngay), tránh gây đau cho người hiến máu.

- Với người hiến máu là nam giới thì nên bố trí nữ kỹ thuật viên lấy máu và ngược lại nếu là nữ thì nên bố trí nam kỹ thuật viên lấy máu.

- Ghế lấy máu phải là loại ghế chuyên dụng, phòng riêng biệt từng người để đảm bảo thoải mái và yên tĩnh. Trước lúc lấy máu, kỹ thuật viên nên có lời xin phép "Xin lỗi cho phép được lấy máu". Sau lúc lấy máu xong có lời cảm ơn vì đã hiến những giọt máu mình cho đồng loại thân yêu, tiếp đó mời ăn nhẹ, uống nước mát và mong gặp lại lần sau.

TUYỂN CHỌN NGƯỜI CHO MÁU

1. Mở đầu

Tuyển chọn người cho máu là một nhiệm vụ hết sức quan trọng của các cơ sở truyền máu trong việc đảm bảo cung cấp máu một cách đầy đủ và an toàn.

- Người cho máu có thể cho máu toàn phần, hoặc từng thành phần máu của mình.
- Hiện tại ở nước ta có ba nhóm người cho máu chính sau:
- + Người cho máu chuyên nghiệp
- + Người nhà, người thân bệnh nhân cho máu
- + Người cho máu nhân đạo, không lấy tiền

Một nhóm nữa trong người cho máu là người cho máu tự thân không đề cập đến trong bài này. Mục tiêu của ngành truyền máu là phải sớm nhất tiến tới có một hệ thống người cho máu thường xuyên, tình nguyện, nhân đạo và không lấy tiền.

2. Nguyên tắc

Việc tuyển chọn người cho máu phải đạt được những mục tiêu và nguyên tắc sau:

- Người cho máu là người hoàn toàn tự nguyện, khỏe mạnh, không thuộc các đối tượng có hành vi nguy cơ cao.
- Phải đảm bảo được sức khỏe người cho máu, không gây bất kỳ ảnh hưởng xấu tới sức khỏe hoặc các bệnh lây nhiễm do quá trình cho máu.
- Có được các đơn vị máu có chất lượng để đảm bảo được hiệu quả điều trị tốt, đồng thời không gây ra các bệnh lây truyền qua đường truyền máu cho bệnh nhân.
- Việc tuyển chọn người cho máu được tiến hành đồng thời tại các cơ sở truyền máu, lấy máu lưu động theo quy định chung
- Quản lý người cho máu: người cho máu phải được lập hồ sơ theo dõi cẩn thận với nội dung sau:

2.1. Nhân thân (lý lịch người cho máu): Khi một người đến cho máu ta phải có được các thông tin về họ một cách cụ thể và chính xác gồm:

- Họ và tên
- Giới
- Ngày tháng năm sinh
- Địa chỉ
- Số điện thoại nếu có
- Nghề nghiệp
- Nơi công tác
- Tiền sử bệnh tật
- Tình trạng sức khỏe hiện tại

Với những người mới, họ đến để tham gia vào nhóm người cho máu chuyên nghiệp chúng ta phải lập sổ hồ sơ và thẻ người cho máu, vậy cần bổ sung thêm:

- + Ảnh chụp gần nhất
- + Đặc điểm nhận dạng

Qua hỏi về tiền sử bệnh tật và tình trạng sức khỏe hiện tại của người cho máu, một vấn đề quan trọng là xác định xem người cho máu có thuộc nhóm nguy cơ cao hay không ?

Để xác định thân nhân người cho máu, nếu có thể được ta nên tham khảo thêm giấy tờ tùy thân của họ để khẳng định được tính chính xác về các thông tin có được. Với người cho máu họ đến để trở thành người cho máu chuyên nghiệp thì việc điều tra này với lần đến đầu tiên là rất cần thiết.

2.2. Diễn biến sức khỏe qua mỗi lần cho máu

Để có thể đạt được yêu cầu này, chúng ta cần có và lưu giữ các thông tin về khám lâm sàng, kết quả xét nghiệm, ngày khám và cho máu, lượng máu được lấy sau mỗi lần cho máu.

2.2.1. Các kết quả khám lâm sàng

– Trước mỗi lần cho máu, đặc biệt với lần cho máu đầu tiên, người cho máu cần được trao đổi cẩn thận với thầy thuốc của cơ sở lấy máu. Qua đó có thể thấy được hoặc không ở người đến cho các hành vi nguy cơ cao trước khi đến cho máu hoặc giữa hai lần cho máu), các chống chỉ định tạm thời hoặc vĩnh viễn. Đồng thời giáo dục cho họ về sự cần thiết của máu trong điều trị, song song với nó là sự an toàn của máu được cho ý nghĩa của giai đoạn cửa sổ của các bệnh lây truyền qua đường truyền máu. Chúng ta cần có các nội dung điều tra cụ thể được chuẩn bị trước một cách kỹ lưỡng, có thể vừa hỏi trao đổi vừa ghi nhận hoặc người cho máu sẽ tự ghi sau khi được hướng dẫn cẩn thận. Để thực hiện được một cách hiệu quả công việc này, chúng ta phải đảm bảo được nguyên tắc bí mật riêng tư của người cho máu và phải làm sao để họ tin cậy và trả lời một cách trung thực. Điều này rất khó thực hiện được với người cho máu chuyên nghiệp, chỉ có thể làm tốt khi một người đến với chúng ta để cho máu một cách hoàn toàn tự nguyện, nhân đạo và không lấy tiền.

- Tình trạng chung về sức khỏe:
- + Chiều cao
- + Cân nặng
- + Da, niêm mạc
- + Các biểu hiện cơ năng sau mỗi lần cho máu
- + Tình trạng hệ thống tim mạch trước mỗi lần cho
- Khoảng thời gian giữa hai lần cho máu

2.2.2. Một số các xét nghiệm về sức khỏe người cho máu

- Huyết sắc tố
- Đường niệu, protein niệu
- X quang tim phổi

2.2.3. Các xét nghiệm sàng lọc các bệnh lây truyền qua đường truyền máu

- Các bệnh do virus:
 - + Viêm gan B
 - + Viêm gan C
 - + HIV
- Các bệnh do virus và ký sinh trùng:
 - + Sốt rét
 - + Giang mai

Tuỳ theo các điều kiện có thể về nhân lực, kỹ thuật và khả năng tài chính, từng cơ sở truyền máu có thể tiến hành thêm một số xét nghiệm ở mức độ chính xác cao hơn, khi đã có thì cũng cần lưu giữ các kết quả này trong hồ sơ người cho máu.

Cũng tuỳ theo nhu cầu, khả năng kỹ thuật, nhân lực và tài chính, để lưu giữ các thông tin nói trên về người cho máu cả về lý lịch người cho, các theo dõi về lâm sàng và xét nghiệm, chúng ta có thể phối hợp hoặc sử dụng một trong các hình thức sau:

- Bằng hồ sơ
- Bằng phiếu lỗ
- Hoặc tin học

Cần lưu ý các thông tin về người cho máu phải được cập nhật kịp thời, chính xác để có thể theo dõi diễn biến sức khoẻ người cho qua mỗi lần cho máu và tư vấn cho họ một cách kịp thời. Mặt khác theo dõi được chất lượng và sự an toàn của đơn vị máu được lấy để có biện pháp xử lý phù hợp.

Việc quản lý hồ sơ người cho máu phải đảm bảo nguyên tắc bí mật cho người cho máu. Các thông tin thu được chỉ nhằm mục đích chuyên môn, tư vấn người cho máu, tránh tuyệt đối gây ra sự hiểu lầm và những phiền phức đối với người cho.

3. Các tiêu chuẩn cho máu

Các tiêu chuẩn sau đây chủ yếu vẫn dựa theo quy chế truyền máu do Bộ Y tế ban hành năm 1992

3.1. Tuổi: Đối với nam: 18-60 tuổi

Đối với nữ: 18-55 tuổi

3.2. Cân nặng: Đối với nam: > 45 kg

Đối với nữ: > 42 kg

3.3. Khoảng cách giữa hai lần cho máu: là 2,5 tháng. Tốt nhất nên áp dụng thêm một yêu cầu là không quá 5 lần/ năm đối với nam, và không quá 3 lần/ năm đối với nữ.

3.4. Thể tích máu được lấy: Không vượt quá 7 ml/ 1 kg thể trọng; hoặc không quá 13% thể tích máu ước tính.

3.5. Các tiêu chuẩn về lâm sàng

- Người cho máu phải hoàn toàn tỉnh nguyện, khoẻ mạnh.
- Là những người không có biểu hiện về các hành vi nguy cơ cao (không thuộc nhóm người nguy cơ cao).
- Không có các chống chỉ định cho máu tạm thời hoặc vĩnh viễn
- Hệ thống tim mạch:
 - + Mạch: 60 nhịp < Mạch < 100 nhịp/ phút
 - + Huyết áp: 90 mmHg < Huyết áp tối đa < 140 mmHg

3.6. Các tiêu chuẩn về xét nghiệm

3.6.1. Các xét nghiệm huyết học

Huyết sắc tố >110g/l đối với cả nam và nữ, tốt nhất là được >125g/l đối với cả nam và nữ

3.6.2. Các xét nghiệm sàng lọc các bệnh virus

- Viêm gan B: âm tính
- Viêm gan C: âm tính
- HIV : âm tính

3.6.3. Các xét nghiệm sàng lọc các bệnh vi trùng và ký sinh trùng

- Sốt rét: âm tính
- Giang mai: âm tính

3.6.4. Các xét nghiệm khác

- Đường niệu, protein niệu: âm tính
- X quang tim phổi: bình thường

4. Tiêu chuẩn người cho huyết tương và tế bào

Trừ các trường hợp đặc biệt thì người cho huyết tương hoặc cho tế bào cũng phải có các tiêu chuẩn theo thông lệ như người cho máu toàn phần bình thường về tuyển chọn, quản lý người cho.

4.1. Cho tế bào: người cho máu cũng phải được kiểm tra

- Kiểm tra lâm sàng
- Mạch, huyết áp
- Đường, protein niệu
- Các xét nghiệm sàng lọc các bệnh lây truyền
- Các xét nghiệm huyết học, sinh hoá:

- + Đếm số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu
- + Protein huyết thanh, protein toàn phần
- + Điện giải đồ
- + Định lượng một số protein huyết thanh ví dụ: albumin, IgG..)

Các xét nghiệm trên phải có kết quả bình thường. Về số lần cho tế bào không quá 2 lần/ năm. Trừ các trường hợp hết sức đặc biệt cần thiết ví dụ trong các trường hợp miễn dịch đặc biệt hoặc người cho máu có quan hệ ruột thịt với người nhận, thì số lần có thể tăng lên tối đa là 4 lần/ năm.

Cần chú ý rằng việc cho tế bào chỉ thực hiện với người cho dưới 50 tuổi.

4.2. Cho huyết tương: người cho cần phải được kiểm tra

- Kiểm tra lâm sàng
- Mạch, huyết áp
- Huyết sắc tố hoặc hematocrit
- Các xét nghiệm sàng lọc các bệnh lây truyền
- Các xét nghiệm sinh hoá: phân tích protein huyết thanh (protein toàn phần hoặc định lượng một số protein như albumin và IgG).
- Đếm số lượng tiểu cầu > 150 G/l

Các kết quả trên phải nằm trong giới hạn bình thường.

Khi cho huyết tương người cho có thể cho tối đa:

- + 10 lít trong 1 năm
- + 2 lít trong 1 tháng
- + Không quá 500ml trong 1 lần

Thời gian tối thiểu để có thể cho máu toàn phần sau khi cho huyết tương là 48 giờ.

KỸ THUẬT THU GOM MÁU

I. KỸ THUẬT LẤY MÁU BẰNG TÚI CHẤT Dẻo

1. Mở đầu

Việc sử dụng túi dẻo trong truyền máu là một phương tiện phù hợp rất tốt cho hiện tại và lâu dài. Túi nhựa với nhiều ưu điểm của nó tạo điều kiện thuận lợi cho việc lấy máu, sản xuất các chế phẩm máu, cũng như trong việc bảo quản và phân phối.

Túi lấy máu cùng các dụng cụ kèm theo sử dụng một lần tạo sự dễ chịu và an toàn cho người cho máu, không gây các tác hại do quá trình cho máu.

2. Nguyên tắc

– Lấy máu bằng túi là lấy máu theo một quy trình kín do vậy không đòi hỏi phải có buồng vô trùng, có thể thực hiện được ở nhiều nơi (ví dụ như trong lấy máu lưu động).

– Để đảm bảo được tính năng và các ưu điểm của túi lấy máu đòi hỏi kỹ thuật phải được thực hiện theo một trình tự chặt chẽ, chính xác.

3. Vị trí tổ chức lấy máu

Với việc sử dụng túi dẻo trong lấy máu, chúng ta sẽ không cần đến buồng vô trùng như đối với lấy máu bằng chai như trước đây. Tại các cơ sở lấy máu cố định chỉ cần có một buồng to phù hợp với nhu cầu của mình. Với lấy máu lưu động ta có thể tiến hành tại nhiều nơi như hội trường, lớp học...thậm chí có thể thực hiện được cả ở vườn hoa, trong công viên...v.v

Nhưng cũng cần chú ý vị trí tổ chức phải đặt tại một nơi rộng rãi, thoáng mát, sạch sẽ, không khí trong lành, đầy đủ ánh sáng, để có thể thực hiện được kỹ thuật một cách chính xác, tránh các lây nhiễm và tạo được sự thoải mái dễ chịu đối với người cho máu trước, trong và sau khi cho máu.

4. Phương tiện, dụng cụ: ở đây chúng ta chỉ đề cập đến những phương tiện và dụng cụ phục vụ trực tiếp cho kỹ thuật lấy máu.

1. Giường lấy máu: Được sản xuất chuyên dụng cho lấy máu, với các nơi không có điều kiện có thể sử dụng giường phẳng ngang thay thế. Đi lấy máu lưu động nếu không sử dụng ô tô lấy máu chuyên dùng thì nên dùng giường gấp để dễ vận chuyển và lắp đặt.

2. Máy lắc máu: Vừa có tác dụng trộn lẫn chất chống đông với máu vừa có tác dụng xác định thể tích máu được lấy.

3. Dụng cụ xác định thể tích máu định lấy: Nếu không có máy lắc máu, phải thực hiện động tác này bằng tay thì cần có các dụng cụ xác định thể tích máu định lấy như: cân bằng, cân treo hoặc hộp lỏng.

4. Túi lấy máu: đơn, đôi, hoặc túi ba tùy theo nhu cầu cơ sở.

5. Máy hàn dây (nếu có thể) có hai loại để cố định và di động.

6. Kim vuốt dây lấy máu

7. Khoá nhôm

8. Kẹp hoặc panh nhựa

9. Băng gạc vô trùng và hộp đựng

10. Băng dính

11. Dụng cụ sát trùng

- Cồn Iod hoặc cồn 70° sát trùng chỗ lấy ven.
- Nước Javen: lau và tẩy uế những vết máu dây, dính ra khu vực lấy máu.
- 12. Panh, kéo kim loại
- 13. Dây garô
- 14. Quả nắm cho người cho nắm khi lấy máu
- 15. Bút dạ
- 16. Ống nghiệm và giá để ống nghiệm
- 17. Bàn lấy máu
- 18. Dụng cụ đựng rác thải: hộp, thùng, túi nilon

5. Xác định thể tích máu định lấy

5.1. Sử dụng máy lắ máu

Thường thì các máy lắ máu có kèm tính năng xác định thể tích máu định lấy (theo nguyên lý thể tích hoặc trọng lượng). Máy sẽ tự động khoá dây, báo hiệu ngừng lấy khi lượng máu định lấy đã được lấy đủ. Cần điều chỉnh máy theo lượng máu định lấy trước khi tiến hành lấy máu.

5.2. Hộp lồng

Dụng cụ này có cấu tạo đơn giản, rẻ tiền, dễ bảo quản. Cũng phải chú ý kiểm tra và điều chỉnh thể tích hộp lồng bằng các miếng nhựa (adapter) tùy theo thể tích máu định lấy trước khi tiến hành kỹ thuật. Khi túi máu nằm chặt trong hộp lồng, tức là lượng máu định lấy đã đủ thì máu cũng không vào thêm được nữa.

5.3. Cân

Có thể sử dụng cân bàn hoặc cân treo, chú ý phải sử dụng loại cân dùng để cân các vật có trọng lượng nhỏ (nên từ 500-1000g) để đảm bảo được độ chính xác cao của cân. Với dụng cụ này xác định thể tích máu định lấy bằng trọng lượng của nó, dựa theo cách tính toán sau:

- Tỷ trọng máu = 1,01g /ml.
- Trọng lượng túi = Trọng lượng bao bì + trọng lượng dung dịch chống đông
- Trọng lượng máu = Số ml máu định lấy x 1,01g.

Vậy:

Trọng lượng cuối cùng = Trọng lượng túi + Trọng lượng thể tích máu định lấy

Ví dụ: Giả sử túi lấy máu 250ml có trọng lượng 75g

Thể tích máu định lấy là 250ml vậy trọng lượng sẽ là: 250ml x 1,01g = 252,5g

Do đó tổng cộng sẽ là 7,5g + 252,5g = 327,5g

Khi trọng lượng túi máu đặt hoặc treo trên cân đạt tới 327,5g tức là đã lấy đủ số lượng máu dự định là 250ml.

6. Chuẩn bị trước khi lấy máu: (Không đề cập đến việc chuẩn bị khu vực lấy máu)

– Kiểm tra dụng cụ lấy máu: đã đầy đủ về chủng loại, số lượng và chất lượng. Sắp xếp dụng cụ đã ngăn nắp và thuận tiện.

– Kiểm tra túi lấy máu: kiểm tra về chủng loại, số lượng lưu ý chỉ mở các hộp đựng túi lấy máu sát với số lượng đơn vị máu định lấy) độ toàn vẹn của các túi lấy máu. Kiểm tra thành phần dung dịch chống đông trong túi để xác định được hạn lưu giữ bảo quản máu. Xác định trọng lượng của loại túi được dùng.

– Cho người cho máu nằm lên trên giường trước khi lấy máu khoảng vài phút.

– Bằng việc hỏi trực tiếp người cho máu để kiểm tra sự phù hợp về các thông tin người cho máu so sánh với thẻ hoặc phiếu cho máu của họ (họ tên, tuổi, địa chỉ, nhóm máu...). Nếu có bất kỳ một sự không phù hợp nào cần ngừng ngay lại để tiến hành kiểm tra xác định nguyên nhân và có biện pháp xử lý phù hợp.

– Xác định lượng máu định lấy, yêu cầu lấy máu nhằm mục đích gì khác thông lệ không, để chuẩn bị túi lấy máu tương ứng.

Ví dụ: + Lấy máu bằng túi đôi hay ba?

+ Thể tích máu định lấy 250ml, 350ml hay 450ml?

+ Nếu lượng máu định lấy ít hơn, cần điều chỉnh lượng dung dịch chống đông, thì tính toán để loại bỏ bớt một phần tương ứng dung dịch chống đông có sẵn trong túi.

– Điền các thông tin được yêu cầu lên nhãn của túi nhựa:

+ Họ tên và/ hoặc số người cho máu.

+ Nhóm máu: nếu có

+ Ngày lấy máu và / hoặc hạn sử dụng

+ Tên kỹ thuật viên hoặc y tá thực hiện kỹ thuật lấy máu

+ Kết quả xét nghiệm nếu có.

Nếu là các trường hợp lấy máu có tính chất đặc biệt cần ghi cụ thể mục đích, yêu cầu cụ thể lên nhãn túi và có đánh dấu rõ ràng.

– Xác định trọng lượng toàn bộ túi máu khi đủ máu như đã hướng dẫn ở trên.

– Điền thông tin theo quy định lên ống máu mẫu (pilot) hoặc ống máu dùng cho xét nghiệm.

7. Tiến hành lấy máu

7.1. Ngay trước khi lấy máu

– Nếu thấy cần thiết có thể kiểm tra lại các thông tin người cho máu đã nêu ở trên.

– Hỏi xem người cho máu có thoải mái, dễ chịu và đã sẵn sàng cho máu chưa.

– Kiểm tra lại tư thế nằm của người cho đã thoải mái hợp lý chưa.

- Bộc lộ thật cao cánh tay người cho ở bên dự định lấy máu.
- Đặt dây garô: độ chặt vừa phải, phía trên nếp gấp khuỷu tay khoảng 5-7cm.
- Chọn vị trí chọc ven: chọn ven to, căng, ít di động, thường nằm ở giữa nếp lằn khuỷu tay. Lưu ý việc lựa chọn vị trí chọc ven cần rất cẩn thận để tránh gây các trục trặc trong giai đoạn sau và gây đau cho người cho máu. Nếu chưa thật thoải mái với ven đã chọn thì có thể so sánh với ven ở tay bên kia để chọn được ven tốt nhất.
- Một lần nữa kiểm tra lại độ toàn vẹn của túi máu và kim, dung dịch chống đông, các nội dung đã ghi.
- Làm một nút thắt lỏng trên dây lấy máu cách kim lấy máu khoảng 15-20cm sau đó dùng panh kẹp chặt dây lấy máu lại. Có thể không cần làm nút thắt này nếu ta sử dụng kỹ thuật hai panh kẹp khi hoàn thiện quá trình lấy máu, nhưng kỹ thuật này hơi rườm rà và có một số nhược điểm nên chúng tôi không đề cập ở đây.

7.2. Tiến hành lấy máu

- Trong những trường hợp lấy máu lưu động, số lượng người cho nhiều, có thể gây mất trật tự, người kỹ thuật viên hoặc y tá phụ trách lấy máu nhiều giường nên kiểm tra sự phù hợp về các thông tin người cho với các nội dung được ghi trên thẻ và túi lấy máu. Một lần nữa hỏi người cho máu đã sẵn sàng chưa..

- Tiến hành chọc ven, dùng cồn Iod hoặc cồn 70° sát trùng vị trí định tiến hành chọc ven. Động tác chọc ven cần tiến hành chính xác, nhanh chóng và dứt khoát. Đi qua da ở vị trí cạnh ven (tránh đi thẳng vào vị trí có ven do dễ gây loang máu ra xung quanh vị trí chọc, rất xấu về mặt kỹ thuật) sau đó đưa kim vào lòng ven, chú ý cần đưa kim sâu vào trong lòng ven để kim được cố định tốt tránh gây di lệch về sau.

Khi đã cảm giác được kim nằm trong ven rồi, ta mở panh kẹp dây lấy máu sẽ thấy máu chảy nhanh từ dây lấy máu vào túi.

- Cố định tốt kim bằng băng dính sau khi theo dõi thấy máu chảy tốt.
- Chú ý nếu động tác chọc ven không thành công, có thể dò tìm tĩnh mạch (ven) cần phải cố gắng hết sức, tránh gây đau đớn cho người cho. Sau một hoặc hai lần dò không được, thì không nên cố quá mà nên đổi cho người kỹ thuật viên hoặc y tá khác làm giúp. Nếu cảm giác không tin tưởng thành công thì nên đổi sang tay khác và cho người cho máu nghỉ một lát. Cần lưu ý trước khi rút kim ra khỏi tay người cho máu cần kẹp lại dây lấy máu (tháo garô, đặt băng vô trùng vào chỗ chọc). Khi rút kim kiểm tra xem có máu đông ở đầu kim hay không, nếu không có cần đẩy ngay mũi kim lại. Nếu có cục đông ở đầu kim thì dốc ngược túi máu, mở nhẹ panh kẹp dây dùng một lượng rất nhỏ dung dịch chống đông trong túi để đẩy cục đông ra khỏi mũi kim, sau đó kẹp panh dây lấy máu và đẩy mũi kim lại. Thực hiện lại từ đầu với lần chọc thứ hai với sự cẩn thận cao hơn.

7.3. Theo dõi quá trình lấy máu

- Theo dõi tình trạng người cho máu trong quá trình lấy máu: với các biểu hiện về nét mặt, sắc da.. Thỉnh thoảng có thể hỏi người cho máu một số câu xã giao. Nếu có biểu hiện không bình thường thì cần ngừng ngay quá trình cho máu, gọi bác sĩ phụ trách để có hướng xử lý, phù hợp, kịp thời.

- Trộn chất chống đông và máu: động tác này không phải làm nếu lấy bằng máy lắ máu. Nếu sử dụng bằng tay thì có thể làm động tác xoa bóp, nhồi ép hoặc đảo chiều túi máu một cách nhẹ nhàng. Động tác này cần được làm liên tục trong phút đầu tiên, sau đó có thể chỉ cần làm khoảng 50ml/1 lần (1-2 phút/1 lần).

- Nên yêu cầu người cho máu nắm chặt bàn tay, hoặc co bóp bàn tay (có thể dùng quả nắm) để máu chảy được tốt hơn. Nếu thấy dòng chảy kém, cần kiểm tra lại garô hoặc lỏng hoặc chặt quá, kiểm tra lại vị trí kim được cố định có tốt không.

- Theo dõi thể tích máu được lấy: như đã trình bày ở trên.

+ Nếu dùng máy lắ máu: sẽ tự động khoá dây lấy máu và báo động khi đủ lượng máu định lấy.

+ Với lấy máu bằng cân: tổng trọng lượng túi máu đã đến trọng lượng yêu cầu tức là đã lấy đủ máu theo dự tính.

+ Với lấy máu bằng hộp lỏng: khi lấy đủ máu ta sẽ thấy túi máu nằm chặt trong hộp lỏng, lắ túi máu sẽ có cảm giác chặt.

7.4. Hoàn thiện quá trình lấy máu: khi đã lấy đủ lượng máu dự định.

- Thắt chặt nút thắt lỏng được làm lúc trước đến khi thấy nút thắt trắng ra không có máu nằm ở nút là đạt yêu cầu.

- Kẹp dây lấy máu sát với nút thắt về phía kim.

- Kéo panh kẹp về phía kim, cách nút thắt khoảng 2-3cm. Khi kéo panh ra ta sẽ thấy phần dây giữa nút thắt và panh kẹp lại và không có máu ở đoạn đó là được.

- Dùng kéo cắt dây lấy máu ở đoạn giữa nút thắt và tay kẹp tách rời túi lấy máu khỏi người cho.

- Lấy máu vào ống nghiệm: mở nhẹ panh kẹp lấy một lượng máu vừa đủ, sau đó lại kẹp lại, tháo dây garô, đặt bông vô trùng vào vị trí chọc ven, rút kim ra từ từ (tránh rút kim nhanh gây phản ứng cho người cho máu), phần máu trong đoạn dây còn lại cho nốt vào ống nghiệm thử lại. Đậy nút kim và bỏ đoạn dây và kim vào hộp chứa đồ thải.

- Cố định bông cầm máu bằng băng dính, nhưng nên nhắc người cho duỗi tay, lấy tay kia ấn bông cầm máu khoảng vài phút. Không nên gập tay để gây chảy máu do bông không ép chặt vào vết chọc kim.

- Hỏi người cho máu có dễ chịu sau khi cho máu không. Nên để người cho máu nằm thêm một vài phút sau khi cho, trả cho họ thẻ hoặc phiếu cho máu sau khi diện lượng máu đã cho. Hướng dẫn người cho máu ra nơi ăn điểm tâm nhẹ sau khi cho máu. Cần cảm ơn người cho máu.

- Dùng kim vuốt vuốt phần máu trong dây về túi máu làm từ một đến hai lần để máu trong dây được trộn lẫn với chất chống đông.

- Gắn cố thêm nút thắt trên dây lấy máu bằng máy hàn hoặc khoá nhôm (ở vị trí sát với nút thắt đã được làm) .

- Ghi số lượng máu được lấy lên nhãn túi, hoàn chỉnh nốt các thông tin yêu cầu nếu còn thiếu. Chuyển các túi máu và ống nghiệm sang bộ phận tiếp theo.

II. KỸ THUẬT THU GOM MÁU, CÁC THÀNH PHẦN MÁU BẰNG MÁY TỰ ĐỘNG (xem chương 6)

KỸ THUẬT SÀNG LỌC CÁC BỆNH NHIỄM TRÙNG TRUYỀN QUA ĐƯỜNG TRUYỀN MÁU

1. Sàng lọc HIV, HBV, HCV

• *Hiện nay có ba loại thử nghiệm hay được sử dụng nhất để sàng lọc HIV, HBV, HCV cho người cho máu là:*

- Thử nghiệm miễn dịch gắn men (ELISA: Enzyme-Linked Immuno-Sorbent-Assay).
- Thử nghiệm ngưng kết hạt.
- Thử nghiệm nhanh.

• *Khi lựa chọn sử dụng một trong ba thử nghiệm trên, có một số điểm cần chú ý như sau:*

- Nguyên lý kỹ thuật
- Sự phức tạp của thử nghiệm
- Thời gian phản ứng
- Độ nhạy
- Độ đặc hiệu
- Khả năng thích hợp của từng phòng xét nghiệm
- Sự tiện lợi
- Giá cả

• *Nguyên lý của thử nghiệm:* Cả ba thử nghiệm trên đều dựa trên cùng một nguyên lý sinh học, bao gồm hai bước cơ bản:

– Sự có mặt của kháng nguyên hay kháng thể đặc hiệu trong mẫu máu cần xét nghiệm thể hiện bằng phản ứng miễn dịch với kháng thể hay kháng nguyên tương ứng đã được gắn trên pha rắn để tạo thành phức hợp miễn dịch kháng nguyên- kháng thể.

– Nhận biết phức hợp miễn dịch kháng nguyên-kháng thể nhờ hệ thống chỉ thị màu.

• *Mẫu xét nghiệm:*

Hiện nay, hầu hết các thử nghiệm có thể sử dụng huyết thanh hoặc huyết tương, tuy nhiên phải tuân thủ theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất là dùng huyết thanh hay huyết tương.

• *Dụng cụ và thuốc thử:*

- Dụng cụ:
- + Máy ly tâm

- + Tủ lạnh
- + Hệ thống máy ELISA tự động hoặc bán tự động
- + Pipetman
- + Tủ sấy
- + Bình cách thuỷ
- + Đầu côn các loại, giá để đầu côn
- + Ống nghiệm tan máu
- + Giá để gắn giếng nhựa
- + Buồng tối để ủ trong giai đoạn hiện màu
- Thuốc thử:
 - + Các giếng nhựa đã được gắn sẵn kháng nguyên HIV1 và HIV2, kháng nguyên loại IgG và IgM.
 - + Dung dịch hoà loãng mẫu
 - + Cộng hợp (Kháng thể kháng γ -globulin người gắn enzym hoặc kháng thể đặc hiệu gắn enzym hoặc kháng nguyên đã biết gắn enzym).
 - + Dung dịch cơ chất
 - + Dung dịch acid để ngừng phản ứng
 - + Dung dịch rửa
 - + Chứng âm
 - + Chứng dương
 - + Chứng ngưỡng
 - + Nước cất

1.1. Thử nghiệm ELISA

- Đây là loại thử nghiệm phức tạp nhất trong ba loại thử nghiệm, tuy nhiên nếu đã nắm được nguyên lý của thử nghiệm ELISA thì sẽ nhanh chóng hiểu được nguyên lý của thử nghiệm ngưng kết và thử nghiệm nhanh.

- Hiện nay có nhiều loại thử nghiệm ELISA để phát hiện kháng thể, hầu hết các thử nghiệm đều dựa trên nguyên tắc dùng kháng nguyên của virus đã được cố định trên pha rắn để phát hiện kháng thể có trong mẫu xét nghiệm hoặc gắn KT để phát hiện KN.

- Các thử nghiệm ELISA có thể làm bằng tay, trên các hệ thống máy ELISA tự động hoặc bán tự động.

1.1.1. Thử nghiệm ELISA loại kháng γ -globulin

a. Nguyên lý của phản ứng

- Sự có mặt của kháng thể đặc hiệu trong mẫu máu cần xét nghiệm thể kết hợp với kháng nguyên đã biết gắn trên pha rắn để tạo thành phức hợp miễn dịch kháng nguyên- kháng thể.

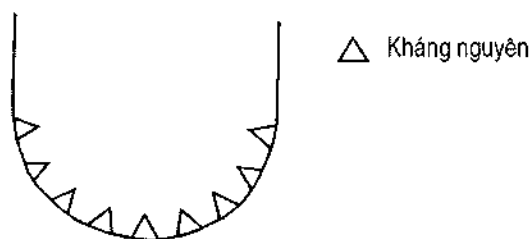
– Nhận biết phức hợp miễn dịch (kháng nguyên-kháng thể) nhờ hệ thống chỉ thị màu.

b. Các bước tiến hành thử nghiệm

Bước 1: Kiểm tra máy rửa, ủ và máy đọc, đưa sinh phẩm và thuốc thử về nhiệt độ phòng thí nghiệm (22°C), chuẩn bị dung dịch rửa.

Bước 2: Lập sơ đồ xét nghiệm (Vị trí các giếng nhỏ chứng, nhỏ mẫu xét nghiệm).

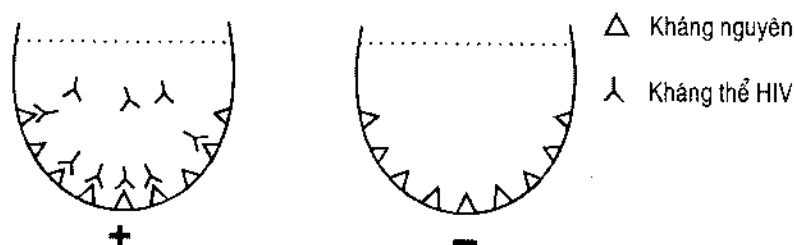
Bước 3: Lấy các giếng nhựa đã được gắn bản kháng nguyên HIV ra khỏi túi giấy bạc và gắn vào phiến nhựa (Hình 6.1).



Hình 6.1: Kháng nguyên HIV được gắn trên phiến nhựa

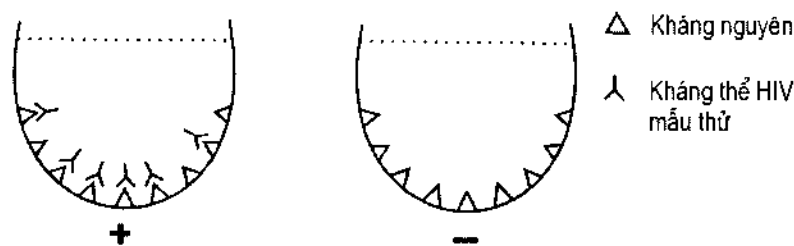
Bước 4: Nhỏ dung dịch hoà loãng mẫu vào tất cả các giếng

Bước 5: Nhỏ chứng và huyết thanh cần xét nghiệm vào các giếng theo đúng sơ đồ đã lập và ủ trong thời gian nhất định ở nhiệt độ xác định. Trong thời gian này, các kháng thể đặc hiệu có trong huyết thanh cần xét nghiệm sẽ phản ứng với kháng nguyên đã biết (HIV, HCV) đã được gắn trên bề mặt giếng nhựa (Hình 6.2).



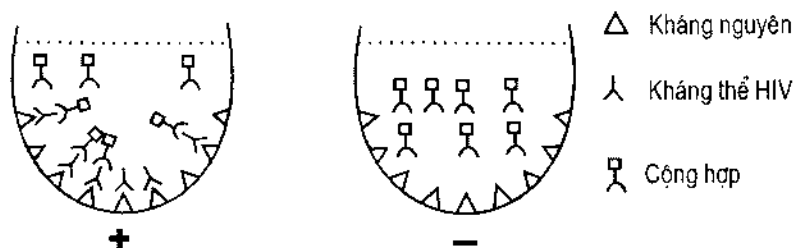
Hình 6.2: Kháng thể HIV được gắn với kháng nguyên HIV

Bước 6: Loại bỏ KT thừa vào cuối giai đoạn ủ, rửa giếng để loại bỏ KT thừa và huyết thanh, chuẩn bị cho bước tiếp theo (Hình 6.3). Có thể tiến hành rửa trên máy rửa tự động hoặc bán tự động, lần rửa cuối cùng cần làm khô đáy giếng.



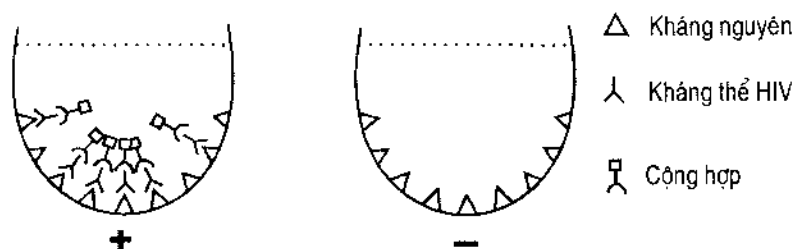
Hình 6.3: Loại bỏ huyết thanh và kháng thể thừa

Bước 7: Thêm dung dịch cộng hợp vào tất cả các giếng rồi ủ ở nhiệt độ nhất định trong thời gian xác định (Hình 6.4). Trong giai đoạn này cộng hợp có bản chất là một kháng kháng thể gắn enzym, cộng hợp sẽ là cầu nối giữa phức hợp kháng nguyên –kháng thể đặc hiệu và chất hiện màu. Cộng hợp chỉ gắn với kháng thể mà đã được gắn với kháng nguyên gắn bản (Hình 6.4).



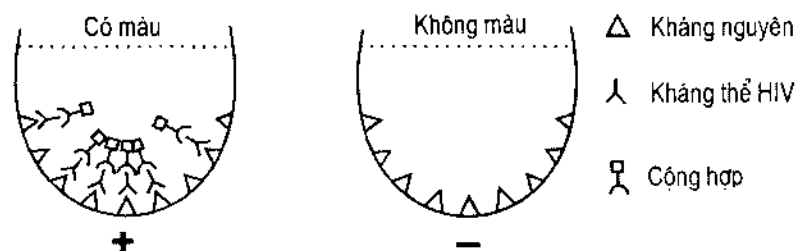
Hình 6.4: Cộng hợp được gắn với phức hợp kháng nguyên-kháng thể

Bước 8: Cuối giai đoạn ủ, rửa giếng loại bỏ thành phần thừa, cộng hợp không gắn và chuẩn bị bước tiếp theo. Quá trình rửa cũng giống như mô tả ở bước 6 (Hình 6.5).



Hình 6.5: Loại bỏ cộng hợp thừa

Bước 9: Thêm ngay dung dịch cơ chất vào tất cả các giếng và ủ ở nhiệt độ xác định, thường là từ 18 - 25°C, trong thời gian nhất định. Dung dịch cơ chất chứa một chất hoá học là chất hiệu màu. Khi thêm dung dịch cơ chất vào giếng có chứa các thành phần gắn cộng hợp, enzym sẽ hoạt hoá cơ chất và do vậy hình thành chất màu trong giếng. Các giếng không chứa thành phần gắn cộng hợp sẽ không thay đổi màu khi thêm cơ chất vào giếng (Hình 6.6). Các giếng có phản ứng (giếng ban đầu chứa huyết thanh HIV dương tính) thì có màu, trong khi giếng không phản ứng (giếng ban đầu chứa huyết thanh âm tính) thì không màu. Các giếng nhỏ chứng âm, chứng dương thì có màu khác nhau.



Hình 6.6: Enzym hoạt hoá cơ chất

Bước 10: Cuối giai đoạn ủ, thêm dung dịch acid hoà loãng vào tất cả các giếng để dừng phản ứng. Acid có tác dụng bất hoạt enzym và cố định màu.

Bước 11 : Đọc mật độ quang (giá trị OD) của dung dịch trong giếng và đánh giá kết quả thử nghiệm.

1.1.2. Thử nghiệm ELISA cạnh tranh

a. Nguyên lý phản ứng

Thử nghiệm ELISA cạnh tranh cũng giống như kiểu ELISA kháng globulin. Kháng thể gắn với kháng nguyên cố định và sau đó sự có mặt của kháng thể được phát hiện, kết quả ngược lại với kỹ thuật trên phản ứng (+) không có KT đặc hiệu, phản ứng (-) có KT đặc hiệu, kết luận: kết quả (+).

b. Các bước tiến hành

Bước 1: Chuẩn bị : Kiểm tra máy rửa, ủ và máy đọc, đưa sinh phẩm và thuốc thử về nhiệt độ phòng thí nghiệm (22°C), chuẩn bị dung dịch rửa.

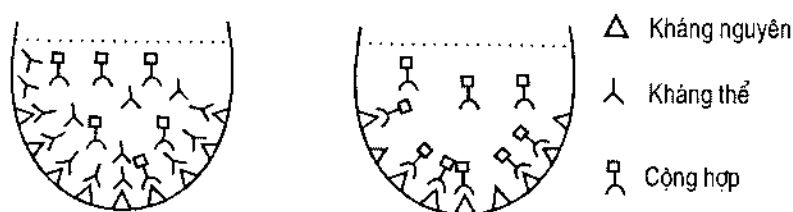
Bước 2: Lập sơ đồ xét nghiệm (Vị trí các giếng nhỏ chứng, nhỏ mẫu xét nghiệm)

Bước 3: Lấy các giếng nhựa đã được gắn bản kháng nguyên đặc hiệu ra khỏi túi giấy bạc và gắn vào phiến nhựa (Hình 6.1).

Bước 4: Nhỏ chứng và huyết thanh cần xét nghiệm vào các giếng theo đúng sơ đồ đã lập và ủ trong thời gian nhất định ở nhiệt độ xác định. Trong thời gian này, các kháng thể đặc hiệu có trong huyết thanh cần xét nghiệm sẽ gắn với kháng nguyên đã biết gắn trên bề mặt giếng nhựa.

Bước 5: Thêm dung dịch cộng hợp KT đặc hiệu với KN đã gắn men vào tất cả các giếng rồi ủ ở nhiệt độ nhất định trong thời gian xác định.

Bước 6: Các giếng đem ủ ở nhiệt độ xác định trong thời gian nhất định. Trong thời gian này, kháng thể đặc hiệu nào có mặt trong huyết thanh cần xét nghiệm sẽ cạnh tranh với kháng thể đặc hiệu gắn men cộng hợp về vị trí gắn với kháng nguyên virus (Hình 6.7)



Hình 6.7: Cạnh tranh giữa cộng hợp và kháng thể HIV

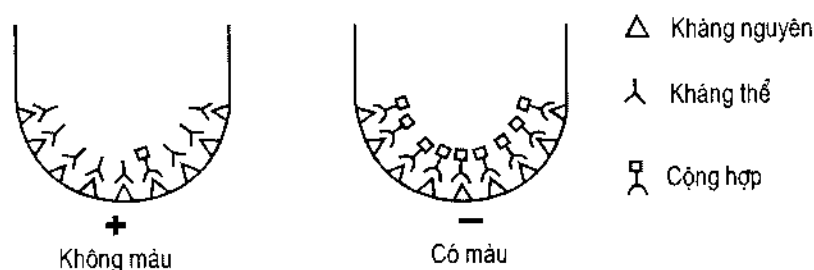
Bước 8: Cuối giai đoạn ủ, rửa giếng loại bỏ huyết thanh, cộng hợp không gắn và chuẩn bị bước tiếp theo.

Bước 9: Thêm ngay dung dịch cơ chất vào tất cả các giếng và ủ ở nhiệt độ xác định, thường là từ 18 - 25°C, trong thời gian nhất định.

Bước 10: Cuối giai đoạn ủ, thêm dung dịch acid vào tất cả các giếng để dừng phản ứng. Acid có tác dụng bất hoạt enzym và cố định màu.

Bước 11 : Đọc mật độ quang (giá trị OD) của dung dịch trong giếng và đánh giá kết quả thử nghiệm.

Nếu không có kháng thể đặc hiệu trong mẫu xét nghiệm, thì kháng thể cộng hợp sẽ gắn với kháng nguyên trong giếng và sự có mặt của enzym sẽ hoạt hoá cơ chất thành sản phẩm có màu. Ở giếng có kháng thể đặc hiệu trong mẫu xét nghiệm, sự có mặt của kháng thể sẽ ngăn cản kháng thể cộng hợp gắn với kháng nguyên và vì vậy có ít hoặc không có mặt enzym trong giếng và dẫn đến có ít hoặc không hoạt hoá cơ chất và không có màu (Hình 6.8).



Hình 6.8: Loại bỏ huyết thanh và cộng hợp thừa

1.1.3. Thử nghiệm ELISA kiểu bánh kẹp (sàng lọc kháng thể như HIV hoặc kháng nguyên như HBsAg).

Hiện nay phần lớn các thử nghiệm phát hiện anti-HIV và HBsAg của các hãng sản xuất quốc tế là loại này.

a. Phát hiện kháng thể (kháng thể HIV)

- **Nguyên lý phản ứng:** Nguyên lý cơ bản của phương pháp ELISA kẹp giữa giống với ELISA kháng globulin: kháng thể HIV gắn với kháng nguyên cố định và sự có mặt của kháng thể được phát hiện. Thử nghiệm này khác về cách phát hiện kháng thể HIV. Kháng nguyên HIV (thường là các peptid tổng hợp) được gắn trên bề mặt giếng. Thêm huyết thanh xét nghiệm vào giếng và ủ. Cuối giai đoạn ủ, rửa loại bỏ huyết thanh, thêm cộng hợp rồi ủ tiếp tục. Cộng hợp là kháng nguyên tổng hợp gắn enzym, chứ không phải là kháng thể kháng IgG người gắn enzym (như trong ELISA kháng globulin). Trong thời gian ủ, kháng nguyên cộng hợp gắn với phức hợp kháng thể kháng HIV đã gắn với kháng nguyên cố định trong giếng. Một phức hợp "kẹp": kháng nguyên - kháng thể - kháng nguyên được tạo thành. Rửa bỏ cộng hợp thừa và thêm chất hiện màu vào giống như trong thử nghiệm kháng globulin. Tiến bộ của loại thử nghiệm này là tính đặc hiệu của nó và tỷ lệ dương tính giả giảm đi.

• Các bước tiến hành:

Bước 1: Kiểm tra máy rửa, ủ và máy đọc, đưa sinh phẩm và thuốc thử về nhiệt độ phòng thí nghiệm (22°C), chuẩn bị dung dịch rửa.

Bước 2: Lập sơ đồ xét nghiệm (Vị trí các giếng nhỏ chứa, nhỏ mẫu xét nghiệm)

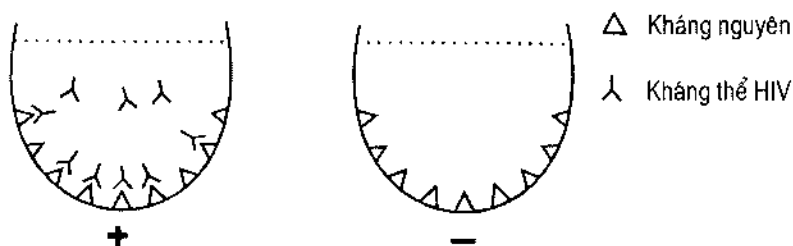
Bước 3: Lấy các giếng nhựa đã được gắn bản kháng nguyên HIV ra khỏi túi giấy bạc và gắn vào phiến nhựa (Hình 6.9).



Hình 6.9: Kháng nguyên được gắn trên phiến nhựa

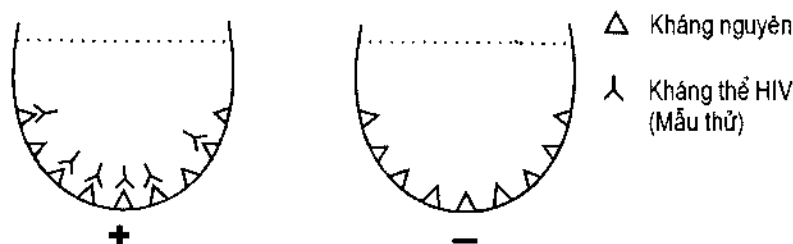
Bước 4: Nhỏ dung dịch hoà loãng mẫu vào tất cả các giếng

Bước 5: Nhỏ chủng và huyết thanh cần xét nghiệm vào các giếng theo đúng sơ đồ đã lập và ủ trong thời gian nhất định ở nhiệt độ xác định (Theo quy định của từng hãng sản xuất). Trong thời gian này, các kháng thể đặc hiệu có trong huyết thanh cần xét nghiệm sẽ gắn với kháng nguyên đặc hiệu đã được gắn trên bề mặt giếng nhựa (Hình 6.10).



Hình 6.10: Kháng thể đặc hiệu được gắn với kháng nguyên (+), không có KT đặc hiệu (-)

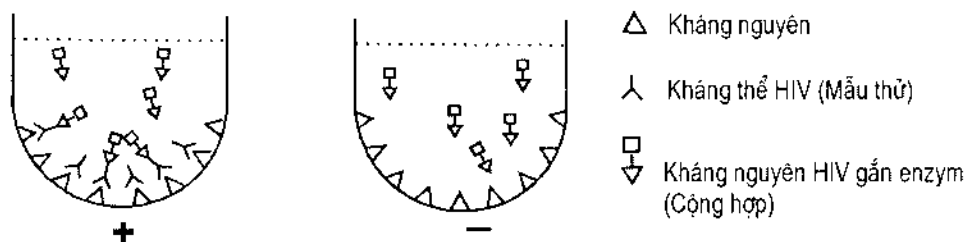
Bước 6: Vào cuối giai đoạn ủ, rửa giếng để loại bỏ huyết thanh và chuẩn bị cho bước tiếp theo (Hình 6.11). Có thể tiến hành rửa trên máy rửa tự động hoặc bán tự động, lần rửa cuối cùng cần làm khô đáy giếng.



Hình 6.11: Loại bỏ huyết thanh và kháng thể thừa

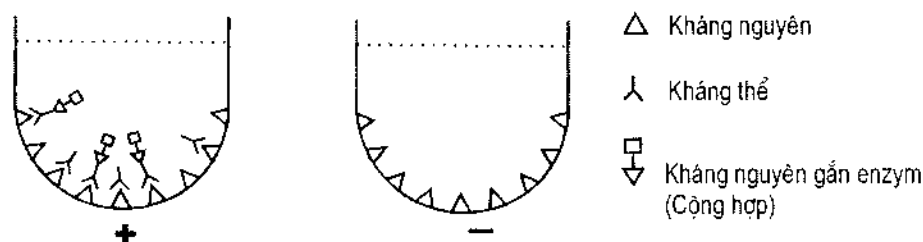
Bước 7: Thêm dung dịch cộng hợp vào tất cả các giếng rồi ủ ở nhiệt độ nhất định trong thời gian xác định (Theo quy định của từng hãng sản xuất). Trong giai

đoạn này cộng hợp có bản chất là một kháng nguyên gắn enzyme, cộng hợp sẽ là cầu nối giữa phức hợp kháng nguyên - kháng thể đặc hiệu và chất hiện màu. Cộng hợp chỉ gắn với kháng thể đã được gắn với kháng nguyên gắn bản (Hình 6.12).



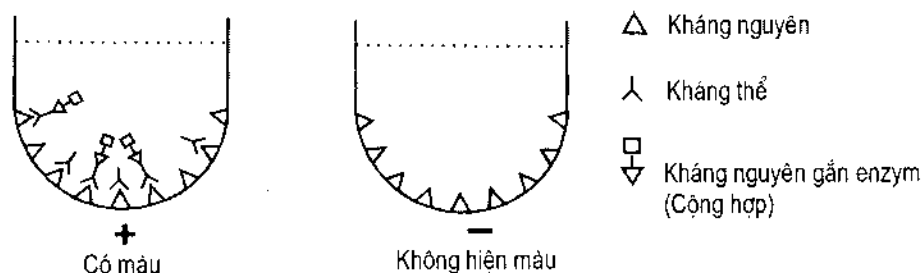
Hình 6.12: Cộng hợp được gắn với phức hợp kháng nguyên - kháng thể

Bước 8: Cuối giai đoạn ủ, rửa giếng loại bỏ thành phần thừa, cộng hợp không gắn và chuẩn bị bước tiếp theo. Quá trình rửa cũng giống như mô tả ở bước 6 (xem hình 6.13).



Hình 6.13: Loại bỏ cộng hợp thừa

Bước 9: Thêm ngay dung dịch cơ chất vào tất cả các giếng và ủ ở nhiệt độ xác định, thường là từ 18 - 25°C, trong thời gian nhất định (Theo quy định của từng hãng sản xuất). Dung dịch cơ chất chứa một chất hoá học là chất hiệu màu. Khi thêm dung dịch cơ chất vào giếng có chứa các thành phần gắn cộng hợp, enzyme sẽ hoạt hoá cơ chất và do vậy hình thành chất màu trong giếng. Các giếng không chứa thành phần gắn cộng hợp sẽ không thay đổi màu khi thêm cơ chất vào giếng (Hình 6.13). Các giếng có phản ứng (giếng ban đầu chứa huyết thanh HIV dương tính), thì có màu trong khi giếng không phản ứng (giếng ban đầu chứa huyết thanh âm tính) thì không màu. Các giếng nhỏ chứng âm, chứng dương thì có màu khác nhau (Hình 6.14).



Hình 6.14: Enzym hoạt hoá cơ chất

Bước 10: Cuối giai đoạn ủ, thêm dung dịch acid hoà loãng vào tất cả các giếng để dừng phản ứng. Acid có tác dụng bất hoạt men và cố định màu.

Bước 11 : Đọc mật độ quang (giá trị OD) của dung dịch trong giếng và đánh giá kết quả thử nghiệm. Trong các giếng chứa mẫu có kháng thể, cộng hợp được gắn với kháng thể và men hoạt hoá cơ chất để tạo thành sản phẩm màu.

b. Kỹ thuật phát hiện kháng nguyên (HBsAg) (bánh kẹp)

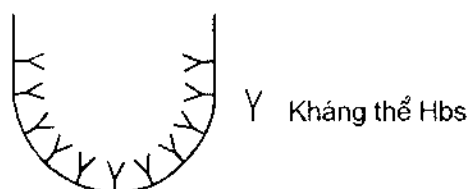
- *Nguyên lý của phản ứng* : Nguyên lý cơ bản của thử nghiệm ELISA phát hiện kháng nguyên tương tự như thử nghiệm ELISA phát hiện kháng thể nhưng ở đây, vai trò của kháng nguyên và kháng thể ngược nhau, kháng nguyên đặc hiệu gắn với kháng thể cố định và phát hiện sự có mặt của kháng nguyên.

- *Các bước tiến hành:*

Bước 1: Kiểm tra máy rửa, ủ và máy đọc, đưa sinh phẩm và thuốc thử về nhiệt độ phòng thí nghiệm (22°C), chuẩn bị dung dịch rửa.

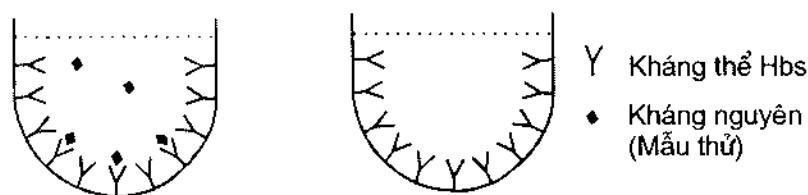
Bước 2: Lập sơ đồ xét nghiệm (Vị trí các giếng nhỏ chứng, nhỏ mẫu xét nghiệm)

Bước 3: Lấy các giếng nhựa đã được gắn bản kháng thể HBs ra khỏi túi giấy bạc và gắn vào phiên nhựa (Hình 6.15)



Hình 6.15: Kháng thể HBs được gắn trên phiên nhựa

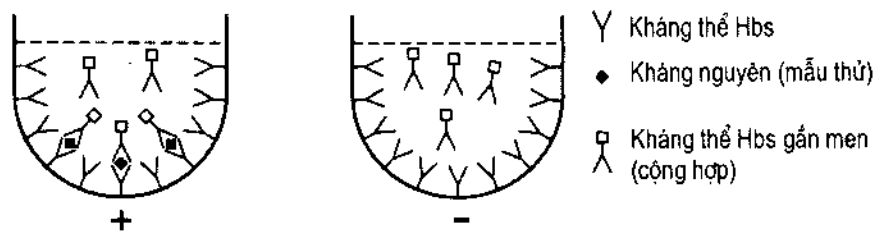
Bước 4: Mẫu nghiệm để nguyên hoặc hòa loãng được cho vào các giếng theo đúng sơ đồ đã lập và được ủ đúng nhiệt độ và đúng thời gian (Theo quy định của từng hãng sản xuất). Trong thời gian này, kháng nguyên đặc hiệu (nếu có) sẽ gắn với kháng thể (Hình 6.16).



Hình 6.16: Kháng nguyên sẽ được gắn với kháng thể HBs

Bước 5: Sau khi ủ, các giếng được rửa để loại bỏ kháng nguyên thừa.

Bước 6: Dung dịch cộng hợp được thêm vào mỗi giếng. Sau đó các giếng được ủ đúng nhiệt độ và đủ thời gian (Theo quy định của từng hãng sản xuất). Trong thời gian này, cộng hợp kết hợp với kháng nguyên đặc hiệu đã gắn trên giếng. (Hình 6.17).



Hình 6.17: Cộng hợp kết hợp với phức hợp kháng nguyên-kháng thể

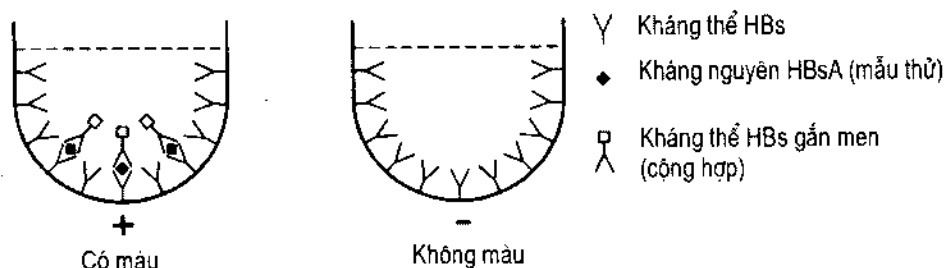
Bước 7: Cuối giai đoạn ủ, các giếng được đem rửa để loại bỏ cộng hợp không gắn.

Bước 8: Dung dịch có chất nền được thêm vào mỗi giếng và lại được ủ ở nhiệt độ xác định. Khoảng 18 - 25°C và đúng thời gian.

Bước 9: Cuối giai đoạn ủ, dung dịch acid được thêm vào để làm ngừng phản ứng.

Bước 10: Đọc mật độ quang (OD) của dung dịch trong giếng và đánh giá kết quả thử nghiệm.

Bước 11: Trong các giếng có kháng nguyên đặc hiệu thì cộng hợp được gắn với kháng nguyên và men hoạt hoá có chất để tạo màu (Hình 6.18).



Hình 6.18: Enzym hoạt hoá cơ chất

1.1.4. Đánh giá kết quả thử nghiệm ELISA

- Giá trị OD và giá trị ngưỡng

Mật độ quang (giá trị OD) của mỗi giếng được xác định khi chùm ánh sáng ở bước sóng nào đó chiếu qua đáy giếng và đo mức độ hấp thụ ánh sáng của dung dịch. Để làm việc này người ta dùng phương tiện đặc biệt gọi là máy đọc phiến, thực chất là một quang phổ kế phức hợp nhiều bước sóng. Máy đọc phiến đọc các giá trị OD theo từng hàng 8 giếng và đọc đồng thời 8 giếng một lúc. Kết quả này in ra trực tiếp hoặc nổi sang một máy vi tính để xử lý số liệu.

Kết quả cuối cùng của thử nghiệm ELISA là tập hợp các giá trị OD hoặc đánh giá luôn là âm tính và dương tính. Bảng 6.1 cho thấy kết quả thu được từ thử nghiệm tìm kháng thể HIV ở các mẫu huyết thanh người cho máu.

Để sử dụng được các giá trị OD, người ta phải so sánh chúng với kết quả chuẩn đã biết. Kết quả này gồm tập hợp các chứng và mẫu xét nghiệm. Có nhiều

cách tính kết quả khác nhau, tối thiểu cần xác định 3 điểm cho mỗi thử nghiệm ELISA. Trong đó 2 điểm là giá trị trung bình của chứng âm và chứng dương - để xác định xét nghiệm là có ý nghĩa và chúng phải nằm trong khoảng quy định của nhà sản xuất. Cuối cùng, để đánh giá kết quả phản ứng hay không phản ứng, phải tính toán giá trị ngưỡng.

Trong kiểu ELISA1 (kháng globulin và bánh kẹp giá trị OD cao sẽ có màu, và cho kết quả “phản ứng”, còn giá trị OD thấp hay không màu là kết quả “không phản ứng”. Vì vậy, các giá trị trên ngưỡng là phản ứng và giá trị dưới ngưỡng là không phản ứng.

Trong kiểu ELISA2 (cạnh tranh) giá trị OD cao hay có màu là kết quả “không phản ứng”, giá trị OD thấp hay không màu là kết quả “phản ứng”. Vì vậy các giá trị dưới ngưỡng là các kết quả “có phản ứng” còn các giá trị trên ngưỡng là các kết quả “không phản ứng”.

Chọn giá trị ngưỡng đúng rất quan trọng đối với thử nghiệm ELISA. Tính toán giá trị ngưỡng thường căn cứ giá trị OD chứng âm. Giá trị trung bình được tính từ mỗi chứng âm - trung bình chứng âm (Ncm) và đơn giản hoá bằng cách tính giá trị ngưỡng thực tế cho phiên phản ứng theo công thức sau:

$$\text{Giá trị ngưỡng} = \text{Ncm} + 0,2$$

Trong thí dụ dưới đây (Bảng 6.1), giá trị trung bình của chứng âm là 0,16. Giá trị ngưỡng vì vậy sẽ là 0,36 (0,16 + 0,2). Các giá trị OD nào trên 0,36 thì được coi là có phản ứng và các giá trị OD nào dưới 0,36 được coi là không phản ứng.

Bảng 6.1: Ví dụ kết quả thu được từ kiểu ELISA kháng globulin/ kẹp.

1	0,141
2	0,158
3	0,903
4	0,161
5	0,148
Chứng âm	0,156
Chứng âm	0,167
Chứng âm	0,157
Chứng dương	1,352
Chứng dương	1,283

A. Giá trị OD của mẫu và chứng.

B. Kết quả tương ứng dương tính và âm tính (bây giờ chưa cần ghi).

C. Tỷ số dấu hiệu/ngưỡng (bây giờ chưa cần ghi).

Mặt khác, giá trị ngưỡng có thể bao gồm cách tính từ giá trị OD của chứng dương và chứng âm hoặc thậm chí giá trị ngưỡng cố định của nhà sản xuất. Tuy nhiên, công thức để xác định giá trị ngưỡng được áp dụng tương tự như nhau.

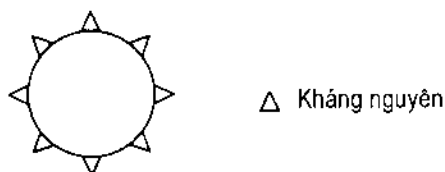
1.2. Thử nghiệm ngưng kết hạt

1.2.1. Nguyên lý của phản ứng

Thử nghiệm ngưng kết hạt phát hiện sự có mặt của kháng thể HIV nhờ sự ngưng kết các hạt gelatin hoặc latex đã gắn kháng nguyên HIV. Thử nghiệm này có thể được sử dụng để phát hiện HBsAg. Thử nghiệm thực hiện trong các giếng, nhưng giống như thử nghiệm gắn trên bi, các giếng chỉ đơn giản là nơi thực hiện phản ứng chứ không gắn gì cả.

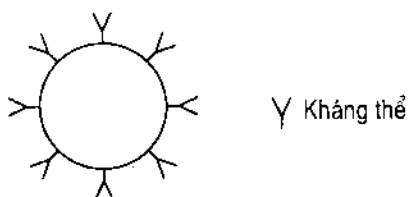
Một ưu điểm chung của loại thử nghiệm này là không cần các dụng cụ đắt tiền. Thử nghiệm này chỉ qua ít giai đoạn, không cần rửa giếng phản ứng và có thể đọc bằng mắt. Hạt ngưng kết kháng nguyên và kháng thể được sản xuất cùng một kiểu.

a. *Phát hiện kháng thể*: Nguyên tắc của xét nghiệm là cố định kháng nguyên HIV trên hạt vi lượng, tương tự như trên giếng hay bi được mô tả trước đây đối với thử nghiệm ELISA. Nguồn và loại kháng nguyên cũng giống như đối với ELISA mặc dù không dùng các peptid tổng hợp (Hình 6.19).



Hình 6.19: Kháng nguyên được gắn trên hạt vi lượng

b. *Phát hiện kháng nguyên HBsAg*: Cơ sở của xét nghiệm ngược với xét nghiệm phát hiện kháng thể: Kháng thể đặc hiệu được cố định trên bề mặt hạt. Nguồn và loại kháng thể cần thiết giống như trong thử nghiệm ELISA (Hình 6.20).



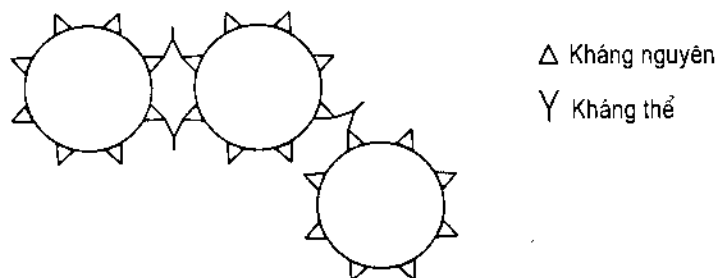
Hình 6.20: Kháng thể được gắn trên hạt vi lượng

1.2.2. Các bước tiến hành (Hình 6.22)

Bước 1: Mẫu xét nghiệm và chứng được hoà loãng bằng dung dịch hoà loãng mẫu (Tất cả các thử nghiệm ngưng kết hạt đều yêu cầu phải hoà loãng mẫu trước để hạn chế đến mức thấp nhất phản ứng dương tính giả). Trong một số thử nghiệm dung dịch hoà loãng rất phức tạp và luôn luôn được cung cấp trong hộp sinh phẩm.

Bước 2: Thực hiện quá trình hoà loãng trong các giếng. Chuyển ra khỏi phản ứng thể tích mẫu hoà loãng ở giếng cuối cùng.

Bước 3: Thêm các hạt vào mẫu đã hoà loãng và ủ, thường là ở nhiệt độ phòng (18 - 25°C) trong thời gian khoảng 1 - 2 giờ 30 phút. Trong thời gian ủ, các hạt ngưng kết lại tương tự như phản ứng giữa hồng cầu và kháng huyết thanh định nhóm máu do có kháng thể HIV trong mẫu (Hình 6.21).



Hình 6.21: Kháng thể kết hợp với kháng nguyên tạo phản ứng ngưng kết

Trong một số thử nghiệm, mẫu được kiểm tra kẹp bằng các hạt có gắn và không gắn kháng nguyên. Những hạt không gắn kháng nguyên dùng để xác định phản ứng không đặc hiệu.

Bước 4: Cuối giai đoạn ủ, đọc kết quả xét nghiệm. Thử nghiệm ngưng kết nói chung được đọc bằng mắt thường và kết quả ghi lại là dương tính hay âm tính. Đọc bằng mắt thích hợp cho những thử nghiệm này vì ngưng kết của các hạt có thể nhìn thấy rõ ràng bằng mắt được. Nếu dùng hồng cầu gắn kháng nguyên thì sự ngưng kết hoàn toàn có thể thấy được trong giếng.

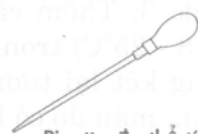
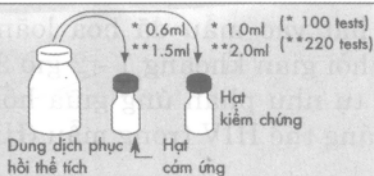
Nếu dùng các hạt gelatin gắn thì cũng thấy được nhờ màu xanh nhạt. Còn nếu dùng hạt latex thì cũng thấy rõ được các hạt màu trắng khi đặt trên nền đen.

Kết quả của phản ứng ngưng kết được trình bày trong hình 6.22. Kết quả “có phản ứng” sẽ xuất hiện một mặt phẳng mờ, trải đều các hạt ngưng kết hoặc tạo thành bờ nhám nhỏ ở đáy giếng. Kết quả “không phản ứng” sẽ xuất hiện hình nút hoặc hình vòng nhẫn của các hạt không ngưng kết lắng xuống đáy giếng (Hình 6.22).

Tiến hành thử nghiệm

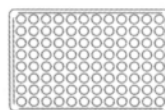
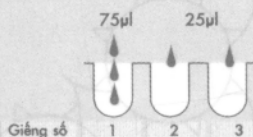
Chuẩn bị thuốc thử :

Đề thuốc ở nhiệt độ phòng thí nghiệm tối thiểu 30' trước khi làm



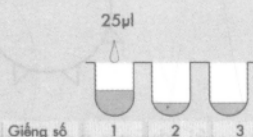
Pipette đo thể tích

1 Nhỏ giọt dung dịch pha loãng huyết thanh

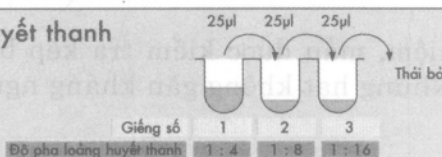


Microplate đáy hình chữ u

2 Nhỏ giọt huyết thanh thử nghiệm

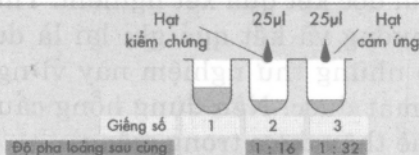


3 Độ pha loãng huyết thanh



Micropipette

4 Nhỏ giọt các loại



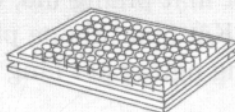
Ống nhỏ giọt

5 Trộn đều các thành phần trong mỗi giếng với máy lắc hoặc lắc nhiều lần bằng tay



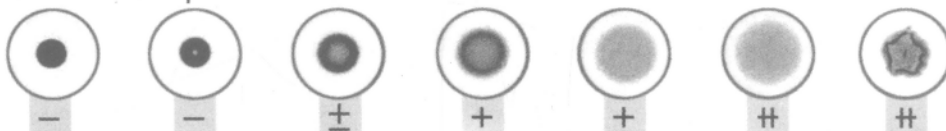
Máy lắc (tùy chọn)

6 Ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ giữ plate khỏi bị rung trong quá trình ủ



* Được cung cấp theo bộ KIT
** Dụng cụ nếu có được thì tốt, không bắt buộc

7 Giải thích kết quả



Hình 6.22: Các bước tiến hành và nhận định kết quả trong phản ứng ngưng kết hạt

1.3. Các thử nghiệm nhanh

Loại thứ 3 của thử nghiệm được quan tâm là thử nghiệm nhanh, các thử nghiệm này chỉ dùng một lần và cho kết quả nhanh với độ nhạy cao. Thử nghiệm này được sử dụng để phát hiện cả kháng thể (kháng thể HIV, HCV) và kháng nguyên (như HBsAg). Thử nghiệm đơn giản có một số kiểu khác nhau. Cơ sở là kháng nguyên hay kháng thể (tùy thuộc vào thử nghiệm), được bất hoạt trên màng thấm hoặc màng bán thấm, hoặc trên một dải băng. Loại này cung cấp các dạng đơn giản để dễ dàng cho mẫu thử hoặc các chất thử khác thêm vào. Phần lớn các thử nghiệm đơn giản được chứa trong một bộ kit gồm tất cả các chất thử cần thiết để tiến hành kỹ thuật, các thử nghiệm nhanh này có thể dùng huyết thanh hoặc huyết tương và trong một số trường hợp có thể dùng cả máu toàn phần. Các thử nghiệm này có thể chia thành 3 nhóm theo nguyên tắc sau đây. Nhìn chung các nguyên tắc này bao gồm sự trình bày của kỹ thuật.

- Miễn dịch sắc ký
- Lọc miễn dịch
- ELISA thông thường

Sau đây là các ví dụ về nguyên tắc chung, phương pháp và ứng dụng của ba nhóm khác nhau. Sự khác nhau của ba nhóm được phản ánh trong thiết kế và xây dựng bởi các nhà sản xuất hơn là sự khác nhau về nguyên tắc được chấp nhận.

1.3.1. Thử nghiệm miễn dịch sắc ký (Để phát hiện kháng thể HIV, HCV, HBsAg)

a. Nguyên lý của phản ứng: Thử nghiệm miễn dịch sắc ký dựa trên nguyên tắc dòng mẫu thử đi theo một chiều thấm đặc biệt có chứa các chất thử hoà tan, với sự lắng đọng các chất và quan sát được các phức hợp miễn dịch ở các vị trí dọc theo thanh thử. Loại thử nghiệm này phần lớn đang có bán sẵn hiện nay.

b. Các bước tiến hành

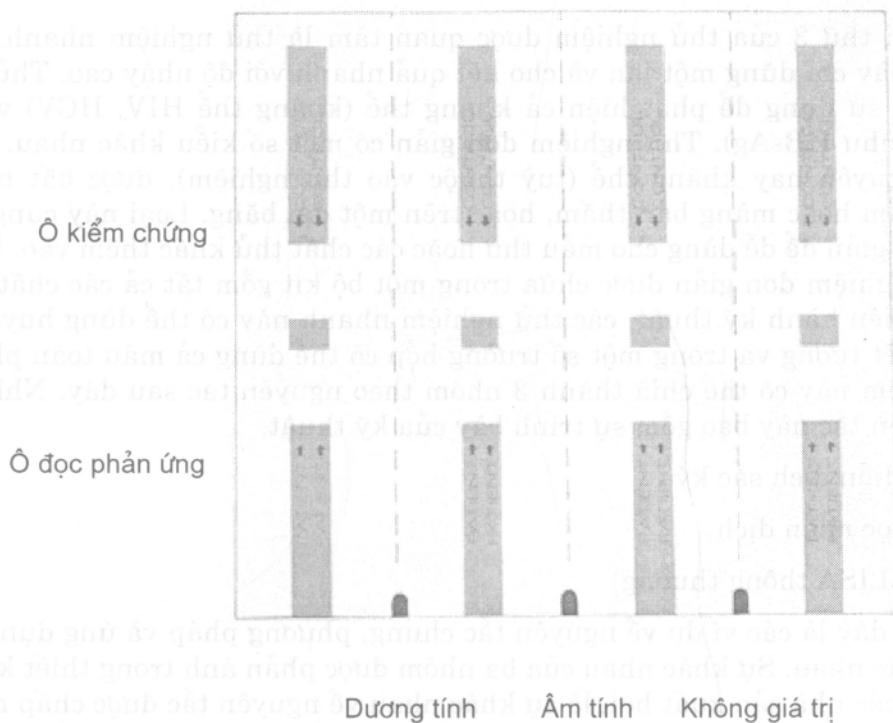
Bước 1: Mẫu thử được thêm vào và hấp thụ qua một tấm đệm ở đầu thanh thử. Mẫu di chuyển dọc theo thanh thử.

Bước 2: Thanh thử có chứa cộng hợp khô, cộng hợp kháng nguyên virus kết hợp với muối vàng, hoặc lưu huỳnh hoà tan trong mẫu dọc theo thanh thử. Muối vàng hoặc lưu huỳnh (yếu tố khác cũng có thể được sử dụng) là sự chuẩn bị của vàng hoặc lưu huỳnh bao gồm các hạt xác định dạng trong dung dịch có thể bị hoá chất kết hợp thành phân tử lớn hơn như là kháng nguyên và kháng thể. Trong khi các hạt riêng có thể quá nhỏ để nhận biết bằng mắt thường, các ngưng tập và ngưng kết của các hạt có thể xem dễ hơn.

Bước 3: Kháng thể đặc hiệu trong mẫu kết hợp với cộng hợp và tiếp tục đi dọc theo thanh thử như là phức hợp miễn dịch.

Bước 4: Kháng nguyên virus được cố định ở một vạch xa hơn các thanh thử. Mẫu thử chảy qua vạch này, kháng thể đặc hiệu có mặt kết hợp với kháng nguyên cố định. Như phần lớn các kháng thể đặc hiệu sẵn sàng kết hợp với nó, một vạch xuất hiện ngang thanh thử như là muối vàng hoặc lưu huỳnh được tạo ra ở vị trí đó.

Bước 5: Nhận định kết quả (Hình 6.23).



Hình 6.23: Nhận định kết quả của thử nghiệm sắc ký miễn dịch

1.3.2. Các thử nghiệm lọc miễn dịch

a. Nguyên lý kỹ thuật: Thử nghiệm lọc miễn dịch dựa trên nguyên lý mẫu thử và hoá chất được lọc qua màng lọc trên đó có cố định kháng nguyên và kháng thể trong một đĩa phản ứng. Khi có kháng nguyên hoặc kháng thể đặc hiệu trong mẫu sẽ gắn với màng qua việc tạo phức hợp miễn dịch. Khi thêm cộng hợp, sẽ kết hợp với phức hợp miễn dịch, màu sẽ xuất hiện ở đĩa phản ứng.

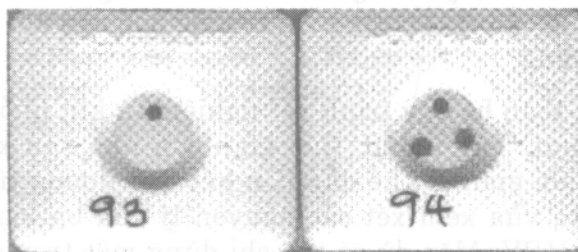
b. Các bước tiến hành

Bước 1: Nhỏ mẫu vào đĩa phản ứng và kháng thể có trong mẫu thử sẽ gắn với kháng nguyên được cố định sẵn khi thấm qua màng.

Bước 2: Sau khi ủ mẫu, màng phản ứng được rửa bằng dung dịch rửa được cung cấp sẵn, khi qua màng sẽ lấy đi các kháng thể thừa trong mẫu. Một vài loại sinh phẩm không cần bước này.

Bước 3: Cộng hợp được thêm vào sau đó, chất này được cung cấp ở dạng khô. Chất tổng hợp của cộng hợp khác nhau tùy theo kỹ thuật. Nhưng dùng protein A gắn với muối vàng là cách phổ biến. Protein A là một protein được sản xuất bởi vi khuẩn *Staphylococcus aureus*. Protein A có phần gắn với Fc (gắn với bổ thể) của phân tử IgG. Khi cộng hợp được thêm vào, protein A sẽ kết hợp với kháng thể đặc hiệu có mặt trong mẫu thử. Sự kết hợp này sẽ xuất hiện màu nơi màng phản ứng khi có kháng thể đặc hiệu gắn (Hình 6.24).

Bước 4: Đọc kết quả



Kết quả âm tính

Kết quả dương tính

Hình 6.24: Thử nghiệm lọc miễn dịch phát hiện kháng thể HCV

1.3.3. Thử nghiệm nhanh loại ELISA thông thường

a. Nguyên lý: Thử nghiệm nhanh đơn giản này dựa trên nguyên lý của phương pháp ELISA thông thường bao gồm một khay phản ứng trên đó có mẫu thử và các hoá chất khác. Thông thường, chất lỏng ngấm chậm qua màng rồi chuyển sang bộ phận thải qua vật liệu thấm hoặc được lấy ra khỏi đĩa phản ứng sau mỗi bước của kỹ thuật. Sự kết hợp kháng thể hoặc kháng nguyên trong mẫu thử với kháng nguyên hoặc kháng thể cố định xuất hiện, sau đó là sự kết hợp với cộng hợp, có chất được thêm vào và màu sắc sẽ xuất hiện nếu có các marker đặc hiệu trong mẫu.

b. Các bước tiến hành:

Bước 1: Mẫu thử được nhỏ vào giếng phản ứng kháng thể sẽ kết hợp với kháng nguyên cố định sẵn. Dung dịch hoà loãng mẫu có thể được cung cấp trong một lọ riêng để hoà loãng mẫu thử trước khi nhỏ vào giếng phản ứng.

Bước 2: Sau khi ủ, mẫu thử thừa được loại bỏ bằng cách rửa giếng phản ứng. Một vài loại kit không cần bước này.

Bước 3: Cộng hợp sẽ được thêm vào, các kỹ thuật khác nhau thì cộng hợp khác nhau. Một vài kỹ thuật sử dụng cộng hợp kháng globulin người (IgG) giống như trong kỹ thuật ELISA.

Bước 4: Sau khi thêm cộng hợp, rửa lại đĩa phản ứng và thêm chromogen, rồi đọc kết quả bằng mắt thường. Có chất hoạt hoá rồi lắng đọng trên màng tạo mẫu thích hợp.

1.3.4. Một số điểm về sử dụng thử nghiệm nhanh đơn giản

– Khi xuất hiện vạch hay điểm đặc hiệu (kết quả dương tính). Phần lớn các thử nghiệm nhanh hiện nay đều có phần tự kiểm soát đi kèm, dùng để phát hiện protein hay albumin trong mẫu. Điều này chứng tỏ rằng kit hoạt động tốt.

– Kết quả là âm tính khi có vạch hoặc điểm ở ô kiểm chứng mà không có vạch hay điểm ở ô thử nghiệm. Kết quả dương tính khi có mặt cả hai vạch hoặc điểm ở ô thử nghiệm và ô kiểm chứng. Nếu vạch ở ô kiểm chứng không có coi như xét nghiệm không có giá trị (Hình 6.23).

- Mặc dù không cần chứng kiểm tra bên ngoài, nhưng cần chuẩn bị chứng dương yếu cho mỗi mẻ thử, lý tưởng hơn cần có chứng âm cho kỹ thuật. Sử dụng mẫu đã biết kết quả là cần thiết trong vài trường hợp cần đối chiếu kết quả. Ví dụ như màu không rõ ràng.

- Nhìn chung, toàn bộ quy trình xét nghiệm từ khi nhỏ mẫu thử đến khi có kết quả là 10 -15 phút. Tuy nhiên, thời gian của nhà sản xuất phải được chấp hành, tránh ứ quá thời gian có thể dẫn đến kết quả dương tính giả trong một số trường hợp. Chúng ta vừa xem xét các nguyên lý của ba loại thử nghiệm chính sàng lọc HIV, HCV, HBV. Mặc dù có thể chỉ dùng một trong số các thử nghiệm, nhưng điều quan trọng là hiểu nguyên lý của tất cả ba loại đó và cần tự đánh giá loại nào cho phù hợp.

2. Sàng lọc giang mai

2.1. Tác nhân nhiễm trùng: Tác nhân gây bệnh giang mai là xoắn khuẩn *Treponema pallidum* là thành viên của nhóm xoắn khuẩn đã biết là *Spirochaete*. Có bốn nhóm chính có liên quan chặt chẽ được mô tả là dưới nhóm của *T. Pallidum*.

- *Treponema.Pallidum* - *pallidum*
- *Treponema.Pallidum* - *pertenene*
- *Treponema.Pallidum* - *carateum*
- *Treponema.Pallidum* - *endemicum*

Ở đây chúng ta chỉ cần quan tâm đến nhóm gây bệnh do *Treponema. Pallidum* - *pallidum* (gọi tắt là *T. Pallidum*) được coi là tác nhân gây bệnh quan trọng nhất.

2.2. Ý nghĩa trong thực hành truyền máu

Giang mai là tác nhân lây nhiễm đầu tiên được phát hiện là lây nhiễm qua đường truyền máu (1910), trước đây có rất nhiều trường hợp bị lây nhiễm giang mai qua đường này. Hiện nay, những trường hợp như vậy thỉnh thoảng vẫn xuất hiện ở các nước có tỷ lệ nhiễm giang mai cao. Tuy nhiên, chưa bao giờ truyền máu là nguyên nhân chính của việc lan rộng bệnh giang mai. Ở các nước có ít trường hợp bị mắc giang mai, phần lớn các ca bị nhiễm được xác định trong số người cho máu là do bị lây nhiễm từ trước và đã được điều trị thành công và không có dấu hiệu nguy cơ lây nhiễm qua đường truyền máu. Tuy nhiên với việc loại trừ người cho máu có nguy cơ, sàng lọc giang mai và bảo quản máu ở 4°C trước khi truyền thì nguy cơ nhiễm giang mai sau truyền máu là rất thấp ở nhiều nước.

2.3. Ngăn ngừa lây lan

Việc ngăn ngừa lây nhiễm giang mai chủ yếu bằng giáo dục và việc xây dựng phát triển các chương trình điều trị và sàng lọc hiệu quả. Bệnh lây nhiễm qua đường tình dục là nguyên nhân chính lây bệnh. Việc sàng lọc tất cả máu, chế phẩm máu, mô và các cơ quan là rất quan trọng, truyền máu chỉ là một con đường rất nhỏ lây nhiễm giang mai.

2.4. Sàng lọc giang mai

2.4.1. Phương pháp soi trực tiếp

Có thể dùng kính hiển vi nền đen để quan sát trực tiếp xoắn khuẩn từ dịch lấy ở vết xước, điều này chỉ có thể tiến hành ở giai đoạn nhiễm trùng chắc chắn. Do vậy, huyết thanh học là phương pháp chẩn đoán chính.

2.4.2. Phương pháp huyết thanh học

Có hai loại: Xét nghiệm không đặc hiệu và xét nghiệm đặc hiệu.

- **Xét nghiệm không đặc hiệu (VDRL hoặc RPR):** Sử dụng cardiolipin để phát hiện kháng thể chống *Treponema pallidum*. Cardiolipin là một thành phần bình thường của mô, do vậy có khoảng 1% người trưởng thành bình thường sản xuất kháng thể không đặc hiệu chống lại kháng nguyên này nên có thể cho kết quả phản ứng VDRL (+) giả. Kỹ thuật này hiện nay đang được sử dụng rộng rãi ở nước ta để sàng lọc giang mai cho người cho máu vì đây là một thử nghiệm cho kết quả nhanh, có thể dùng cả huyết thanh hoặc huyết tương, kỹ thuật đơn giản, kết quả được nhận định dễ dàng bằng mắt thường.

- Nguyên lý kỹ thuật: Hạt latex có gắn kháng nguyên Cardiolipin sẽ bị ngưng kết nếu trong huyết thanh, huyết tương của người cho máu hoặc bệnh nhân có kháng thể giang mai.

- Dụng cụ và thuốc thử:

- + Pipette nhỏ giọt
- + Tấm Kline
- + Máy lắc Kline
- + Kính hiển vi
- + Kháng nguyên Cardiolipin được pha sẵn trong các chai nhỏ giọt
- + Chứng âm
- + Chứng dương

Mẫu huyết thanh và huyết tương không được lẫn tế bào, không nhiễm khuẩn, không tan máu, không vẩn đục.

- Các bước tiến hành:

Bước 1: Đưa bộ thuốc thử về nhiệt độ phòng thí nghiệm 10 phút và lắc đều trước khi sử dụng.

Bước 2: Nhỏ lên một tấm Kline 30μl mẫu thử, chứng âm và chứng dương

Bước 3: Nhỏ tiếp một giọt VDRL - latex

Bước 4: Trộn đều huyết thanh cần thử, chứng dương với hạt kháng nguyên VDRL-Latex bằng một que nhựa.

Bước 5: Lắc 6 phút trên máy lắc Kline

Bước 6 : Đọc và nhận định kết quả bằng mắt thường và trên kính hiển vi

- + Các hạt latex phân bố đồng nhất (Không ngưng kết) : Phản ứng âm tính
- + Các hạt latex ngưng kết : Phản ứng dương tính

• **Xét nghiệm đặc hiệu (TPHA):** Dùng xoắn khuẩn *Treponema pallidum* làm kháng nguyên để phát hiện kháng thể đặc hiệu kháng lại xoắn khuẩn giang mai trong huyết thanh hoặc huyết tương.

Kỹ thuật ELISA cũng được áp dụng để phát hiện kháng thể đặc hiệu nhưng chi phí so với thử nghiệm ngưng kết hạt thì đắt hơn, do vậy phần lớn các nước đang phát triển vẫn dùng thử nghiệm ngưng kết hạt để sàng lọc giang mai cho người cho máu.

3. Sàng lọc sốt rét

Sốt rét gây ra do nhiễm trùng một trong các loại động vật nguyên sinh gọi là ký sinh trùng. Hàng năm có khoảng 150 triệu người bị nhiễm sốt rét và khoảng 2 triệu người chết vì sốt rét. Nhiễm trùng truyền qua vết cắn của muỗi *Anopheles* cái. Có trên 200 loài *Anopheles* và khoảng 60 loài là yếu tố gây bệnh sốt rét. Bản thân con người là các ổ nhiễm trùng, một con muỗi cắn một người bị sốt rét có thể truyền sốt rét sang cho người không bị nhiễm khi đốt họ.

3.1. Tác nhân nhiễm trùng

Ký sinh trùng là một loại động vật nguyên sinh truyền bệnh theo nhiều cách, nhưng chúng đến ký sinh trên một hoặc nhiều động vật khác. Đáng chú ý là chúng cần hai vật chủ khác nhau để hoàn thành chu kỳ sinh sản : người và muỗi.

Có bốn loài ký sinh trùng là nguyên nhân gây sốt rét

- *Plasmodium vivax*
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium malariae*
- *Plasmodium falciparum*

Nhiễm do *P.falciparum* thường gây ra tử vong ở người

3.2. Sàng lọc sốt rét

Cách chẩn đoán chắc chắn nhất là soi máu tìm ký sinh trùng sốt rét trong hồng cầu. Tuy vậy không thích hợp cho sàng lọc số lượng lớn người cho máu. Nhuộm lam máu và quan sát là phổ biến, phương pháp nhuộm kháng thể gắn huỳnh quang được dùng ở một vài phòng thí nghiệm.

Những năm gần đây, kỹ thuật phát hiện kháng thể chống một protein bề mặt đã được sản xuất, phần lớn là kỹ thuật ngưng kết hạt, mặc dầu đã có một vài kỹ thuật ELISA.

3.3. Ý nghĩa trong thực hành truyền máu

Nhiều tư liệu nói về truyền máu là nguyên nhân gây sốt rét, chủ yếu là *P.falciparum*. Mức độ lây truyền do truyền máu tùy thuộc hoặc nơi có tỷ lệ cao sốt

rét lưu hành ở số người cho máu. Ở các nước có sốt rét lan tràn, phần lớn có cá thể bị nhiễm ở tuổi trẻ. Việc truyền sốt rét do truyền máu không thật sự có ý nghĩa bởi vì phần lớn bệnh nhân đã bị nhiễm trước. Ở các nước tỷ lệ sốt rét thấp, sàng lọc trở nên quan trọng hơn.

Thật không may, thử nghiệm sàng lọc thích hợp không được phổ biến rộng rãi. Gần đây, cách sàng lọc hiệu quả nhất là hỏi họ có du lịch đến vùng có sốt rét và cách để phòng sốt rét của họ. Việc tri hoãn người cho máu đã đến vùng sốt rét là biện pháp hiệu quả nhất để ngăn truyền sốt rét do đường truyền máu. Người cho máu có thể cho mượn hơn tùy theo chính sách của từng địa phương hoặc quốc gia, tùy thuộc vào tiền sử bệnh và cách phòng của họ, tốt nhất là tạm hoãn không lấy máu ở đối tượng này trong 46 tháng. Trong vài trường hợp, có thể dùng điều trị phòng sốt rét sau truyền máu.

KỸ THUẬT ĐỊNH NHÓM MÁU ABO VÀ PHÁT MÁU AN TOÀN

1. Nguyên lý

Nhóm máu hệ ABO được xác định nhờ sự có mặt của kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu và kháng thể trong huyết thanh. Hai thành phần này khi gặp nhau sẽ xảy ra phản ứng ngưng kết đặc hiệu (bảng 6.2)

Tương tự như vậy, kháng thể chống A và chống B khi gặp hồng cầu mẫu A, B cũng sẽ xảy ra phản ứng ngưng kết hồng cầu đặc hiệu.

Bảng 6.2 : Sự có mặt của kháng nguyên và kháng thể nhóm máu ABO trong một cá thể

Nhóm máu	Kháng nguyên hồng cầu	Kháng thể trong huyết thanh
A	A	Chống B
B	B	Chống A
AB	AB	Không có kháng thể chống A và B
O	Không có kháng nguyên A và B	Có kháng thể chống A và B

2. Dụng cụ và hoá chất

2.1. Dụng cụ

- Máy ly tâm
- Kính hiển vi
- Pipette Pasteur
- Phiến đá 12x12cm
- Que thủy tinh

- Tủ lạnh để sinh phẩm
- Bình cách thuỷ 37°C
- Kéo
- Panh có mẫu, không mẫu
- Ống nghiệm tan máu
- Lam kính
- Quả bóp cao xa
- Cốc mô thuỷ tinh
- Bông thấm nước
- Tủ ấm 37°C
- Tủ sấy khô
- Giấy thấm
- Ba cốc thuỷ tinh 500ml
- Bút viết trên kính

2.2. Thuốc thử

- Huyết thanh mẫu : kháng thể chống A, chống B, chống AB (Được sản xuất theo phương pháp kháng thể đơn dòng).
- Hồng cầu mẫu A 10%, 5%
- Hồng cầu mẫu B 10%, 5%
- Nước muối 9‰
- Nước cất

2.3. Mẫu máu xét nghiệm

- Một ống nghiệm lấy 5ml máu tĩnh mạch không có chống đông, một ống khác lấy 2ml có chống đông bằng ACD theo tỷ lệ 1/5 thể tích máu. Ống máu này dùng lấy hồng cầu.
- Ly tâm tách huyết thanh ống máu không chống đông
- Rửa hồng cầu bệnh nhân bằng nước muối 9‰ 3 lần, pha thành dung dịch hồng cầu 5% trong nước muối 9‰.

3. Quy trình kỹ thuật : Có 3 kỹ thuật

- Định nhóm máu ABO trên phiến (đá, nhựa, thuỷ tinh)
- Định nhóm máu trong ống nghiệm
- Định nhóm máu trong gelcard

3.1. Định nhóm máu trên phiến: Tiến hành hai phương pháp: huyết thanh mẫu và hồng cầu mẫu.

- Ưu điểm: nhanh, đơn giản, dễ đọc kết quả.
- Nhược điểm: khó đánh giá khi gặp kháng thể yếu, hoặc kháng nguyên ẩn phản ứng ngưng kết không rõ ràng.

3.1.1. Phương pháp huyết thanh mẫu

- Trên phiến đá sạch mỡ, khô nhỏ 1 giọt huyết thanh mẫu (kháng thể chống A, chống B, chống AB) vào 3 vị trí khác nhau trên phiến : 1,2,3.
- Thêm 1 giọt dịch treo hồng cầu cần định nhóm 10% vào 3 vị trí 1,2,3
- Trộn đều huyết thanh mẫu với hồng cầu cần định nhóm bằng các que thuỷ tinh để có một vòng tròn có đường kính 20-30cm lắc nhẹ liên tục trong vòng 2 phút rồi đọc và ghi lại kết quả.

3.1.2. Phương pháp hồng cầu mẫu

- Trên phiến đá nhỏ một giọt hồng cầu mẫu A và một giọt hồng cầu mẫu B 10% vào vị trí 4,5.
- Thêm hai giọt huyết thanh cần định nhóm vào vị trí 4,5.
- Trộn đều huyết thanh cần thử với hồng cầu mẫu làm thành một vòng tròn có đường kính 20-30cm. Lắc nhẹ liên tục trong vòng 2 phút rồi đọc và ghi lại kết quả.

3.2. Phương pháp định nhóm trên ống nghiệm

Là một phương pháp tốt cho các trường hợp định nhóm trên phiến đá không rõ ràng và trong các trường hợp muốn xác định nhanh nhóm máu, đây là phương pháp xác định nhóm máu hệ ABO hiện nay hay được sử dụng nhất.

3.2.1. Phương pháp huyết thanh mẫu

- Nhỏ một giọt huyết thanh mẫu kháng thể A, kháng thể B, kháng thể AB vào 3 ống nghiệm đã được chuẩn bị ở trên .
- Thêm vào mỗi ống nghiệm một giọt hồng cầu cần định nhóm đã được hoà loãng (5% trong nước 9%).
- Trộn đều và ly tâm 1000 vòng/phút/1 phút
- Nghiêng nhẹ thành ống, đọc ngưng kết và hiện tượng tan máu bằng mắt thường và trên kính hiển vi
- Ghi lại kết quả.

3.2.2. Phương pháp hồng cầu mẫu

- Nhỏ một giọt hồng cầu mẫu A (5%), một giọt hồng cầu mẫu B (5%) vào hai ống nghiệm

- Thêm vào mỗi ống nghiệm một giọt huyết thanh bệnh nhân
- Trộn đều, ly tâm 1000 vòng/phút/1 phút.
- Nghiêng nhẹ thành ống, đọc hiện tượng tan máu và ngưng kết bằng mắt thường và trên kính hiển vi.
- Ghi lại kết quả (bảng 6.3).

3.2.3. *Nhận định kết quả định nhóm máu hệ ABO*: Kết quả được xác nhận theo bảng 6.3

Bảng 6.3: Kết quả định nhóm máu ABO

Chưa biết	Phương pháp HTM			Phương pháp HCM	
	Hồng cầu xét nghiệm			Huyết thanh cần xét nghiệm	
Đã biết	Chống A	Chống B	Chống AB	Hồng cầu A	Hồng cầu B
Nhóm A	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Nhóm B	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
Nhóm O	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Nhóm AB	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

Chú thích: (+): Ngưng kết

(-): Không ngưng kết

3.3. Phương pháp định nhóm ABO trong cột gelcard

Đây là một kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, cho kết quả ngưng kết rõ ràng, thời gian ủ ngắn, có quy trình tiến hành kỹ thuật chuẩn, dễ dàng lưu giữ kết quả và sử dụng, an toàn cho người làm xét nghiệm.

3.3.1. Nguyên lý kỹ thuật: Trong một cột gel có buồng phản ứng, có sẵn kháng huyết thanh chuẩn để định nhóm, có các viên bi thủy tinh làm màng ngăn đám ngưng kết. Nếu có phản ứng kháng nguyên - kháng thể đặc hiệu xảy ra sẽ tạo thành các đám ngưng kết và hồng cầu tự do không còn để lọt qua kẽ các viên bi thủy tinh đi xuống đáy cột gel (phản ứng dương tính), nếu không có phản ứng kháng nguyên - kháng thể đặc hiệu xảy ra, các hồng cầu sẽ lọt qua kẽ các viên bi thủy tinh để đi xuống đáy cột gel (phản ứng âm tính).

3.3.2. Dụng cụ và thuốc thử

- Dụng cụ
- + Máy ly tâm chuyên dụng
- + Máy ly tâm thường để tách huyết thanh
- + Máy ủ chuyên dụng
- + Giá đựng gelcard
- + Pipettman
- Thuốc thử

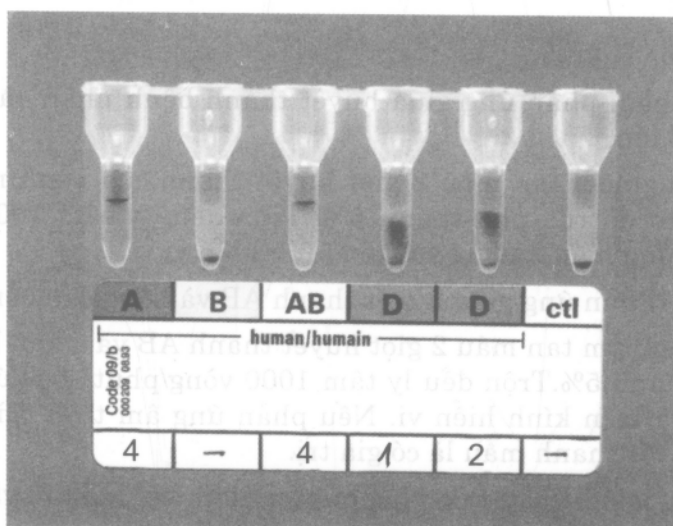
- + Gelcard, đã có sẵn các kháng huyết thanh chuẩn (kháng thể A, B, AB)
- + Dung dịch để pha hồng cầu
- Chuẩn bị: Pha hồng cầu thành huyền dịch 0,8% trong dung dịch pha hồng cầu.

3.3.3. Các bước tiến hành

- Ghi họ tên bệnh nhân cần định nhóm vào gelcard
- Nhỏ 50 dịch treo hồng cầu vào các giếng có ghi kháng thể A, B, AB.
- Ly tâm 900 vòng/phút/10 phút
- Nhận định kết quả: Trình bày trong hình 6.25.

Phản ứng dương tính: hồng cầu ngưng kết nằm trên cột gel

Phản ứng âm tính: hồng cầu lắng toàn bộ xuống đáy cột gel



Hình 6.25: Kết quả định nhóm máu ABO bằng gelcard nếu có phản ứng ngưng kết thì các hạt ngưng kết sẽ được giữ lại trên cột gel (+); nếu không có ngưng kết hồng cầu lắng xuống đáy hoàn toàn (-). Mức độ ngưng kết được đánh giá bằng 4+, 3+, 2+, 1+, ($\pm$), (-) dựa vào hạt ngưng kết giữ lại trên bề mặt cột gen (A và AB (4+); D (1+, 2+).

4. Những nguyên nhân sai lầm trong định nhóm máu ABO

4.1. Do các thủ tục hành chính: nhầm tên hoặc trùng tên bệnh nhân, lấy nhầm ống máu, ghi tên sai...

4.2. Nhầm lẫn huyết thanh học

- Ngưng kết không đặc hiệu: do hồng cầu mẫu, hoặc huyết thanh mẫu đã cũ, nhiễm trùng, biến chất.
- Mẫu máu xét nghiệm có hiện tượng kết dính hồng cầu chuỗi tiên gặp ở một số bệnh tự miễn, myeloma.

- Tỷ lệ huyết thanh mẫu, hồng cầu mẫu không tương ứng
- Để quá lâu mới đọc kết quả (mẫu phản ứng khô).

4.3. Các nguyên nhân khác

Dụng cụ không sạch, tay nghề của người xét nghiệm viên chưa thành thạo, hoặc thiếu cẩn thận.

5. Những khó khăn trong định nhóm máu ABO, giải pháp

5.1. Do không phù hợp kết quả giữa hai phương pháp: huyết thanh mẫu, hồng cầu mẫu.

Giải pháp: phải tìm nguyên nhân bằng các bước sau:

- Rửa hồng cầu bệnh nhân và hồng cầu nhóm O (có đầy đủ kháng nguyên hồng cầu ngoài hệ ABO) bằng nước muối 9% ba lần, pha thành dung dịch hồng cầu 5%.

- Tiến hành ba chứng:

- + Chứng tự thân: phản ứng giữa huyết thanh bệnh nhân và hồng cầu của bệnh nhân đã rửa 3 lần.

Nhỏ vào ống nghiệm tan máu 2 giọt huyết thanh của bệnh nhân và 1 giọt hồng cầu bệnh nhân đã rửa pha thành 5%. Trộn đều, ly tâm 1000 vòng/phút/1 phút, đọc kết quả bằng mắt thường và trên kính hiển vi

- + Chứng AB: (Phản ứng giữa huyết thanh AB và hồng cầu bệnh nhân)

Nhỏ vào ống nghiệm tan máu 2 giọt huyết thanh AB và 1 giọt hồng cầu bệnh nhân đã rửa pha thành 5%. Trộn đều ly tâm 1000 vòng/phút/ 1 phút, đọc kết quả bằng mắt thường và trên kính hiển vi. Nếu phản ứng âm tính thì phương pháp định nhóm bằng huyết thanh mẫu là có giá trị.

- + Chứng đồng loài: (Phản ứng giữa huyết thanh bệnh nhân và hồng cầu O):

Nhỏ vào ống nghiệm tan máu 2 giọt huyết thanh bệnh nhân và 1 giọt hồng cầu O đã rửa pha thành 5%. Trộn đều, ly tâm 1000 vòng/phút/1 phút, đọc kết quả bằng mắt thường và trên kính hiển vi. Nếu phản ứng âm tính thì phương pháp định nhóm bằng hồng cầu mẫu được bảo đảm.

Dựa vào kết quả 3 chứng: tự thân, đồng loài và AB ở trên ta có thể chia các trường hợp khó khăn trong định nhóm máu hệ ABO thành hai nhóm chính để tìm nguyên nhân.

Khi cả 3 chứng nói trên đều âm tính: trường hợp này có thể do các nguyên nhân sau:

① Có tiêu huyết tố:

Ví dụ:

Kháng thể kháng A	Kháng thể kháng B	Kháng thể kháng AB	Hồng cầu A	Hồng cầu B	Chứng Allo (-)
(-)	(-)	(-)	(+)	+++	Chứng AB (-)
					Chứng Auto (-)

Nhận xét:

– Bệnh nhân có thể có nhóm máu O nhưng không có sự phù hợp giữa 2 phương pháp huyết thanh mẫu và hồng cầu mẫu vì kháng thể kháng A của bệnh nhân này rất yếu hoặc âm tính.

– Bệnh nhân có thể có tiêu huyết tố kháng A

– Tiêu huyết tố chỉ xảy ra khi có mặt bổ thể

Cách giải quyết:

Khử bổ thể có trong huyết thanh của bệnh nhân ở 56°C / 30 phút

Thử lại phương pháp hồng cầu mẫu, nếu có tiêu huyết tố thì sau khi khử bổ thể phản ứng sẽ trở lại bình thường như sau:

Kháng thể kháng A	Kháng thể kháng B	Kháng thể kháng AB	Hồng cầu A	Hồng cầu B
(-)	(-)	(-)	++++	+++

② Có hai quần thể hồng cầu

Ví dụ:

Kháng thể kháng A	Kháng thể kháng B	Kháng thể kháng AB	Hồng cầu A	Hồng cầu B	Chứng Allo(-)
±	(-)	±	(-)	+++	Chứng AB(-) Chứng Auto(-)

Nhận xét: Nhóm máu của bệnh nhân có thể là nhóm A, nhưng hồng cầu của bệnh nhân ngưng kết với huyết thanh mẫu kháng A, kháng AB không hoàn toàn, còn nhiều hồng cầu tự do.

– Có thể gặp hiện tượng hai quần thể hồng cầu trong những trường hợp sau:

+ Những người được truyền máu, truyền tuỷ khác nhóm hệ ABO.

+ Những người có nhóm máu A yếu, B yếu

+ Bệnh nhân đa u tuỷ xương, leukemia

+ Thể khảm hoặc ghép các gen của hệ nhóm máu ABO

Cách giải quyết:

+ Hỏi triệu chứng lâm sàng của bệnh nhân, chẩn đoán lâm sàng của bệnh nhân

+ Hỏi tiền sử truyền máu, truyền tuỷ của bệnh nhân

+ Tìm chất ABH trong nước bọt

+ Xác định kiểu hình trong các trường hợp khảm hoặc ghép của gen bằng nghiên cứu di truyền.

+ Xác định các trường hợp A yếu, B yếu

③ Do kháng thể yếu (suy giảm miễn dịch bẩm sinh hoặc mắc phải):

Ví dụ:

Kháng thể kháng A	Kháng thể kháng B	Kháng thể kháng AB	Hồng cầu A	Hồng cầu B	Chứng Allo(-)
+++	(-)	+++	(-)	(-)	Chứng AB(-) Chứng Auto(-)

Nhận xét:

- Bệnh nhân có thể có nhóm máu A, nhưng có kháng thể kháng B rất yếu hoặc âm tính.
- Những trường hợp này có thể gặp ở trẻ sơ sinh dưới 6 tháng tuổi do kháng thể kháng A, kháng B chưa được hình thành một cách đầy đủ.
- Thiếu hụt miễn dịch bẩm sinh
- Thiếu hụt miễn dịch mắc phải Leukemia cấp, người già..)

Cách giải quyết:

- Điện di miễn dịch để khẳng định
- Làm các xét nghiệm để chẩn đoán leukemia

5.2. Do kháng thể lạnh

Ví dụ:

Kháng thể kháng A	Kháng thể kháng B	Kháng thể kháng AB	Hồng cầu A	Hồng cầu B	Chứng Allo +++
+++	+++	+++	+++	+++	Chứng AB +++ Chứng Auto +++

Nhận xét:

- Bệnh nhân có thể có kháng thể lạnh khi nhiệt độ của môi trường giảm dưới 20°C.
- Khi để hồng cầu bệnh nhân vào bình cách thủy 37°C thì hiện tượng ngưng kết mất dần

Cách giải quyết:

- Rửa hồng cầu bệnh nhân bằng nước muối 0,9% đã được để ấm 37°C.
- Định nhóm trên phiến kính nóng 37°C hoặc trong ống nghiệm ở 37°C.

5.3. Do có kháng thể tự miễn

Ví dụ:

Kháng thể kháng A	Kháng thể kháng B	Kháng thể kháng AB	Hồng cầu A	Hồng cầu B	Chứng Allo +++
+++	+++	+++	+++	+++	Chứng AB +++ Chứng Auto +++

Nhận xét: Bệnh nhân có thể có kháng thể tự miễn. Các kháng thể này đã được cố định trên bề mặt hồng cầu, thường gặp ở những bệnh nhân thiếu máu tan máu miễn dịch, bệnh nhân bị bệnh hệ thống.

Cách giải quyết:

- Xem lại chẩn đoán lâm sàng của bệnh nhân
- Rửa hồng cầu bệnh nhân nhiều lần bằng nước muối 9‰ đã được để ở 37°C, rồi định lại nhóm máu cho bệnh nhân.

5.4. Hiện tượng hồng cầu chuỗi tiến

Ví dụ:

Kháng thể kháng A	Kháng thể kháng B	Kháng thể kháng AB	Hồng cầu A	Hồng cầu B	Chứng Allo +++
+++	+++	+++	+++	+++	Chứng AB +++
					Chứng Auto +++

Nhận xét:

- Bệnh nhân có sự tăng bất thường của protein trong huyết thanh thường gặp ở bệnh nhân đa u tủy xương, tăng sợi huyết.
- Có sự ngưng kết tăng nhanh của hồng cầu giống như một ngưng kết và nó sẽ được phân tán rất nhanh khi ta nhỏ vào hồng cầu bệnh nhân 1 giọt nước muối 1,5%.

Cách giải quyết:

Rửa hồng cầu bệnh nhân bằng nước muối 0,9%, rồi định lại nhóm máu bằng phương pháp huyết thanh mẫu hoặc pha loãng nhẹ nhàng huyết thanh bệnh nhân trong nước muối sinh lý 0,9% cho đến khi nồng độ protein trong huyết thanh không đủ để kết dính các hồng cầu mẫu thành hình chuỗi tiến thì định lại với phương pháp hồng cầu mẫu.

KỸ THUẬT ĐỊNH NHÓM MÁU HỆ Rh

1. Nguyên lý

Hệ nhóm máu Rh có tầm quan trọng trong thực hành truyền máu chỉ sau hệ nhóm máu ABO. Sau khi hệ thống nhóm máu hệ ABO được phát hiện, việc xảy ra các tai biến truyền máu được giảm nhiều so với trước đây, tuy nhiên người ta vẫn gặp những tai biến truyền máu mặc dù đã làm xét nghiệm hoà hợp nhóm máu hệ ABO. Năm 1940, Lanstainer và Wiener đã tiến hành một thực nghiệm trên khỉ *Macacus Rhesus*, và đã phát hiện ra hệ nhóm máu Rh. Sự phát hiện ra nhóm máu hệ Rh đã giải thích được những trường hợp vàng da tan máu ở trẻ sơ sinh. Khác

với hệ nhóm máu ABO, hệ Rh chỉ có KN mà không có KT tự nhiên. KT đặc hiệu KN hệ Rh chỉ có mặt do có sự miễn dịch KN từ ngoài vào, vì vậy còn gọi là KT miễn dịch. Kháng nguyên đầu tiên của hệ Rh được phát hiện là kháng nguyên D, người có kháng nguyên D trên bề mặt hồng cầu được gọi là người có nhóm máu Rh dương và người không có kháng nguyên D trên bề mặt hồng cầu được gọi là người có nhóm máu Rh âm.

Các kháng nguyên chính của hệ Rh bao gồm 6 kháng nguyên chính là D,d, C,c,E,e. Các kháng nguyên này được tồn tại và di truyền theo cặp Dd, Cc, Ee. Trên thực tế kháng nguyên d chỉ là giả thuyết vì cho đến nay người ta vẫn chưa rõ cấu trúc của kháng nguyên d.

2. Các kỹ thuật xác định nhóm máu hệ Rh

Hiện nay có nhiều kỹ thuật xác định nhóm máu hệ Rh, tùy thuộc từng loại sinh phẩm của các hãng mà ta có các kỹ thuật xác định nhóm máu hệ Rh khác nhau. Tuy nhiên có bốn kỹ thuật hiện hay được sử dụng nhất là:

2.1. Kỹ thuật xác định nhóm máu hệ Rh trên phiến kính nóng (40°C): Là kỹ thuật hay được sử dụng nhất.

- Kháng thể của hệ Rh thường là kháng thể thiếu do vậy nó rất thích hợp hoạt động trong môi trường 37°C, môi trường đại phân tử, hoặc môi trường albumin.

- Dụng cụ và thuốc thử:

- + Thuốc thử: kháng thể chống D- Albumin

- + Phiến kính

- + Que trộn

- + Hộp sáng để định nhóm hệ Rh

- Tiến hành kỹ thuật:

Bước 1: Đặt hai giọt thuốc thử anti-D - albumin vào một phiến kính sạch, có nhãn ở 3 vị trí.

Bước 2: Thêm vào bên cạnh giọt thuốc thử anti-D - albumin một giọt dịch treo hồng cầu 40-50% của bệnh nhân, của người Rh(+), của người Rh (-) (Các hồng cầu này có thể treo trong dung dịch nước muối 0,9% hoặc trong huyết tương của bệnh nhân).

Bước 3: Trộn anti-D - albumin với dịch treo hồng cầu để có đường kính khoảng từ 20 mm trên phiến kính nóng, lắc phiến kính nóng từ trước ra sau cho đến khi xuất hiện ngưng kết.

Bước 4: Quan sát hiện tượng ngưng kết và đọc kết quả trong vòng 2 phút

Bước 5: Đánh giá và ghi lại kết quả

- Đánh giá kết quả:

- + Phản ứng ngưng kết: Chỉ ra là người đó có nhóm máu Rh dương tính

- + Phản ứng không ngưng kết: Chỉ ra là người đó nhóm máu Rh (-)

2.2. Kỹ thuật xác định nhóm máu hệ Rh trên ống nghiệm trong môi trường albumin

– Kháng thể của hệ Rh thường là kháng thể thiếu do vậy nó rất thích hợp hoạt động trong môi trường 37°C, môi trường đại phân tử, môi trường albumin.

– Dụng cụ và thuốc thử:

+ Thuốc thử anti - D

+ Ống nghiệm

+ Máy ly tâm

+ Pipette Pasteur

+ Nước muối 0,9%

+ Albumin bò 20-30%

+ 2ml máu chống đông

– Tiến hành kỹ thuật:

+ Bước 1: Nhỏ một giọt thuốc thử anti-D vào một ống nghiệm sạch, có nhãn

+ Bước 2: Thêm vào ống nghiệm trên một giọt dịch treo hồng cầu cần định nhóm 2-4%.

(Hồng cầu này có thể treo trong huyết thanh AB hoặc trong huyết thanh của bệnh nhân).

+ Bước 3: Trộn đều anti-D với dịch treo hồng cầu, ủ ở 37°C từ 45-60 phút.

+ Bước 4: Thêm 1 giọt albumin bò 20-30% vào ống nghiệm trên

+ Bước 5: Ủ thêm 15 phút ở 37°C.

+ Bước 6: Đọc và ghi lại kết quả

– Đánh giá kết quả:

+ Phản ứng ngưng kết: Chỉ ra là người đó có nhóm máu Rh dương tính

+ Phản ứng không ngưng kết: Chỉ ra là người đó nhóm máu Rh (-)

2.3. Kỹ thuật định nhóm D yếu

Khi cần xác định những trường hợp D yếu, bằng các biện pháp thông thường khó xác định. Trong những trường hợp đó có thể xác định kháng nguyên D yếu bằng nghiệm pháp Coombs gián tiếp, kỹ thuật xử lý enzym.

– Dụng cụ và thuốc thử:

+ Ống nghiệm tan máu

+ Máy ly tâm

+ Bình cách thuỷ 37°C

+ Pipette Pasteur

+ Nước muối 0,9%

+ Huyết thanh Coombs

- Các bước tiến hành
- + Bước 1: Trong ống nghiệm tan máu, nhỏ 1 giọt dịch treo hồng cầu 2-4% và thêm vào ống nghiệm đó 2 giọt anti-D.
- + Bước 2: Ủ 37°C trong 30 phút
- + Bước 3: Quan sát hiện tượng ngưng kết
- + Bước 4: Nếu dương tính ghi lại kết quả, nếu âm tính thì rửa hồng cầu 3 lần bằng nước muối 0,9%.
- + Bước 5: Thêm 2 giọt huyết thanh Coombs
- + Bước 6: Ly tâm 1000 vòng/ phút/ 1 phút
- + Bước 6: Đọc kết quả phản ứng trên kính hiển vi

2.4. Kỹ thuật xác định nhóm máu hệ Rh trong ống nghiệm bằng kháng thể đặc hiệu kháng nguyên D được sản xuất theo phương pháp đơn dòng

- Hiện nay hầu hết các anti-D đều được sản xuất theo phương pháp đơn dòng do vậy rất thuận tiện cho việc xác định nhóm máu hệ Rh vì nó có độ nhạy và độ đặc hiệu rất cao và có thể được sản xuất với số lượng lớn.

- Dụng cụ và thuốc thử:
 - + Anti-D được sản xuất theo phương pháp đơn dòng
 - + Nước muối 0,9%
 - + Ống nghiệm tan máu
 - + Máy ly tâm
 - + Kính hiển vi
 - + Pipette Pasteur
 - + Que thủy tinh
 - + Mẫu máu : 2 ml máu có chống đông
- Tiến hành kỹ thuật :
 - + Bước 1: Nhỏ một giọt anti-D vào một ống nghiệm sạch đã được ghi nhãn.
 - + Bước 2: Thêm vào ống nghiệm trên một giọt hồng cầu (Dịch treo hồng cầu được quy định theo từng loại sinh phẩm và được treo trong huyết tương của bệnh nhân).
 - + Bước 3: Trộn đều anti-D và hồng cầu cần định nhóm hệ Rh(D).
 - + Bước 4: Ly tâm 1000 vòng/phút/1 phút
 - + Bước 5: Quan sát hiện tượng ngưng kết và ghi lại kết quả

KỸ THUẬT ĐỊNH NHÓM MÁU CÁC HỆ KHÁC

Trong một vài trường hợp ngoài việc định nhóm máu ABO và Rh, người ta phải xác định thêm kháng nguyên của các hệ nhóm máu khác của hồng cầu.

1. Các trường hợp cần định nhóm máu khác ngoài hệ ABO

- Bệnh nhân sẽ phải truyền máu nhiều lần:

Người ta khuyên cần xác định nhóm máu của những hệ dễ gây miễn dịch nhất như hệ Rhésus, hệ Kell, hệ Duffy, hệ Kidd

- Nghiên cứu di truyền:

- + Xác định sinh đôi cùng trứng hoặc khác trứng
- + Những trường hợp bất thường của nhiễm sắc thể
- + Xác định hồng cầu của những người cho máu thường xuyên (Rh, Kell, Duffy, Kidd, Lewis) để xây dựng panel hồng cầu.
- + Nghiên cứu quần thể
- + Nghiên cứu phả hệ

2. Những thuốc thử thường dùng để định nhóm máu khác của hệ hồng cầu

- Các thuốc thử có nguồn gốc từ người: Phần lớn là các kháng thể miễn dịch
 - + Hệ Rh: anti D, anti C, anti c, anti E, anti e
 - + Hệ Kell: anti K
 - + Hệ Duffy: anti Fya, anti Fyb
 - + Hệ Kidd: anti Jka, anti Jkb
 - + Hệ S,s: anti S, anti s
 - + Hệ Lutheran: anti Lua, anti Lub
- Những kháng thể tự nhiên (hiếm gặp hơn)
 - + Hệ Lewis: anti Lea, anti Leb, anti Lex
 - + Hệ P: anti P1
- Những kháng thể có nguồn gốc động vật:
 - + Hệ M,N: Anti M, anti N có nguồn gốc từ thỏ
 - + Hệ P: anti P1 có nguồn gốc từ lợn và ngựa
 - + Hệ Lewis: anti Lea, anti Leb có nguồn gốc từ dê

Không có một nguyên tắc chung nào cho việc sử dụng những thuốc thử này. Mỗi thuốc thử đều có sự chỉ dẫn sử dụng riêng của từng hãng sản xuất. Các kỹ thuật khác nhau có thể được sử dụng như: định nhóm trên phiến kính hoặc trong ống nghiệm, định nhóm trong môi trường nước muối hoặc định nhóm trong môi trường enzym, hoặc sử dụng nghiệm pháp Coombs. Tuy nhiên có một điểm rất quan trọng là phải luôn thực hiện phản ứng kèm theo một chứng âm và chứng dương cho mỗi một hệ thống nhóm máu.

Việc định nhóm có thể cũng được thực hiện trên máy định nhóm máu tự động hoặc bằng tay.

PHẢN ỨNG CHÉO (PHẢN ỨNG HOÀ HỢP)

1. Nguyên tắc

Để kiểm tra sự hoà hợp nhóm máu giữa người cho và người nhận, người ta trộn huyết thanh người nhận với hồng cầu người cho hoặc hồng cầu của người nhận với huyết tương của người cho rồi xem xét hiện tượng ngưng kết.

2. Dụng cụ, phương tiện, hoá chất

- Ống nghiệm tan máu
- Lam kính
- Pipette Pasteur
- Kính hiển vi
- Máy ly tâm
- Nước muối 0,9%, nước cất
- Huyết thanh mẫu, hồng cầu mẫu

3. Mẫu máu xét nghiệm: gồm hai ống

- Lấy 5ml máu tĩnh mạch vào một ống nghiệm sạch không chống đông để lấy huyết thanh làm xét nghiệm.
- Lấy 2ml máu tĩnh mạch vào một ống nghiệm nhựa sạch đã có sẵn chất chống đông để lấy hồng cầu làm xét nghiệm.

4. Tiến hành kỹ thuật

- Máu người cho và người nhận tách thành hai phần riêng biệt: huyết thanh và hồng cầu. Pha hồng cầu người cho và hồng cầu người nhận 5% bằng nước muối 0,9% (1 giọt hồng cầu khối + 19 giọt nước muối).
- Định lại nhóm máu người cho và người nhận bằng hai phương pháp huyết thanh mẫu và hồng cầu mẫu xem có phù hợp không.

– Đánh số ống nghiệm 1, ống nghiệm 2 và ghi tên người nhận, khoa phòng lên 2 ống nghiệm đó. Ống nghiệm 1 cho: 2 giọt huyết thanh người nhận và 1 giọt hồng cầu người cho 5%. Ống 2 cho: 2 giọt huyết thanh người cho và 1 giọt hồng cầu người nhận 5%. Lắc đều 2 ống, ly tâm 1000 vòng/phút/1 phút. Lấy ra đọc kết quả bằng mắt thường và trên kính hiển vi.

5. Đánh giá kết quả

– Nếu ở cả ống 1 và 2 không có hiện tượng ngưng kết thì máu người cho và người nhận phù hợp.

– Trường hợp cả ống 1 và 2 đều ngưng kết hoặc ống 1 ngưng kết (khi truyền khối hồng cầu), ống 2 ngưng kết khi truyền huyết tương đều không truyền được.

Chú ý:

- Trường hợp truyền máu toàn phần phải làm đầy đủ cả 2 ống chéo như trên.
- Nếu truyền khối hồng cầu chỉ cần làm chéo ống 1, nếu truyền huyết tương và khối tiểu cầu chỉ cần làm chéo ống 2.
- Hồng cầu người cho và bệnh nhân được pha đúng tỷ lệ
- Mẫu máu bị nhiễm trùng

6. Các yếu tố ảnh hưởng

- Lam kính, ống nghiệm bẩn có thể gây ngưng kết giả
- Ly tâm với tốc độ quá cao.
- Ngưng kết lạnh chú ý đảm bảo nhiệt độ phòng thí nghiệm)
- Mẫu máu lấy không đúng quy cách hoặc bị đông dây

Chú ý: phải lưu ống máu chéo giữa người cho và người nhận ở 4°C, sau 24 giờ mới được hủy.

PHƯƠNG PHÁP HIỆU GIÁ KHÁNG THỂ MIỄN DỊCH

1. Nguyên tắc: Kháng thể miễn dịch thường kết hợp với kháng thể tự nhiên. Vì vậy muốn hiệu giá kháng thể miễn dịch phải tiến hành qua hai giai đoạn:

– Trung hoà kháng thể tự nhiên bằng chất Witebsky hoặc khử kháng thể tự nhiên bằng cách đun nóng ở 70°C trong 10 phút.

- Hiệu giá kháng thể miễn dịch có thể thực hiện bằng một số kỹ thuật sau:
 - + Phương pháp hiệu giá ở môi trường albumin.
 - + Nghiệm pháp Coombs gián tiếp.
 - + Kỹ thuật xử lý hồng cầu bằng emzym papain, trypsin, bromelin.

2. Chuẩn bị

- Dụng cụ: Ống nghiệm nhỏ, lam kính, pipette.
- Huyết thanh xét nghiệm 5 ml.
- Hồng cầu nhóm A và B mới được lấy vào ống nghiệm sạch đã có sẵn dung dịch chống đông
- Huyết thanh nhóm máu AB.
- Chất Witebsky.
- Huyết thanh kháng globulin người loại γ globulin
- Huyết thanh chứng lấy ở người bình thường không có kháng thể miễn dịch.

3. Phương pháp tiến hành

3.1. Kỹ thuật trung hoà kháng thể tự nhiên

- Loại trừ kháng thể tự nhiên bằng nhiệt: trong ống nghiệm đã được ghi nhãn (số 1) cho:

- + 0,5ml huyết thanh xét nghiệm.
- + 0,5ml dung dịch nước muối 0,9%.

Trong ống nghiệm thứ 2 cho:

- + 0,5ml huyết thanh người bình thường (làm chứng).
- + 0,5ml dung dịch nước muối 0,9%

Lắc đều hai ống nghiệm, đặt vào bình cách thuỷ có nhiệt độ 70°C trong 10 phút.

Kiểm tra xem đã khử hết kháng thể tự nhiên chưa, bằng cách nhỏ huyết thanh trên với hồng cầu A và B (giống như hiệu giá kháng thể tự nhiên) O. Nếu ống 2 không thấy ngưng kết, chứng tỏ đã loại trừ được kháng thể tự nhiên.

- Hút kháng thể tự nhiên bằng chất Witebsky: trong ống nghiệm thứ 3 cho:

- + 0,5ml huyết thanh xét nghiệm.
- + 0,5ml chất Witebsky.

Trong ống số 4 cho:

- 0,5ml huyết thanh người bình thường (làm chứng).
- 0,5ml chất Witebsky.

Lắc đều 2 ống trên, để tủ lạnh 4°C trong một đêm, tùy theo quy định của hãng sản xuất chất Witebsky, kiểm tra xem đã hút hết kháng thể tự nhiên chưa (giống như trên). Sau đó hiệu giá huyết thanh đã khử kháng thể tự nhiên mà đã được hút bởi chất Witebsky.

3.2. Kỹ thuật hiệu giá kháng thể miễn dịch kháng A và kháng B

Tiến hành theo ba phương pháp sau đây:

3.2.1. Phương pháp trong ống nghiệm

- Chuẩn bị: Huyết thanh AB.

- Tiến hành: Rửa hồng cầu A và B 3 lần bằng dung dịch nước muối 0,9%. Sau lần rửa cuối cùng thì hút hết nước ở trên ra và pha thành dung dịch hồng cầu 5% với huyết thanh AB.

Dùng 20 ống nghiệm, chia làm hai dãy, pha loãng huyết thanh AB để có độ pha loãng 1/1, 1/2, 1/4, 1/8... 1/512, mỗi ống có 4 giọt huyết thanh AB đã được pha loãng. Sau đó cho hai giọt dung dịch hồng cầu 5% vào mỗi ống. Đối với dãy A nhỏ hồng cầu nhóm A. Đối với dãy B nhỏ hồng cầu nhóm B.

Lắc đều. Để tất cả hai dãy ống nghiệm vào trong bình cách thủy 37°C/1giờ. Quay ly tâm 2000vòng/phút/1phút trong điều kiện nhiệt độ của phòng thí nghiệm. Sau khi ly tâm xong, phải để những ống nghiệm đó ở nhiệt độ 37°C trong 3 phút.

- Đọc kết quả: quan sát hiện tượng tan máu và ngưng kết bằng mắt thường.

3.2.2. Nghiệm pháp Coombs gián tiếp: Huyết thanh xét nghiệm đã được ức chế kháng thể tự nhiên hệ ABO bằng chất Witebsky hoặc bằng nhiệt. Phương pháp tiến hành như sau:

- Trong 10 ống nghiệm pha loãng huyết thanh cần xét nghiệm ở nồng độ 1/1, 1/2, 1/4... 1/512 bằng dung dịch nước muối 0,9% (mỗi ống có 4 giọt huyết thanh đã được pha loãng bằng nước muối 0,9%).

- Cho thêm vào mỗi ống 2 giọt dung dịch hồng cầu 5% (hồng cầu nhóm A và B đã được rửa 3 lần và được pha bằng dung dịch nước muối 0,9%).

- Quay ly tâm lần thứ nhất 10 ống xem còn kháng thể tự nhiên không (thường không quá 1/4). Lấy những ống không ngưng kết để vào thùng cách thủy 37°C/1 giờ, lấy ra quay ly tâm 2000 vòng/phút/1phút. Quan sát hiện tượng ngưng kết bằng mắt thường. Nếu thấy ngưng kết, chứng tỏ có kháng thể miễn dịch loại đủ.

- Lại lấy những ống không ngưng kết đem ly tâm ở tốc độ 2000 vòng/phút/3 phút. Hút hết dịch nổi ở trên, rồi rửa hồng cầu 3 lần bằng dung dịch nước muối 0,9%. Sau lần rửa cuối cùng thì hút hết dịch nổi, rồi nhỏ vào mỗi ống 2 giọt huyết thanh Coombs, lắc đều ly tâm 1000 vòng/phút/1phút. Rồi quan sát hiện tượng ngưng kết. Hiện tượng ngưng kết ở nghiệm pháp Coombs chứng tỏ sự có mặt của kháng thể miễn dịch loại thiếu.

3.2.3. Phương pháp dùng enzym: để xác định kháng thể miễn dịch chống A và B. Hồng cầu đã được xử lý bằng enzym cho tiếp xúc với kháng thể miễn dịch loại thiếu (kháng thể A và kháng thể B). Nếu xuất hiện hiện tượng ngưng kết với hồng cầu tương ứng có nghĩa trong huyết thanh của bệnh nhân có kháng thể miễn dịch chống A hoặc B.

- Phương pháp tiến hành: chuẩn bị ngay dung dịch papain và khối hồng cầu rửa (A và B). Trong một số ống nghiệm nhỏ: khối hồng cầu 0,5 ml; dung dịch papain 0,5 ml.

Lắc đều rồi để vào bình cách thủy 37°C, thời gian tùy thuộc từng loại papain mà các hãng sản xuất quy định.

Rửa hồng cầu 3 lần bằng nước muối 0,9% để loại trừ hết papain (Rồi kiểm tra hồng cầu sau khi xử lý enzym xem có bị ngưng kết không, nếu có ngưng kết phải xem lại các khâu trên).

Pha dung dịch hồng cầu đã xử lý bằng papain 3% trong dung dịch nước muối 0,9%.

Huyết thanh xét nghiệm đã được khử kháng thể tự nhiên đem pha loãng 1/1, 1/2, 1/4... 1/512. Sau đó cho vào mỗi ống 2 giọt dung dịch hồng cầu đã xử lý bằng papain 3%.

Lắc đều, để ở bình cách thuỷ 37°C / 1 giờ.

Quan sát hiện tượng ngưng kết ngay ở điều kiện ấm, không quay ly tâm.

– Kết quả: Hiện tượng ngưng kết hồng cầu xử trí bằng papain chứng tỏ có mặt của kháng thể miễn dịch loại thiếu.

Xác định kháng thể miễn dịch hệ ABO bằng nghiệm pháp Coombs gián tiếp và bằng hồng cầu đã được xử lý bằng men, thường được tiến hành cùng một lúc để đối chiếu với nhau cho thêm phần chính xác, kết quả thường giống nhau.

PHƯƠNG PHÁP TÁCH KHÁNG NGUYÊN

1. Nguyên lý

Khi nghiệm pháp Coombs trực tiếp dương tính, ta phải tiến hành kỹ thuật tách kháng nguyên để xác định bản chất của kháng thể. Tách kháng nguyên là phương pháp tách các kháng thể đã được cảm nhiễm ra khỏi kháng nguyên tương ứng trên bề mặt hồng cầu. Kỹ thuật tách kháng nguyên có hiệu quả có nghĩa là làm cho lực liên kết giữa kháng nguyên và kháng thể đặc hiệu đó bị phá vỡ hoặc đảo ngược. Có nhiều phương pháp tách kháng nguyên như phương pháp tách: bằng nhiệt, chloroquin disphosphat, acid citric, sóng siêu âm, làm tan đông, ether. Có hai phương pháp hay được sử dụng là tách kháng nguyên bằng nhiệt và ether.

2. Dụng cụ và thuốc thử

2.1. Dụng cụ

- Máy ly tâm
- Kính hiển vi
- Pipette Pasteur
- Bình cách thuỷ
- Lam kính
- Ống nghiệm tan máu

2.2. Thuốc thử

- Ether
- Huyết thanh Coombs

- Nước muối 9‰
- Huyết thanh AB

3. Quy trình kỹ thuật

3.1. Phương pháp tách kháng nguyên bằng nhiệt

- Trong một ống nghiệm tan máu. Nhỏ một thể tích khối hồng cầu đã rửa 6 lần bằng nước muối 0,9%. Giữ lại dịch nổi của lần rửa cuối cùng để tiến hành thử nghiệm song song với nước tách.

- Thêm vào ống nghiệm 1 thể tích nước muối 0,9% hoặc huyết thanh AB
- Để 15 phút ở 56°C
- Ly tâm ống nghiệm trong điều kiện nóng ở 56°C
- Thu hồi nước tách có chứa kháng thể

3.2. Tách kháng nguyên bằng ether

- Trong một ống nghiệm nhỏ một thể tích khối hồng cầu đã rửa 6 lần bằng nước muối 9‰. Giữ lại dịch nổi của lần rửa cuối cùng để tiến hành thử nghiệm song song với nước tách.

- Thêm vào ống nghiệm 1 thể tích nước muối 0,9% hoặc huyết thanh AB
- Thêm 2 thể tích ether vào ống nghiệm trên
- Đậy nút ống nghiệm và lắc mạnh từ 3 đến 4 phút
- Mở nút và đặt ống nghiệm ở 37°C/15 phút.
- Ly tâm tốc độ 1000 vòng/phút/5 phút
- Dùng pipette Pasteur chuyển phần nước tách sang một ống nghiệm sạch
- Để ở 37°C và dùng pipette Pasteur hút bỏ phần ether thừa nổi bọt trên phần nước tách.
- Khi hết mùi ether, quay ly tâm 1000 vòng/ 5 phút thu lấy phần dịch nổi ở trên.

3.3. Kỹ thuật tìm kháng thể đặc hiệu của nước tách

- Một thể tích nước tách
- Một thể tích hồng cầu mà ta biết trước các nhóm hệ hồng cầu panel
- Ủ ở 37°C trong 1 giờ
- Ly tâm, đọc trên kính hiển vi và ghi lại kết quả

Chương 7

SẢN XUẤT, BẢO QUẢN VÀ PHÂN PHỐI MÁU, CÁC SẢN PHẨM MÁU

CÁCH SẢN XUẤT HỒNG CẦU MẪU VÀ BẢO QUẢN

1. Hồng cầu mẫu

Là những hồng cầu mang kháng nguyên có độ đặc hiệu, độ nhạy cao đã được xác định trước. Ví dụ: Hồng cầu mẫu A là hồng cầu mang kháng nguyên A, hồng cầu mẫu B là hồng cầu mang kháng nguyên B đã được chọn lọc từ nhiều cá thể để có hồng cầu có độ nhạy, độ đặc hiệu cao nhất.

Dùng các hồng cầu mang kháng nguyên đã biết trước (kháng nguyên A, kháng nguyên B) được chuẩn bị sẵn để xác định huyết thanh chưa biết.

2. Nguyên tắc: Các hồng cầu mẫu trong môi trường nuôi dưỡng đặc biệt vẫn giữ nguyên đặc tính kháng nguyên.

3. Dụng cụ, phương tiện, hoá chất

- | | |
|----------------------------|------------------------------------|
| - Ống nghiệm to nhọn đáy | - Complexon III |
| - Pipette Pasteur | - Na HPO.2HO |
| - Máy ly tâm | - Cloramphenicol |
| - Nước muối 0,9% | - Albumin huyết thanh bò (BSA) 30% |
| - Hồng cầu A và hồng cầu B | - Nước cất |
| - Huyết thanh AB | - NaOH 1N. |
| - Glucose | |

4. Tiến hành kỹ thuật

4.1. Pha dung dịch bảo quản

Cân chính xác

- | | |
|-----------------------|-------------------------|
| - 7,44g complexon III | - 33,3ml BSA 30% |
| - 3,56g Na HPO.2HO | - 200 ml huyết thanh AB |
| - 1g cloramphenicol | |

- Nước cất vừa đủ 1000ml
 - 17,5g glucose
- Sau đó điều chỉnh bằng NaOH 1N đến pH=7.

4.2. Chọn hồng cầu mẫu

Tuyển chọn người cho máu: khoẻ mạnh, tuổi 18-40, không có bệnh mạn tính, HIV, HCV, HBV(-)

- Lấy máu từ 10 người hồng cầu nhóm A và 10 người hồng cầu nhóm B vào các ống nghiệm nhọn đáy có chống đông ACD hoặc CPD. Ly tâm hút bỏ huyết tương. Rửa hồng cầu 3 lần bằng nước muối 0,9%. Sau lần rửa cuối cùng hút kiệt nước muối để có được khối hồng cầu.
- Tiếp theo là tìm hồng cầu có độ nhạy cao bằng kháng huyết thanh kháng A, kháng B pha loãng dần theo tỷ lệ 1/2, 1/4.... 1/512. Chọn các hồng cầu có độ nhạy từ 1/128 trở lên làm hồng cầu mẫu.

4.3. Bảo quản

- Trộn các hồng cầu A đã được chọn lọc với nhau, các hồng cầu B đã được chọn lọc với nhau (pool) rồi phân phối vào các ống nghiệm sấy vô trùng đã đánh dấu nhóm sẵn. Thêm dung dịch bảo quản vào để được dung dịch hồng cầu 5% (tỷ lệ: 1 giọt khối hồng cầu thêm 19 giọt dung dịch bảo quản). Dung dịch hồng cầu này có thể giữ được 4 tuần ở 4°C. Khi lấy ra sử dụng: ly tâm, hút kiệt dung dịch bảo quản và thêm nước muối để có dung dịch hồng cầu 10-20%.

5. Các yếu tố ảnh hưởng

- Để tránh nhiễm trùng hồng cầu mẫu
- + Dụng cụ (ống ly tâm, ống nghiệm đựng hồng cầu mẫu, pipette...) phải sấy tiệt trùng.
- + Hấp tiệt trùng nước cất trước khi pha dung dịch bảo quản
- + Thao tác kỹ thuật phải nhanh, chính xác, tốt nhất là tiến hành trong buồng vô trùng.
- Hồng cầu mẫu muốn phát hiện được các kháng thể trong huyết thanh cần xác định phải được chuẩn bị từ nhiều người (tốt nhất là 10 người) để có mặt đủ các kháng nguyên cần thiết.

KỸ THUẬT ĐIỀU CHẾ KHỐI HỒNG CẦU

1. Nguyên tắc

Khối hồng cầu thu được sau khi tách huyết tương từ máu toàn phần đã ly tâm hoặc để lắng.

2. Máy móc, dụng cụ, vật liệu

- Máu toàn phần được lấy vô trùng vào bộ túi dẻo có gắn thêm một hoặc nhiều túi chuyển.
- Bàn ép huyết tương
- Kim vuốt dây
- Kéo
- Kẹp hoặc khoá nhựa
- Máy hàn dây hoặc vòng nhôm hàn dây
- Máy ly tâm lạnh
- Cân đĩa thăng bằng
- Cân bàn hoặc cân lò xo

3. Quy trình thực hiện

- Xếp các túi máu vào ống ly tâm. Cân bằng từng cặp ống ly tâm và đặt vào máy ly tâm ở các vị trí đối xứng. Ly tâm mạnh ở 4°C. Nếu túi máu toàn phần đã để lắng vài ngày thì không cần phải ly tâm.
- Đặt túi máu toàn phần đã ly tâm hoặc để lắng rõ thành hai lớp hồng cầu và huyết tương lên bàn ép huyết tương. Chú ý để mặt túi không dán nhãn quay ra ngoài. Tháo cần hãm lò xo nén tấm ép vào bề mặt túi máu.
- Mở thông dây nối túi máu toàn phần với túi chuyển bằng cách bẻ khoá ở đầu dây nối với túi máu toàn phần để huyết tương chảy sang túi chuyển.
- Khoá dây nối túi máu chứa khối hồng cầu và túi chứa huyết tương bằng kẹp hoặc khoá nhựa khi tách đủ lượng huyết tương yêu cầu.
- Ngừng ép bằng cách hạ cần hãm lò xo và tháo túi khối hồng cầu khỏi bàn ép.
- Bổ sung từ túi chuyển chứa dung dịch bảo quản hồng cầu (nếu có) vào túi khối hồng cầu.
- Hàn dây nối giữa túi khối hồng cầu và túi huyết tương ở hai vị trí cách nhau 0,5 cm.
- Điền đầy đủ thông tin ở nhãn túi khối hồng cầu và túi huyết tương
- Cắt rời dây nối ở giữa hai vị trí hàn

4. Bảo quản và cách dùng

- Bảo quản khối hồng cầu ở tủ lạnh nhiệt độ 2 - 6°C
- Thời gian bảo quản:
 - + Nếu không bổ sung dung dịch bảo quản hồng cầu, điều chế vô trùng, hematocrit $\leq 75\%$: thời gian bảo quản như máu toàn phần.
 - + Nếu có bổ sung dung dịch bảo quản hồng cầu trong hệ thống kín: thời gian bảo quản theo quy định của nhà sản xuất.
 - + Nếu có bổ sung dung dịch NaCl 0,9% và/hoặc kỹ thuật điều chế không bảo đảm vô trùng: thời gian bảo quản tối đa 24 giờ sau khi điều chế.

– Có thể bổ sung 50 - 100 ml dung dịch natri chlorua 0,9% vào khối hồng cầu ngay trước khi truyền máu lâm sàng (không tiếp tục bảo quản thêm). Không được sử dụng bất cứ dung dịch nào khác để pha trộn với khối hồng cầu.

– Sử dụng bộ dây có bầu lọc với đường kính lỗ lọc 170 - 200 μm để truyền. Có thể sử dụng bộ lọc vi ngưng kết với đường kính lỗ lọc 20 - 40 μm , hoặc bộ dây truyền kèm bộ lọc bạch cầu.

5. Chỉ định lâm sàng

Các trường hợp thiếu hồng cầu cấp và mạn tính do các loại nguyên nhân.

6. Một số thông số tham khảo

Một đơn vị khối hồng cầu điều chế từ đơn vị máu toàn phần 250 ml bổ sung dung dịch bảo quản hồng cầu hoặc NaCl 0,9% có một số đặc tính sau:

- Thể tích khối hồng cầu: 190 ± 30 ml
- Hematocrit: $0,60 \pm 0,10$

7. Lưu ý

- Tương quan giữa lực ly tâm và tốc độ ly tâm:

$$\text{Lực ly tâm (g)} = 1,118 \times 10^{-5} \times N^2 \cdot r$$

g: Đơn vị đo lực ly tâm

N: Tốc độ ly tâm (vòng/phút)

r: Bán kính rôto máy ly tâm (cm)

- Ly tâm mạnh: Ly tâm với tốc độ cao và/hoặc thời gian dài nhằm làm lắng mọi loại tế bào. Để điều chế khối hồng cầu, thông số tham khảo có thể là:

- + 5000 x g trong 5 phút.
- + 3000 x g trong 8 phút 30 giây

KỸ THUẬT ĐIỀU CHẾ KHỐI HỒNG CẦU NGHÈO BẠCH CẦU

1. Nguyên tắc

Tuỳ phương thức ly tâm, bạch cầu sẽ nằm ở lớp trên cùng với huyết tương hoặc ở mặt phân cách huyết tương - hồng cầu. Khối hồng cầu thu được sau khi tách bỏ bạch cầu cùng với huyết tương từ máu toàn phần hoặc bằng thao tác bổ sung.

2. Máy móc, dụng cụ, vật liệu

- Máu toàn phần được lấy một cách vô trùng vào bộ túi dẻo có gắn thêm một hoặc nhiều túi chuyển.

– Dung dịch bảo quản hồng cầu có sẵn trong bộ túi lấy máu hoặc dung dịch muối đẳng trương natri clorua 0,9%.

- Bàn ép huyết tương
- Kim vuốt dây
- Kéo
- Kẹp hoặc khoá nhựa
- Kẹp ngoại khoa cánh dài 20 - 30 cm
- Máy hàn dây hoặc vòng nhôm hàn dây
- Máy ly tâm lạnh
- Cân đĩa thăng bằng
- Cân bàn hoặc cân lò xo

3. Quy trình thực hiện: Theo hai phương pháp

3.1. Tách bạch cầu bằng cách tách huyết tương giàu bạch cầu, tiểu cầu

– Lấy máu người cho vào hệ thống túi đôi (túi lấy máu và 1 túi chuyển), hoặc túi ba (túi lấy máu và 2 túi chuyển).

– Xếp các túi máu vào ống ly tâm. Cân bằng từng cặp ống ly tâm và đặt vào máy ly tâm ở các vị trí đối xứng. Ly tâm nhẹ ở 22°C. Nếu túi máu toàn phần đã để lắng 2 - 12 giờ thì không cần phải ly tâm.

– Đặt túi máu toàn phần đã ly tâm hoặc để lắng rõ thành hai lớp hồng cầu và huyết tương lên bàn ép huyết tương. Chú ý để mặt túi không dán nhãn quay ra ngoài. Tháo cần hãm lò xo nén tấm ép vào bề mặt túi máu.

– Mở thông dây nối túi máu toàn phần với túi chuyển bằng cách bẻ khoá ở đầu dây nối với túi máu toàn phần để huyết tương giàu bạch cầu, tiểu cầu chảy sang túi chuyển.

– Khoá dây nối túi máu chứa khối hồng cầu và túi chứa huyết tương bằng kẹp hoặc khoá nhựa khi mặt phân cách hồng cầu - huyết tương dâng lên sát thành trên túi máu.

– Ngừng ép bằng cách hạ cần hãm lò xo và tháo túi khối hồng cầu khỏi bàn ép.

– Bổ sung từ túi chuyển chứa dung dịch bảo quản hồng cầu (nếu có) hoặc từ bình chứa natri clorua 0,9% vào túi khối hồng cầu. Lượng dịch bổ sung 50 - 75 ml cho 1 đơn vị khối hồng cầu từ 250 ml máu toàn phần.

– Hàn dây nối giữa túi khối hồng cầu và túi huyết tương ở hai vị trí cách nhau 0,5 cm.

– Điền đầy đủ thông tin ở nhãn túi khối hồng cầu và túi huyết tương.

– Cắt rời dây nối ở giữa hai vị trí hàn

3.2. Tách bạch cầu bằng cách loại bỏ buffy coat

- Lấy máu người cho vào hệ thống túi ba (1 túi lấy máu và 2 túi chuyển), hoặc túi bốn (túi lấy máu và 3 túi chuyển). Trong hệ thống túi cần có 1 túi chuyển chứa dung dịch bảo quản hồng cầu.
- Xếp các túi máu vào ống ly tâm. Cân bằng từng cặp ống ly tâm và đặt vào máy ly tâm ở các vị trí đối xứng. Ly tâm mạnh ở 22°C.
- Đặt túi máu toàn phần đã ly tâm thành hai lớp hồng cầu và huyết tương lên bàn ép huyết tương. Chú ý để mặt túi không dán nhãn quay ra ngoài. Tháo cần hãm lò xo nên tẩm ép vào bề mặt túi máu.
- Mở thông dây nối túi máu toàn phần với túi chuyển bằng cách bẻ khoá ở đầu dây nối với túi máu toàn phần để huyết tương nghèo tế bào chảy sang túi chuyển.
- Khoá dây nối túi máu chứa khối hồng cầu và túi chứa huyết tương bằng kẹp hoặc khoá nhựa khi mặt phân cách hồng cầu - huyết tương dâng lên sát thành trên túi máu.
- Dùng kẹp ngoại khoa cánh dài luồn dưới mặt phân cách hồng cầu - huyết tương khoảng 1 cm.
- Siết kẹp đồng thời với việc:
 - + Hạ cần hãm lò xo,
 - + Nhấc túi máu khỏi bàn ép,
 - + Quay kẹp một góc 90°,
 - + Nối khoá nhựa mở thông dây nối túi máu và túi chuyển thứ 2.
 - + Để lớp buffy coat (gồm phần lớn bạch cầu, tiểu cầu, một phần nhỏ hồng cầu và huyết tương) chảy sang túi chuyển tương ứng.
- Dùng kẹp nhựa khoá dây nối túi máu và túi chuyển chứa buffy coat.
- Bổ sung từ túi chuyển chứa dung dịch bảo quản hồng cầu (nếu có) hoặc từ bình chứa natri chlorua 0,9% vào túi khối hồng cầu. Lượng dịch bổ sung 50 - 75 ml cho 1 đơn vị khối hồng cầu từ 250 ml máu toàn phần.
- Hàn dây nối giữa túi khối hồng cầu và túi huyết tương ở hai vị trí cách nhau 0,5 cm.
- Điền đầy đủ thông tin ở nhãn túi khối hồng cầu và túi huyết tương.
- Cắt rời dây nối ở giữa hai vị trí hàn

4. Bảo quản và cách dùng

- Bảo quản khối hồng cầu ở tủ lạnh nhiệt độ 2 - 6°C
- Thời gian bảo quản:
 - + Nếu có bổ sung dung dịch bảo quản hồng cầu trong hệ thống kín: thời gian bảo quản theo quy định của nhà sản xuất.

+ Nếu bổ sung dung dịch natri chlorua 0,9% hoặc bổ sung dung dịch bảo quản hồng cầu trong hệ thống hở: thời gian bảo quản là 24 giờ kể từ lúc điều chế.

- Sử dụng bộ dây có bầu lọc với đường kính lỗ lọc 170 - 200 μm để truyền. Có thể sử dụng bộ lọc vi ngưng tập với đường kính lỗ lọc 20 - 40 μm , hoặc bộ dây truyền kèm bộ lọc bạch cầu.

5. Chỉ định lâm sàng

Bệnh nhân thiếu hồng cầu cấp và mạn tính do nhiều nguyên nhân cần truyền máu nhiều lần và / hoặc có nguy cơ gặp các phản ứng sốt, ngứa, nổi mẩn, mề đay do bạch cầu.

6. Một số thông số tham khảo

Một đơn vị khối hồng cầu nghèo bạch cầu điều chế từ đơn vị máu toàn phần 250 ml có một số đặc tính sau:

- Thể tích khối hồng cầu: 190 ± 30 ml
- Hematocrit: $0,60 \pm 0,10$
- Số lượng bạch cầu: $\leq 0,67 \times 10^9$.
- Số lượng tiểu cầu: $\leq 10 \times 10^9$.

7. Lưu ý

- Ly tâm mạnh: Ly tâm với tốc độ cao và/hoặc thời gian dài nhằm làm lắng mọi loại tế bào. Điều chế khối hồng cầu từ đơn vị máu thể tích 250 ml, thông số tham khảo có thể là:

- + 5000 x g trong 5 phút.
- + 3000 x g trong 8 phút 30 giây

- Ly tâm nhẹ: Ly tâm với tốc độ thấp và/hoặc thời gian ngắn nhằm làm lắng một loại tế bào trong khi một hoặc nhiều tế bào khác chưa bị lắng. Điều chế khối hồng cầu từ đơn vị máu thể tích 250 ml, thông số tham khảo có thể là:

- + 2000 x g trong 3 phút.
- + 1000 x g trong 6 phút.

KỸ THUẬT ĐIỀU CHẾ KHỐI HỒNG CẦU RỬA

1. Nguyên tắc

Khối hồng cầu thu được sau khi loại bỏ hầu hết protein huyết tương bằng cách rửa hồng cầu nhiều lần với dung dịch muối đẳng trương natri clorua 0,9%.

2. Máy móc, dụng cụ, vật liệu

- Máu toàn phần hoặc khối hồng cầu.
- Bàn ép huyết tương
- Kim vuốt dây
- Kéo
- Kẹp hoặc khóa nhựa
- Máy hàn dây hoặc vòng nhôm hàn dây
- Máy ly tâm lạnh
- Cân đĩa thăng bằng
- Cân bàn hoặc cân lò xo
- Dung dịch natri clorua 0,9%

3. Quy trình thực hiện

- Điều chế khối hồng cầu: xem kỹ thuật điều chế khối hồng cầu.
- Nối dây vô trùng và bổ sung 150 - 200 ml dung dịch natri clorua 0,9% vào túi chứa khối hồng cầu, lắc đều.
- Xếp các túi máu vào ống ly tâm. Cân bằng từng cặp ống ly tâm và đặt vào máy ly tâm ở các vị trí đối xứng. Ly tâm mạnh ở 4°C.
- Lấy túi khối hồng cầu đã ly tâm khỏi máy ly tâm. Thực hiện nối vô trùng nối túi máu và bình chứa chất thải. Khoá dây nối tạm thời bằng khoá nhựa.
- Đặt túi khối hồng cầu lên bàn ép huyết tương. Chú ý để mặt túi không dán nhãn quay ra ngoài. Tháo cần hãm lò xo nén tấm ép vào bề mặt túi máu.
- Mở thông dây nối túi máu với bình chứa chất thải bằng cách mở khoá nhựa để nước trong trên chảy sang bình chứa chất thải.
- Khoá dây nối khi mặt phân cách hồng cầu dâng sát thành trên túi máu bằng khoá nhựa.
- Ngừng ép bằng cách hạ cần hãm lò xo và tháo túi khối hồng cầu khỏi bàn ép.
- Lặp lại các bước thêm 2 - 5 lần nữa.
- Nối dây vô trùng và bổ sung lần cuối 50 - 75 ml dung dịch natri clorua 0,9% vào túi chứa khối hồng cầu.
- Điền đầy đủ thông tin ở nhãn túi khối hồng cầu rửa.
- Hàn dây và cắt rời dây nối ở giữa hai vị trí hàn

4. Bảo quản và cách dùng

- Bảo quản khối hồng cầu rửa ở tủ lạnh nhiệt độ 2 - 6°C
- Thời gian bảo quản: Cần sử dụng sớm, bảo quản tối đa 24 giờ kể từ lúc điều chế.

– Sử dụng bộ dây có bầu lọc với đường kính lỗ lọc 170 - 200 μm để truyền. Có thể sử dụng bộ lọc vi ngưng tập với đường kính lỗ lọc 20 - 40 μm , hoặc bộ dây truyền kèm bộ lọc bạch cầu.

5. Chỉ định lâm sàng

- Các trường hợp thiếu hồng cầu cấp và mạn tính do các loại nguyên nhân ở bệnh nhân có miễn cảm với các protein huyết tương.
- Thiếu máu tan máu phụ thuộc bổ thể (thí dụ: bệnh đái huyết sắc tố kịch phát ban đêm).
- Chỉ định tuyệt đối ở bệnh nhân miễn cảm với IgA (có nguy cơ gây sốc phản vệ) ở người thiếu hụt IgA bẩm sinh.

6. Một số thông số tham khảo

Một đơn vị khối hồng cầu điều chế từ đơn vị máu toàn phần 250 ml có một số tính chất:

- Thể tích khối hồng cầu: 210 ± 30 ml
- Hematocrit: $0,60 \pm 0,10$
- Protein ngoài hồng cầu: $< 0,5$ g / đơn vị khối hồng cầu.

7. Lưu ý

- Ly tâm mạnh: Ly tâm với tốc độ cao và/hoặc thời gian dài nhằm làm lắng mọi loại tế bào. Điều chế khối hồng cầu rửa từ đơn vị máu 250 ml, thông số tham khảo có thể là:
 - + 5000 x g trong 5 - 6 phút.
 - + 3000 x g trong 8 phút 30 giây - 9 phút.
- Do nguy cơ nhiễm khuẩn cao nên chế phẩm cần được sử dụng càng sớm càng tốt.
- Không được bổ sung bất cứ dung dịch nào khác vào khối hồng cầu (trừ dung dịch bảo quản hồng cầu đã được chuẩn hoá).

KỸ THUẬT ĐIỀU CHẾ KHỐI TIỂU CẦU

1. Nguyên tắc

Khối tiểu cầu điều chế từ huyết tương giàu tiểu cầu hoặc từ buffy coat sau khi loại bỏ phần lớn hồng cầu, bạch cầu và huyết tương.

2. Máy móc, dụng cụ, vật liệu

- Máu toàn phần tươi (thời gian trong vòng 8 giờ kể từ lúc lấy máu) bảo quản ở nhiệt độ phòng ($22 - 24^{\circ}\text{C}$) trước khi tách tiểu cầu. Máu toàn phần được lấy trong hệ thống 3 hoặc 4 túi.

- Bàn ép huyết tương
- Kim vuốt dây
- Kéo
- Kẹp hoặc khóa nhựa
- Kẹp ruột ngoại khoa cánh dài 15 - 20 cm
- Máy hàn dây hoặc vòng nhôm hàn dây
- Máy ly tâm lạnh
- Cân đĩa thẳng bằng
- Cân bàn hoặc cân lò xo

3. Quy trình thực hiện: Theo hai phương pháp

3.1. Điều chế khối tiểu cầu từ huyết tương giàu bạch cầu, tiểu cầu

- Lấy máu người cho vào hệ thống túi 3 (túi lấy máu và 2 túi chuyển), hoặc túi 4 (túi lấy máu và 3 túi chuyển).
- Xếp các túi máu vào ống ly tâm. Cân bằng từng cặp ống ly tâm và đặt vào máy ly tâm ở các vị trí đối xứng. Ly tâm nhẹ ở 22°C.
- Đặt túi máu toàn phần đã ly tâm lên bàn ép huyết tương. Chú ý để mặt túi không dán nhãn quay ra ngoài. Tháo cần hãm lò xo nén tấm ép vào bề mặt túi máu.
- Mở thông dây nối túi máu toàn phần với túi chuyển thứ nhất bằng cách bẻ khoá ở đầu dây nối của túi máu toàn phần để huyết tương giàu bạch cầu, tiểu cầu chảy sang túi chuyển.
- Khoá dây nối túi máu chứa khối hồng cầu và túi chứa huyết tương giàu bạch cầu, tiểu cầu bằng kẹp hoặc khóa nhựa khi mặt phân cách hồng cầu - huyết tương dâng lên sát thành trên túi máu.
- Ngừng ép bằng cách hạ cần hãm lò xo và tháo túi khối hồng cầu khỏi bàn ép.
- Xử lý túi chứa khối hồng cầu như kỹ thuật điều chế khối hồng cầu.
- Hàn dây nối giữa túi khối hồng cầu và túi huyết tương giàu tiểu cầu, bạch cầu ở hai vị trí cách nhau 0,5 cm.
- Điện dây đủ thông tin ở nhãn túi khối hồng cầu và túi huyết tương giàu tiểu cầu, bạch cầu.
- Cắt rời dây nối ở giữa hai vị trí hàn
- Xếp các túi chứa huyết tương giàu tiểu cầu vào ống ly tâm. Cân bằng từng cặp ống ly tâm và đặt vào máy ly tâm ở các vị trí đối xứng. Ly tâm mạnh ở 22°C.
- Lấy nhẹ nhàng túi huyết tương giàu tiểu cầu, bạch cầu khỏi máy ly tâm và đặt lên bàn ép huyết tương.
- Tháo cần hãm lò xo nén tấm ép vào bề mặt túi máu.

- Mở khoá cho phần huyết tương trên nghèo tế bào chảy sang túi chuyển thứ hai.

- Khi lượng huyết tương trong túi còn 30 - 50 ml, ngừng ép bằng cách hạ cần hãm lò xo và tháo túi khỏi bàn ép.

- Điền đầy đủ thông tin ở nhãn túi khối tiểu cầu.

- Hàn dây nối giữa hai túi và cắt rời dây nối giữa hai vị trí hàn.

- Dùng các ngón tay hoặc vật mềm chà sát cận để tái huyền dịch tiểu cầu và để túi khối tiểu cầu 1 giờ không lắc trước khi truyền cho bệnh nhân hoặc bảo quản.

3.2. Điều chế khối tiểu cầu từ buffy coat

- Lấy máu người cho vào hệ thống túi 4 (túi lấy máu và 3 túi chuyển). Trong hệ thống túi cần có 1 túi chuyển chứa dung dịch bảo quản hồng cầu.

- Xếp các túi máu vào ống ly tâm. Cân bằng từng cặp ống ly tâm và đặt vào máy ly tâm ở các vị trí đối xứng. Ly tâm mạnh ở 22°C.

- Đặt túi máu toàn phần đã ly tâm thành hai lớp hồng cầu và huyết tương lên bàn ép huyết tương. Chú ý để mặt túi không dán nhãn quay ra ngoài. Tháo cần hãm lò xo nén tấm ép vào bề mặt túi máu.

- Mở thông dây nối túi máu toàn phần với túi chuyển bằng cách bẻ khoá ở đầu dây nối với túi máu toàn phần để huyết tương nghèo tế bào chảy sang túi chuyển thứ nhất.

- Khi mặt phân cách hồng cầu - huyết tương dâng lên cách thành trên túi máu khoảng 2,5 - 3 cm, khoá dây nối túi máu chứa khối hồng cầu và túi chứa huyết tương bằng kẹp hoặc khoá nhựa.

- Dùng kẹp ngoại khoa cánh dài luồn dưới mặt phân cách hồng cầu - huyết tương khoảng 0,5 - 1 cm.

- Siết kẹp đồng thời với việc:

- + Hạ cần hãm lò xo

- + Nhấc túi máu khỏi bàn ép

- + Quay kẹp một góc 90°

- + Nới khoá nhựa mở thông dây nối túi máu và túi chuyển thứ 2

- + Để lớp buffy coat (gồm phần lớn bạch cầu, tiểu cầu, một phần nhỏ hồng cầu và huyết tương) chảy sang túi chuyển.

- Dùng kẹp nhựa khoá dây nối túi máu và túi chuyển chứa buffy coat.

- Bổ sung từ túi chuyển chứa dung dịch bảo quản hồng cầu (nếu có) hoặc từ bình chứa natri clorua 0,9% vào túi khối hồng cầu như kỹ thuật điều chế khối hồng cầu.

- Hàn và cắt dây nối với túi khối hồng cầu và túi huyết tương.

- Điền đầy đủ thông tin ở nhãn túi khối hồng cầu, túi huyết tương và túi chứa buffy coat.

- Cắt rời các dây nối ở giữa hai vị trí hàn trong khi vẫn để túi chứa buffy coat còn nối với túi chuyển thứ 3.
- Xếp các túi chứa buffy coat vào ống ly tâm. Cân bằng từng cặp ống ly tâm và đặt vào máy ly tâm ở các vị trí đối xứng. Ly tâm nhẹ ở 22°C.
- Lấy nhẹ nhàng túi buffy coat khỏi máy ly tâm và đặt lên bàn ép huyết tương.
- Tháo cần hãm lò xo nén tấm ép vào bề mặt túi buffy coat.
- Mở khoá cho phần khối tiểu cầu chảy sang túi chuyển thứ 3.
- Khi cần hồng cầu dâng sát miệng túi, ngừng ép bằng cách hạ cần hãm lò xo và tháo túi khỏi bàn ép.
- Điền đầy đủ thông tin ở nhãn túi khối tiểu cầu.
- Hàn dây nối giữa hai túi và cắt rời dây nối giữa hai vị trí hàn.

4. Bảo quản và cách dùng

- Khối tiểu cầu điều chế trong hệ thống túi kín bảo quản ở 22°C có lactic trong 3 đến 7 ngày kể từ ngày lấy máu (thời gian tùy theo loại túi dẻo và loại máy lactic bảo quản tiểu cầu).
- Khối tiểu cầu điều chế trong hệ thống hở bảo quản ở 22°C trong 24 giờ kể từ lúc điều chế.
- Trước khi truyền cho bệnh nhân: các đơn vị khối tiểu cầu cần được pool lại đủ liều theo yêu cầu của điều trị lâm sàng. Số lượng đơn vị tiểu cầu cho 1 pool thay đổi tùy thuộc nhu cầu điều trị từng bệnh nhân cụ thể.
- Sử dụng bộ dây có bầu lọc với đường kính lỗ lọc 170 - 200 μm để truyền. Có thể truyền bằng dây truyền kèm bộ lọc bạch cầu.

5. Chỉ định lâm sàng

- Các trường hợp giảm tiểu cầu gây xuất huyết nguy hiểm gặp trong các bệnh leukemia cấp, suy tủy, Dengue xuất huyết...
- Các rối loạn đông máu có giảm tiểu cầu nặng.

6. Một số thông số tham khảo

Một đơn vị máu toàn phần 250 ml điều chế được 1 đơn vị khối tiểu cầu với một số đặc tính sau:

- Thể tích: 45 ± 15 ml
- Số lượng tiểu cầu: $\geq 3,0 \times 10^{10}$ / đv (nếu Pool $\geq 1,3 \times 10^{11}$)
- Số lượng bạch cầu: $\leq 0,1 \times 10^9$ trong 75% mẫu kiểm tra (nếu Pool $\leq 0,4 \times 10^9$).
- Số lượng hồng cầu: $\leq 2,2 \times 10^9$ trong 75% mẫu kiểm tra (nếu Pool $\leq 0,01 \times 10^{12}$).
- pH $\geq 6,5$

7. Lưu ý

– Ly tâm mạnh: Ly tâm với tốc độ cao và/hoặc thời gian dài nhằm làm lắng mọi loại tế bào. Điều chế buffy coat từ đơn vị máu thể tích 250 ml, thông số tham khảo có thể là:

- + 5000 x g trong 5 phút.
- + 3000 x g trong 8 phút 30 giây

– Ly tâm nhẹ: Ly tâm với tốc độ thấp và/hoặc thời gian ngắn nhằm làm lắng một loại tế bào trong khi một hoặc nhiều tế bào khác chưa bị lắng. Điều chế huyết tương giàu tiểu cầu từ đơn vị máu thể tích 250 ml, thông số tham khảo có thể là:

- + 2000 x g trong 3 phút.
- + 1000 x g trong 6 phút.

KỸ THUẬT ĐIỀU CHẾ HUYẾT TƯƠNG

1. Nguyên tắc

Huyết tương được tách khỏi các thành phẩm tế bào để bảo quản lạnh dài ngày.

2. Máy móc, dụng cụ, vật liệu

– Máu toàn phần được lấy một cách vô trùng vào bộ túi dẻo có gắn thêm một hoặc nhiều túi chuyển.

- Bàn ép huyết tương
- Kim vuốt dây
- Kéo
- Kẹp hoặc khóa nhựa
- Máy hàn dây hoặc vòng nhôm hàn dây
- Máy ly tâm lạnh
- Cân đĩa thăng bằng
- Cân bàn hoặc cân lò xo

3. Quy trình thực hiện

3.1. Điều chế huyết tương khi điều chế khối hồng cầu thông thường

Xem kỹ thuật điều chế khối hồng cầu

3.2. Điều chế huyết tương khi tách buffy coat

Xem kỹ thuật điều chế khối tiểu cầu (phần điều chế khối tiểu cầu từ buffy coat).

4. Bảo quản và cách dùng

- Ngay sau khi điều chế, huyết tương được đông lạnh và bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn - 18°C hoặc tốt nhất là dưới -35°C. Thời gian bảo quản là 24 tháng kể từ lúc điều chế.
- Huyết tương tươi: là huyết tương được điều chế trong vòng 8 giờ kể từ lúc lấy máu.
- Huyết tương tươi đông lạnh: là huyết tương tươi được điều chế và đông lạnh trong vòng 8 giờ kể từ lúc lấy máu và bảo quản đông lạnh trong vòng 12 tháng.
- Sau khi phá đông, huyết tương cần được truyền trong vòng 6 - 8 giờ.
- Sử dụng bộ dây có bầu lọc với đường kính lỗ lọc 170 - 200 µm để truyền.

5. Chỉ định lâm sàng

- Điều trị thay thế trong các hội chứng rối loạn đông máu bẩm sinh hoặc mắc phải có suy giảm các yếu tố đông máu. Huyết tương tươi và huyết tương tươi đông lạnh có thể dùng điều trị hemophilia A.
- Bỏng nặng
- Truyền nhiều khối hồng cầu trong mất máu cấp.
- Điều trị thay máu, thay huyết tương.

6. Một số thông số tham khảo

- Thể tích: 120 ± 15 ml
- Protein huyết tương: ≥ 50 g/l.

7. Lưu ý

- Phá đông huyết tương đông lạnh ở nhiệt độ 37°C trong bình cách thủy.
- Tránh đông lạnh và phá đông huyết tương nhiều lần.

KỸ THUẬT ĐIỀU CHẾ TỬA LẠNH GIÀU YẾU TỐ VIII

1. Nguyên tắc

Yếu tố VIII (yếu tố chống hemophilia A) có thể được điều chế từ huyết tương tươi bằng cách đông lạnh nhanh và phá đông chậm ở nhiệt độ thấp.

2. Máy móc, dụng cụ, vật liệu

- Huyết tương tươi đông lạnh (xem phần kỹ thuật điều chế huyết tương).
- Bàn ép huyết tương
- Kim vuốt dây

- Kéo
- Kẹp hoặc khóa nhựa
- Máy hàn dây hoặc vòng nhôm hàn dây
- Máy ly tâm lạnh
- Cân đĩa thẳng bằng
- Cân bàn hoặc cân lò xo

3. Quy trình thực hiện

1. Phá đông huyết tương ở 1 - 6°C trong bình cách thuỷ 45 - 90 phút hoặc trong tủ lạnh 15 - 18 giờ.

2. Khi huyết tương tan đông gần hoàn toàn và còn một số cục đá nhỏ, tủ lạnh hình thành dưới dạng các vẩn nhỏ như khói thuốc. Tách tủ có thể thực hiện tiếp tục bằng 1 trong 2 cách sau.

3. Tách tủ lạnh:

• *Cách 1:*

- Ly tâm mạnh túi huyết tương tươi phá đông ở nhiệt độ 5°C.
- Lấy túi huyết tương đặt lên bàn ép.
- Nối vô trùng túi huyết tương với 1 túi chuyển.
- Tháo cần hãm lò xo nén tấm ép vào bề mặt túi huyết tương. Phần huyết tương tan đông nổi phía trên được chảy sang túi chuyển, để lại tủ lạnh ở đáy túi.
- Giữ lại 10 - 15 ml huyết tương để hoà tan tủ lạnh.

• *Cách 2:*

- Treo túi huyết tương trên bàn ép
- Nối vô trùng túi huyết tương với 1 túi chuyển.
- Mở thông dây nối để huyết tương tan đông chảy sang túi chuyển. Các mẫu đá chưa tan nổi trên bề mặt có tác dụng như tấm lọc ngăn cản tủ lạnh trôi cùng huyết tương.
- Khoá dây nối khi phần lớn huyết tương chảy sang túi chuyển. Lượng huyết tương còn lại trong túi khoảng 10 - 15 ml.

4. Hoà tan tủ bằng cách để túi tủ trong bình cách thuỷ 37°C trong 1-5 phút

5. Pool tủ lạnh: Tùy theo yêu cầu điều trị, có thể pool từ 4 - 16 túi tủ thành một pool

6. Hàn dây nối của túi chứa pool tủ lạnh.

4. Bảo quản và cách dùng

- Ngay sau khi điều chế, tủ lạnh được đông lạnh và bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn -18°C hoặc tốt nhất là dưới -35°C. Thời gian bảo quản là 12 tháng kể từ lúc điều chế.

- Sử dụng bộ dây có bầu lọc với đường kính lỗ lọc 170 - 200 µm để truyền.

5. Chỉ định lâm sàng

- Điều trị thay thế trong bệnh hemophilia A, von Willebrand
- Điều trị bổ sung trong một số rối loạn đông máu như đông máu nội mạch rải rác, tiêu sợi huyết cấp.

6. Một số thông số tham khảo: Từ 1 đơn vị huyết tương 120 ml

- Thể tích: 10 ± 5 ml.
- Nồng độ yếu tố VIII: $\geq 2,5$ đv VIII/ ml tua

7. Lưu ý

- Ly tâm mạnh: Ly tâm với tốc độ cao và/hoặc thời gian dài nhằm làm lắng mọi loại tế bào và/hoặc các tua protein. Điều chế tua lạnh, thông số tham khảo có thể là:

- + 5000 x g trong 6 phút.
- + 3000 x g trong 9 - 10 phút.

- Tua lạnh hình thành trong quá trình phá đông chậm rất dễ hoà tan trở lại, do vậy cần thao tác nhẹ nhàng với túi huyết tương phá đông trước khi tách tua.

KỸ THUẬT LƯU TRỮ, BẢO QUẢN VÀ PHÂN PHỐI MÁU

1. Mở đầu

Lưu trữ máu là công đoạn cuối cùng, nó quyết định toàn bộ quá trình, công sức của một cơ sở truyền máu. Có lưu trữ máu và các chế phẩm máu tốt nếu có thể đảm bảo được chất lượng, hiệu quả sử dụng của máu và các chế phẩm từ máu.

2. Nguyên tắc

- Máu toàn phần hoặc chế phẩm máu phải được bảo quản trong những điều kiện quy định cho mỗi loại để đảm bảo được chất lượng của chúng qua quá trình bảo quản.
- Phải có phương pháp, hệ thống theo dõi, quản lý các đơn vị máu hoặc chế phẩm máu một cách quy củ, rõ ràng, chính xác để có thể tránh được nhầm lẫn, sai sót, luân chuyển một cách hợp lý nhất.

3. Kho máu

- Một gian phòng được sử dụng làm kho máu đòi hỏi một số yêu cầu sau:
- + Rộng rãi, sạch sẽ, thoáng mát, không khí lưu thông
- + Phải đầy đủ ánh sáng, nguồn điện phải thường xuyên ổn định

+ Hầu hết các phương tiện bảo quản máu và chế phẩm là các máy móc làm lạnh việc trao đổi nhiệt là rất lớn. Vì vậy nên trang bị các máy điều hoà nhiệt độ, để tránh tình trạng hoạt động quá tải của các máy móc đột xuất gây mất ổn định nhiệt độ bên trong mà hậu quả là gây hư hỏng các đơn vị máu hoặc chế phẩm đang được lưu giữ.

+ Là khu vực dành riêng cho nhân viên phụ trách công việc của ngũ kín đáo, hạn chế tối đa sự ra vào của những người không có trách nhiệm.

- Các máy móc trang thiết bị trong kho máu cần được giữ ở tư thế ổn định, vững chắc. Nên kê cách nhau và cách tường khoảng 40-50cm. Có nhãn ghi mục đích sử dụng của từng cái, có sổ sách theo dõi hoạt động của máy một cách đầy đủ.

4. Dụng cụ và trang thiết bị

- Tủ lạnh chuyên dụng, lưu trữ máu ở nhiệt độ 2-6°C
- Tủ lạnh -35°C
- Máy lách tiểu cầu +22°C
- Nếu cần thiết tùy từng cơ sở có thể có thêm:
- + Tủ ấm +20°C
- + Dụng cụ lạnh -150°C hoặc -196°C
- Hồ sơ sổ sách

5. Nhiệt độ và thời gian bảo quản máu toàn phần và chế phẩm máu

Ở đây chúng tôi chỉ xin trình bày một số nguyên tắc chủ yếu và với một số chế phẩm chính:

Tên	Nhiệt độ bảo quản	Thời gian bảo quản
1. Máu toàn phần		
- Bảo quản bằng ACD	2°C đến 6°C	21 ngày
- Bảo quản bằng CPD	2°C đến 6°C	21 ngày
- Bảo quản bằng CPDA ₁	2°C đến 6°C	35 ngày
2. Các loại khối tiểu cầu (trong máy lách liên tục)	20°C đến 24°C	3-5 ngày
3. Huyết tương tươi đông lạnh	≤ -30°C	12-24 tháng
	từ -25 đến -30°C	≤ 12 tháng
	từ -18 đến -25°C	≤ 6 tháng
Huyết tương tươi	2°C đến 6°C	< 24 giờ
4. Huyết tương đông lạnh đã tan đông	2°C đến 6°C	< 5 ngày
5. Huyết tương tách từ máu toàn phần	2°C đến 6°C	≤ 1 tháng
6. Cryo	≤ -30°C	12 đến 24 tháng
	-25 đến -30°C	≤ 12 tháng
	-18 đến -25°C	≤ 6 tháng

Lưu ý:

- Với các khối hồng cầu được sản xuất theo hệ thống kín vào có dung dịch bảo quản thì nhiệt độ và thời gian bảo quản tương tự như máu toàn phần.
- Với khối hồng cầu sản xuất theo hệ thống hở thì nên sử dụng ngay sau khi sản xuất.

6. Quy trình lưu trữ

Khi một đơn vị máu riêng lẻ hoặc một lô túi máu được đưa đến người kỹ thuật viên chịu trách nhiệm ở kho máu sẽ thực hiện qua các bước sau:

6.1. Nhập kho

Người chịu trách nhiệm cần phân loại ngay được các túi máu được đưa đến.

6.1.1. Máu vừa mới lấy về chưa làm xét nghiệm

- Kiểm tra số lượng đơn vị máu là bao nhiêu túi
- Kiểm tra các nội dung ghi trên nhãn túi có đầy đủ không
- + Họ tên hoặc số người cho
- + Số lượng ml máu trong túi
- + Họ tên người lấy máu
- Vì các đơn vị máu này còn liên quan đến nhiều vấn đề như xét nghiệm nhóm máu, xét nghiệm sàng lọc, máu huỷ, sử dụng trong sản xuất chế phẩm thành phẩm. Vì vậy nên vào một sổ riêng, ghi lại các nội dung ghi trên nhãn túi. Đồng thời cần thêm một số nội dung:

- + Ngày giờ lấy máu
- + Ngày giờ nhận máu
- + Nơi lấy máu
- + Ký nhận bàn giao giữa người mang đến và kho máu

– Cũng vì các lý do nêu trên mà các túi máu này phải được xếp vào một tủ lạnh bảo quản riêng (tốt nhất là có khoá) có ghi rõ chức năng đặc biệt của tủ lạnh này, ví dụ: “Máu chưa xét nghiệm - không được sử dụng”.

Người phụ trách cần có trách nhiệm nhắc nhở các bộ phận liên quan thực hiện sớm nhất nhiệm vụ của họ với các đơn vị máu này. Khi cần phải bàn giao cho họ, phải có giao nhận rõ ràng.

6.1.2. Máu huỷ

Cần nhập số liệu về các đơn vị máu này vào một sổ theo dõi riêng cùng với các nội dung nêu ở trên và nên bổ sung thêm:

- Lý do huỷ
- Kết quả xét nghiệm

– Phải ghi rõ ràng trên từng túi máu với bút màu để dễ nhận biết với nội dung “Máu huỷ, không sử dụng, lý do huỷ”.

– Các túi máu này nhất thiết phải để vào tủ lạnh riêng biệt, có ghi rõ nội dung “Máu huỷ, không sử dụng”, cần có khoá để đảm bảo an toàn.

– Với các túi máu đặc biệt có thể sử dụng cho mục đích khác (ví dụ huyết thanh viêm gan B dùng cho sản xuất...) cần tập trung thành từng nhóm tùy theo hướng sử dụng trong tủ này (nếu có điều kiện thì có thể xếp trong một tủ khác).

– Lưu ý: dù rất hiếm gặp song có thể có trường hợp máu hết hạn sử dụng, cũng xử lý theo các bước trên.

– Tổng kết báo cáo kết quả với người phụ trách cơ sở truyền máu hoặc những người khác có liên quan để làm sớm xử lý các túi máu theo quy định.

6.1.3. Máu đủ tiêu chuẩn, được lưu trữ cho sử dụng

Đây là phần chính trong công việc, đòi hỏi người chịu trách nhiệm đầu tư nhiều thời gian và chấp hành đúng các quy định.

– Phân loại

+ Phân loại theo nội dung bên trong túi máu: các đơn vị máu được đưa đến kho máu với nhiều nội dung khác nhau, người chịu trách nhiệm (thủ kho) cần sớm phân loại theo từng loại như máu toàn phần, khối hồng cầu, huyết tương, huyết tương đông lạnh thành từng lô riêng biệt, để tách biệt nhau.

+ Phân loại theo nhóm ABO: với mỗi loại trên cần tiếp tục phân thành từng nhóm A, B, O hoặc AB. Song song với việc phân loại cần kiểm tra về số lượng, kiểm tra các nội dung ghi theo yêu cầu trên nhãn túi có đầy đủ hay không, kiểm tra sự toàn vẹn của túi, lưu ý các thời hạn sử dụng hoặc đặc biệt các yêu cầu lưu trữ để có sự chuẩn bị cho các bước tiếp theo. Nếu không có vấn đề gì khác thường sẽ tiến hành ký nhận giữa người bàn giao và kho máu. Việc ký nhận cần tiến hành nghiêm chỉnh, có sổ sách riêng, theo từng loại máu hoặc từng chế phẩm với các nhóm máu của từng loại, đồng thời ghi rõ ngày tháng giao và nhận.

– Nhập sổ sách: để thuận lợi cho việc theo dõi, luân chuyển, cấp phát nên theo các yêu cầu sau:

+ Mỗi loại máu hoặc chế phẩm vào một sổ nhập riêng

+ Mỗi nhóm (A,B,O,AB) của từng loại theo một sổ riêng

+ Nội dung cần nhập:

Họ tên người cho hoặc số của túi máu

Tên của thành phần trong túi (có thể cần hoặc không)

Số lượng trong túi

Tên người lấy máu hoặc sản xuất

Tên người định nhóm máu

Nơi bàn giao

Ngày nhận

Hạn sử dụng

Các kết quả xét nghiệm sàng lọc

Ngày phát ra

Nơi nhận (nơi sử dụng)

Ký nhận giữa kho và nơi sử dụng

Cần lưu ý:

– Giai đoạn này cần tiến hành ngay khi nhập máu vào kho, thực hiện một cách nhanh chóng, khẩn trương để có thể đưa các đơn vị máu hoặc chế phẩm vào nơi bảo quản sớm nhất nhằm đảm bảo chất lượng của nó.

– Với các đơn vị máu nhận được từ các cơ sở truyền máu khác được coi là máu bỏ để sử dụng cũng thực hiện theo quy trình này.

– Sắp xếp: cần tiến hành ngay một cách liên tục với các giai đoạn trên vì máu hoặc chế phẩm chỉ đảm bảo được chất lượng khi được bảo quản theo đúng điều kiện được yêu cầu của nó.

+ Sắp xếp theo thứ tự thời gian, những túi mới để trong, túi lâu để ra ngoài

+ Các túi máu toàn phần cần đặt trên giá để túi được ở tư thế đứng có khoảng cách giữa các túi để đảm bảo lưu thông không khí và nhiệt độ.

+ Từng loại máu hoặc chế phẩm vào từng tủ lạnh hoặc từng ngăn riêng biệt

+ Từng loại máu hoặc chế phẩm lại xếp theo từng nhóm (ABO) hay từng ngăn hoặc từng dãy riêng biệt. Với từng nội dung, từng nhóm phải có nhãn in chữ to, rõ để dễ tìm, hoặc tìm được nhanh nhất tránh mở dụng cụ bảo quản quá lâu.

+ Sau mỗi lần nhập hoặc cấp phát cần luân chuyển thay đổi vị trí các túi theo nguyên tắc như trên.

Lưu ý:

– Phải thường xuyên kiểm tra hoạt động của máy móc trang thiết bị trong kho máu.

– Định kỳ làm vệ sinh trong và ngoài các trang thiết bị lưu trữ

– Tuyệt đối không để những thứ không phải là máu hoặc các chế phẩm máu vào trong các thiết bị này, ngay cả các sinh phẩm.

6.2. Phát và phân phối máu

– Mọi quá trình cấp phát phải có sự đồng ý của người phụ trách cơ sở truyền máu.

– Khi có yêu cầu linh máu trong và ngoài viện: người phụ trách kho máu cần kiểm tra phiếu yêu cầu về các nội dung:

- + Nơi lĩnh
 - + Họ tên bệnh nhân
 - + Nhóm máu bệnh nhân
 - + Nội dung xin lĩnh: máu toàn phần, khối hồng cầu
 - + Nhóm máu của thành phần xin lĩnh, số lượng
 - + Đơn vị yêu cầu: khoa, phòng, hoặc bệnh viện
 - + Chữ ký của người phụ trách đơn vị yêu cầu sử dụng
 - + Chữ ký của người phụ trách cơ sở truyền máu
 - Lựa chọn các đơn vị máu hoặc chế phẩm phát ra phù hợp với yêu cầu thành phần, nhóm máu, số lượng và thời hạn sử dụng (nếu có).
 - Kiểm tra chất lượng đơn vị máu được phát ra bằng mắt thường, phát hiện những biến đổi bất thường xuất hiện trong quá trình bảo quản. Chỉ phát ra những đơn vị có thể tin tưởng về chất lượng. Nếu có bất kỳ sự e ngại nào túi máu phải được giữ lại, báo với người phụ trách để có biện pháp kiểm tra xử lý kịp thời.
 - Đơn vị phát máu ra phải được ghi vào sổ của kho máu
 - + Ngày giờ phát máu
 - + Nơi nhận
 - + Ký nhận của người lĩnh
- Lưu ý:** Khi nơi nhận máu là cơ sở truyền máu của một bệnh viện khác khi đơn vị máu phát ra sẽ không qua bộ phận phát máu an toàn miễn dịch của đơn vị có kho máu thì cần:
- Người nhận máu phải là nhân viên y tế phòng truyền máu của bệnh viện đó.
 - Phải có phương tiện bảo quản vận chuyển theo quy định đảm bảo duy trì được nhiệt độ trong quá trình bảo quản tránh những tác động gây tổn thương túi máu hoặc ảnh hưởng chất lượng của thành phần trong túi máu.
 - Định lại nhóm máu bằng một phương pháp HTM để một lần cuối cùng hạn chế những sai sót dù rất hiếm khi xảy ra.
 - Kho máu sẽ giữ lại phiếu lĩnh máu của bệnh viện nhận máu

Ngoài các nhiệm vụ trên người phụ trách kho máu còn phải có trách nhiệm báo cáo theo quy định: số lượng máu, chế phẩm nhập vào và phát ra hàng ngày; hàng tháng; tình hình hoạt động của các trang thiết bị trong kho máu. Thống kê số lượng đơn vị máu huỷ với mọi nguyên nhân (hết hạn, biến đổi chất lượng, tổn thương túi máu do bảo quản hoặc tan đông...), định kỳ với người phụ trách.

Chương 8

MỘT SỐ VẤN ĐỀ CƠ BẢN TRONG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC - TRUYỀN MÁU

PHƯƠNG PHÁP LÀM SẠCH VÀ KHỬ TRÙNG DỤNG CỤ LÀM XÉT NGHIỆM

Độ chính xác của xét nghiệm phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó dụng cụ để làm xét nghiệm cũng là một yếu tố cần được quan tâm, đặc biệt là các dụng cụ bằng thủy tinh, bao gồm nhiều loại nhưng đều có đặc điểm chung:

- Trung tính.
- Khô sạch.
- Không nứt mẻ hoặc biến dạng.

Do đó rửa, sấy, hấp dụng cụ phải bảo đảm các yêu cầu trên, như vậy mới sử dụng lâu dài và không gây sai sót về kết quả.

1. Rửa lam kính và lá kính

1.1. Với lam kính và lá kính chưa dùng hoặc đã dùng cho bệnh phẩm không màu

- Rửa sạch bằng nước thường.
- Ngâm vào dung dịch sulfocromic trong 24 giờ.
- Rửa lại bằng nước thường thật sạch.
- Tráng lại bằng nước cất.
- Ngâm vào bocan thủy tinh đựng cồn 99°, đậy kín, khi dùng mới vớt ra.
- Lau khô bằng gạc hoặc vải mềm.
- Xếp vào tủ ẩm 56°C cho khô hoặc để khô tự nhiên, chú ý đậy để tránh bụi.

1.2. Với lam kính đã dùng có dính dấu hoặc phẩm nhuộm

- Ngâm vào nước xà phòng 24 giờ (cứ 100g xà phòng hoà trong 5lít nước).
Vớt ra lấy bàn chải hoặc chổi đuôi ngựa cọ sạch.
- Ngâm vào dung dịch sulfocromic hoặc NaOH trong 24 giờ.
- Rửa bằng nước thường 3,4 lần cho sạch.
- Tráng lại 1,2 lần bằng nước cất.

- Ngâm vào bocan thuỷ tinh đựng cồn 99°C, đậy kín, khi dùng mới vớt ra.
- Lau khô bằng gạc hoặc vải mềm.
- Xếp vào tủ ấm 56°C cho khô hoặc để khô tự nhiên (chú ý đậy tránh bụi).

2. Rửa các loại ống nghiệm

2.1. Ống nghiệm chưa dùng

- Dùng chổi đuôi ngựa rửa sạch bằng nước thường vài lần.
- Tráng lại bằng nước cất.
- Dốc hết nước trong ống ra xếp vào sọt nhôm có lỗ ở đáy.
- Để tủ ấm 56°C cho khô hoặc phơi khô tự nhiên (chú ý đậy tránh bụi).

2.2. Ống nghiệm đã dùng rồi

- Dùng chổi đuôi ngựa rửa sạch bằng nước thường vài lần.
- Rửa lại bằng xà phòng.
- Rửa lại bằng nước thường.
- Ngâm vào dung dịch sulfocromic hoặc NaOH trong 24 giờ.
- Rửa lại bằng nước thường.
- Tráng lại bằng nước cất.
- Dốc hết nước trong ống ra và xếp vào sọt nhôm có lỗ ở đáy.
- Để tủ ấm 56°C cho khô hoặc để khô tự nhiên.

3. Rửa các ống hút (potain) hồng cầu, bạch cầu, ống máu lắng, pipette huyết sắc tố

- Thổi bỏ hết hỗn dịch máu trong ống hút.
- Rửa vài lần bằng nước thường.
- Tráng lại bằng nước cất.
- Rửa bằng cồn 99°.
- Rửa bằng ether.
- Để tủ ấm 56° cho khô.

Một tuần ngâm dụng cụ một lần vào dung dịch sulfocromic trong 24 giờ.

- Rửa lại vài lần bằng nước thường.
- Tráng lại bằng nước cất.
- Rửa bằng cồn 99°.
- Rửa bằng ether.
- Để tủ ấm 56° cho khô.

4. Các loại buồng đếm

- Ngâm vào dung dịch sulfocromic 2-3 giờ.
- Rửa bằng nước thường vài lần.
- Tráng lại bằng nước cất.
- Lau sạch.
- Để trong hộp có lót gạc mềm hoặc giấy lọc.

PHA CÁC HOÁ CHẤT, DUNG DỊCH SỬ DỤNG TRONG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC

1. Cách thử nước cất trung tính để làm xét nghiệm

1.1. Thử bằng dung dịch đỏ trung tính

- Nước cất 100ml.
- Dung dịch đỏ trung tính 1% vài giọt.

Nếu nước acid sẽ có màu vàng chanh, nhỏ từng giọt natri bicarbonat 1% vào cho đến khi nước có màu hồng là nước trung tính.

Nếu nước kiềm sẽ có màu hồng, nhỏ từng giọt acid acetic 1% vào cho đến khi nước chuyển thành màu da cam là nước trung tính.

1.2. Thử bằng giấy đo pH

Cho vào cốc thuỷ tinh hoặc ống nghiệm lượng nước định thử. Lấy giấy đo pH nhúng vào nước trong 5 phút. Lấy giấy ra đem so sánh với màu chuẩn quy định, đọc kết quả.

Nếu màu giấy thử không đúng với màu chuẩn thì cho acid acetic 1% vào nếu nước kiềm hoặc natri bicarbonat 1% vào nếu nước acid. Lấy giấy thử lại cho đến khi đạt được màu quy định của pH trung tính.

1.3. Đo bằng pH met (pH kế)

- Cho mẫu nước định thử vào cốc, đặt vào máy pH kế.
- Bật nút điện quy định trong máy, để ổn định trong 5 phút.
- Kim pH kế sẽ chỉ cho biết nước định thử là kiềm, trung tính hay acid.
- Cho từ từ acid acetic 1% vào (nếu nước kiềm) hoặc natri bicarbonat vào (nếu nước acid), điều chỉnh đến khi máy pH chỉ nước đạt trị số trung tính.

2. Cách bảo quản và pha loãng cồn

2.1. Cách bảo quản cồn tuyệt đối

Muốn giữ được cồn tuyệt đối thì cứ 1000ml cồn cho thêm vào 50g kali carbonat hoặc 50g đồng sulfat khan, sẽ giữ được độ cồn để làm xét nghiệm.

2.2. Cách pha loãng cồn

2.2.1. Phương pháp Lowi

– Cho vào cốc nước chia độ số lượng mililit cồn dùng để pha loãng bằng số độ cồn định pha loãng.

– Cho thêm nước cất vào cho đến khi số mililit bằng số độ cồn đem pha loãng.

Thí dụ: Định pha cồn 95° thành cồn 60°:

– Cho vào cốc chia độ 60ml cồn 95°.

– Cho thêm nước cất vào cho đến khi dung dịch có thể tích = 95 ml thì được cồn 60°.

2.2.2. Phương pháp Gay-Lussac

Cồn định pha	Thể tích nước thêm vào 100 ml cồn 90°(ml)	Thể tích nước thêm vào 100 ml cồn 95°(ml)
85°	6	13
80°	14	21
75°	22	29
70°	31	39
65°	42	50
60°	54	65
55°	68	78
50°	85	96
45°	105	117
40°	131	144
35°	163	178
30°	206	224
25°	266	287
20°	352	382
15°	500	540
10°	605	655

3. Dung dịch chống đông

3.1. Dung dịch natri citrat 3,8%

- Natri citrat 3,8g
- Nước cất vừa đủ 100ml

3.2. Chống đông heparin

- Heparin 5000 đơn vị
- Nước cất 10ml

3.3. Dung dịch complexon

- Muối dipotassic của acid ethylen diamin tetra acetic (EDTA): 1,5g
- Nước cất vừa đủ : 100ml

3.4. Hỗn dịch amoni oxalat và kali oxalat

Để kiểm, rẽ tiền, ít làm thay đổi hình thái tế bào máu vì amoni oxalat làm nở tế bào còn kali oxalat làm co tế bào.

- Amoni oxalat 1,2g
- Kali oxalat 0,2g
- Nước cất 100ml

Dung dịch (3), (4): Pha xong lọc kỹ, dùng dần. Có thể làm thành dạng đông khô để khỏi làm ảnh hưởng đến thể tích máu. Cách làm: cho 0,1 ml dung dịch trên vào ống nghiệm tan máu, cho vào tủ ẩm 56° trong 6 giờ. Dung dịch khô đi. Có thể chống đông cho 1ml máu.

4. Cách pha Giemsa đậm đặc (Giemsa mẹ)

- Giemsa bột 0,75g
- Glycerin 35ml
- Cồn methylic 65ml

Cho Giemsa bột vào cối bằng sứ, cho từ từ glycerin vào và dùng chày bằng sứ nghiền thật mịn. Tiếp tục cho cồn vào hoà đều. Đựng dung dịch vào lọ màu, nút lọ thật kín. Bọc lọ bằng giấy đen hoặc để ở chỗ tối, ngày lắc 3 lần, trong 4 ngày liền. Giemsa mẹ để trên 6 tháng mới đem dùng là tốt nhất. Có thể thay bột Giemsa bằng bột Wright theo công thức:

- Wright bột 1,3g
- Glycerin 3ml
- Cồn methylic 97ml

5. Hỗn hợp sulfo-cromic ngâm dụng cụ và lam

- Potassium bicromat $K_2Cr_2O_7$ 100g
- Nước 1000ml

Quấy cho tan đều. Sau đó từ từ thêm vào: acid sulfuric nguyên chất H_2SO_4 100ml
Dung dịch phải đầy kín.

6. Dung dịch nhuộm hồng cầu lưới

6.1. Xanh cresyl trong cồn

- Xanh cresyl ánh 1g
- Cồn tuyệt đối 100ml

6.2. Xanh cresyl trong đệm muối citrat và clorua (OMS)

- Xanh cresyl ánh 1g
- Natri citrat 3% 20ml
- Natri clorua 9‰ 80ml

Lắc cho tan đều rồi lọc. Dùng trong 1 tháng

7. Dung dịch đếm số lượng hồng cầu

7.1. Dung dịch Hayem

- Natri clorua 1g
- Natri sulfat 5g
- Sublimat 1,5g
- Nước cất 200ml

7.2. Dung dịch Marciano

- Natri sulfat 50g
- Formol 40% 5ml
- Nước cất 1000ml

7.3. Dung dịch nước muối sinh lý

- NaCl 8,5 g
- Nước cất vừa đủ 1000ml

8. Dung dịch đếm số lượng bạch cầu

8.1. Dung dịch Lazarus

- Acid acetic 50ml
- Xanh methylen 1% 20 giọt
- Nước cất vừa đủ 1000ml

8.2. Dung dịch Hayem

- Acid acetic 5ml
- Xanh methylen 0,25g
- Nước cất vừa đủ 1000ml

8.3. Dung dịch xanh acetic

- Acid acetic 10ml
- Xanh Toludin 0,25% 10ml
- Nước cất vừa đủ 1000ml

9. Dung dịch đếm số lượng tiểu cầu

9.1. Dung dịch giữ nguyên cả hồng cầu và tiểu cầu

Dung dịch Marciano:

- | | |
|-------------------|--------|
| - Natri sulfat | 50g |
| - Formol 40% | 5ml |
| - Nước cất vừa đủ | 1000ml |

9.2. Dung dịch làm vỡ hồng cầu và giữ nguyên tiểu cầu

9.2.1. Dung dịch urê

- | | |
|-------------------|------|
| - Urê nguyên chất | 0,7g |
| - Nước muối 9‰ | 7ml |
| - Nước cất | 3ml |

9.2.2. Dung dịch cocain

- | | |
|--------------------|--------|
| - Cocain clohydrat | 30g |
| - Natri clorua | 2g |
| - Nước cất vừa đủ | 1000ml |

9.2.3. Dung dịch hỗn hợp

- | | | |
|-------------------------|-------------------|-------|
| - Dung dịch A giữ ở 4°C | Clohydrat procain | 24,3g |
| | Nước cất vừa đủ | 100ml |
| - Dung dịch B giữ ở 4°C | Clorua natri | 200g |
| | Nước cất vừa đủ | 100ml |

Trước khi dùng thì pha như sau:

- | | | |
|---------------|-----|--------------|
| - Dung dịch A | 1ml | Không để lâu |
| - Dung dịch B | 9ml | |

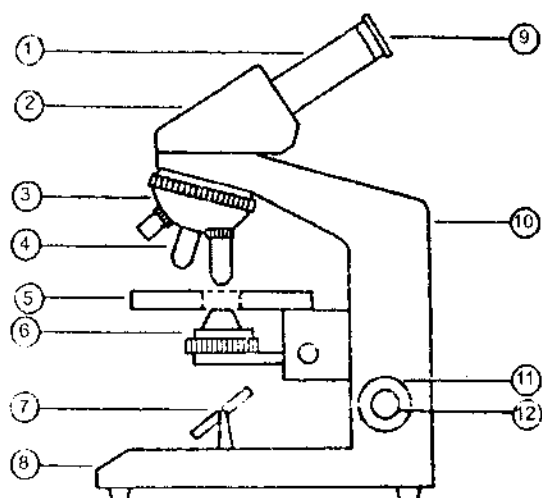
9.2.4. Dung dịch amonium oxalat 1% trong nước cất

Giữ ở nhiệt độ lạnh, trước khi dùng phải lọc.

CÁCH SỬ DỤNG VÀ BẢO QUẢN KÍNH HIỂN VI

Kính hiển vi là công cụ quan trọng ở mỗi phòng xét nghiệm huyết học. Nó có tác dụng phóng đại ảnh của vật cần soi bởi một hệ thống thấu kính, giúp cho ta quan sát vật được chi tiết hơn.

1. Cấu tạo (hình 8.1)



Hình 8.1: Các bộ phận của một kính hiển vi phức hợp điển hình

1. Ống trực chính
2. Thấu kính (lăng kính) đầu kính nghiêng
3. Mâm quay gắn vật kính
4. Vật kính
5. Mâm soi (mâm kính)
6. Tụ quang dưới mâm kính với màn chắn sáng
7. Gương
8. Đế (chân)
9. Thị kính
10. Tay cầm
11. Ốc đại cấp (điều chỉnh thô)
12. Ốc vi cấp (điều chỉnh tinh)

1.1. Ống trực chính: Có hai loại

- Loại có một ống trực chính mang một thị kính (kính một mắt)
- Loại có hai ống trực chính mang hai thị kính (kính hai mắt)

1.2. Đầu kính

Hình tròn hoặc đa giác. Trong đầu kính chứa các thấu kính hình lăng trụ tam giác, có tác dụng hắt ảnh của vật từ vật kính lên thị kính không bị đảo ngược.

1.3. Bàn xoay

Bàn xoay có thể xoay tròn 360° giúp cho thay đổi vật kính dễ dàng

Bàn xoay có 4 lỗ mang 4 loại vật kính khác nhau

1.4. Vật kính

Có tác dụng phóng đại ảnh của vật lên nhiều lần. Có nhiều loại vật kính với hệ số phóng đại khác nhau: x 4, x 6, x 8, x 10, x 17, x 40, x 100, nghĩa là các vật kính đó có thể phóng đại được 4 đến 100 lần. Vật kính có hệ số phóng đại 100 là vật kính dầu.

1.4.1. Vật kính có hệ số phóng đại nhỏ thì kích thước ngắn. Vật kính có hệ số phóng đại to: kích thước dài

1.4.2. Khoảng cách giữa vật kính với mặt phẳng (tiêu bản)

- Vật kính x 10 : khoảng cách xa = 15,98 mm
- Vật kính x 40 : khoảng cách gần = 4,31 mm
- Vật kính x 100 : khoảng cách rất gần = 1,81 mm

1.4.3. Cửa sổ ánh sáng và khả năng phân ly các loại vật kính

- Vật kính x 10: cửa sổ ánh sáng lớn, khả năng phân ly nhỏ, có khả năng nhìn hai vật xa nhau
- Vật kính x 40: khả năng phân ly tương đối lớn, có khả năng nhìn hai vật tương đối gần nhau
- Vật kính x 100: cửa sổ ánh sáng rất nhỏ, khả năng phân ly lớn, có khả năng nhìn được hai vật rất gần nhau. Do khả năng phân ly lớn, ánh sáng không tập trung nên khi sử dụng phải dùng ánh sáng tối đa và dầu soi để tăng độ chiết quang, nhìn vật rõ nét hơn

1.5. Mâm kính

Có tác dụng nâng đỡ mẫu vật (tiêu bản)

Trên mâm kính có:

- Một lỗ để cho ánh sáng đi từ gương qua tụ quang lên vật kính
- Một hệ thống kẹp giữ tiêu bản
- Một bộ phận di chuyển tiêu bản gọi là xa chuyển có tác dụng đưa tiêu bản lên xuống, sang phải hoặc sang trái
- Một bộ phận thước đo (duxich)

1.6. Tụ quang

Là hệ thống thấu kính có tác dụng tập trung, hội tụ ánh sáng lên vật định soi

- Nếu ở thấp thì ánh sáng nhỏ
- Nếu ở cao thì ánh sáng được tập trung cao

Tụ quang có gần hai bộ phận: lá chắn sáng và lọc sáng

- Lá chắn sáng là những lá nhựa xếp theo hình đồng tâm. Muốn ánh sáng mạnh thì mở chắn sáng. Muốn ánh sáng yếu thì đóng chắn sáng.
- Lọc sáng đặt dưới tụ quang, màu xanh, có tác dụng làm dịu ánh sáng khi soi kính.

1.7. Gương

Gương phẳng để lấy ánh sáng gần

Gương lõm để lấy ánh sáng xa hơn

Hiện nay nhiều kính sử dụng nguồn sáng là đèn đặt trong đế kính và có bộ phận điều chỉnh cường độ ánh sáng.

1.8. Đế kính

Giữ cho kính cố định

1.9. Thị kính

Cấu tạo bởi hệ thống thấu kính có tác dụng phóng đại. Thường là thị kính $\times 10$

1.10. Thân kính - tay cầm

Có tác dụng nâng đỡ ống kính và mâm kính. Trên thân kính có ốc đại cấp và ốc vi cấp có tác dụng điều chỉnh khoảng cách giữa vật kính và tiêu bản.

Khi sử dụng vật kính $\times 10$ điều chỉnh bằng ốc đại cấp

Khi sử dụng vật kính $\times 40, 100$ điều chỉnh ốc vi cấp

2. Cách sử dụng

2.1. Lấy ánh sáng

Có thể là ánh sáng thiên nhiên hoặc ánh sáng nhân tạo. Nếu ánh sáng thiên nhiên thì nên đặt kính ở gần cửa sổ hoặc cửa ra vào.

Muốn sử dụng ánh sáng thì sử dụng:

- Đóng hoặc mở chắn sáng
- Hạ hoặc nâng tụ quang
- Điều chỉnh gương phản chiếu hoặc đèn

2.2. Sử dụng vật kính

Lúc đầu xem khái quát thì dùng vật kính nhỏ và điều chỉnh bằng ốc đại cấp. Khi tìm được khoảng xem thích hợp thì chuyển sang vật kính dầu. Nhỏ một giọt dầu soi lên tiêu bản, sau đó vừa nhìn vào thị kính vừa điều chỉnh ốc vi cấp cho đến khi thấy rõ chi tiết định soi.

2.3. Sử dụng ốc đại cấp và ốc vi cấp

Dùng ốc đại cấp để điều chỉnh thô, dùng ốc vi cấp để điều chỉnh tinh. Dùng ốc đại cấp để điều chỉnh trước rồi mới dùng ốc vi cấp

2.4. Sử dụng lá chắn sáng và tụ quang

Khi soi bằng vật kính thường thì đóng lá chắn và hạ tụ quang. Khi soi bằng vật kính dầu để xem chi tiết thì mở lá chắn và nâng tụ quang.

3. Cách bảo quản

Phải làm hàng ngày một cách cẩn thận, tỉ mỉ

3.1. Trước khi soi

Dùng chổi lông quét hết bụi. Dùng vải mềm mịn không sổ lông hoặc giấy mềm đặc biệt lau sạch vật kính, thị kính, tụ quang, gương..Mặt trong của thị kính và vật kính thì phải dùng quả bóp thổi không khí vào và dùng chổi lông quét hết bụi.

3.2. Sau khi soi

- Hạ mâm kính
- Nhấc tiêu bản ra ngoài
- Lấy vải mềm lau sạch dầu ở vật kính rồi thấm ít xylen lau lại. Cuối cùng lau lại bằng vải mềm khác
- Hạ tụ quang
- Điều chỉnh các ốc về số 0
- Đưa kính về tư thế nghỉ
- Phủ kính bằng chụp vải sạch

3.3. Những điều cần tránh

- Lau các thấu kính bằng cồn
- Nhúng vật kính vào cồn, xylen sẽ làm bong các thấu kính
- Dùng giấy thường hay bông để lau kính
- Sờ tay vào mặt soi của vật kính
- Lau đế hoặc thấu kính hiển vi bằng dung môi hữu cơ (xylen, xăng)
- Lau mặt trong thấu kính(của thị kính, vật kính)bằng khăn hoặc giấy sẽ làm mất lớp phản chiếu
- Bỏ thị kính ra khỏi kính hiển vi mà không có nắp đậy
- Xếp kính hiển vi vào hộp gỗ đóng kín hoặc phủ kín bằng túi chất dẻo sẽ tạo thành buồng ẩm làm cho nấm mốc dễ phát triển.
- Di chuyển kính hiển vi bằng một tay

3.4. Chống các tác nhân bên ngoài

- *Chống chấn động khi vận chuyển:*

Kính hiển vi cũng như các máy móc quang học khác khi vận chuyển phải đựng trong hộp gỗ được bắt vít chặt, chèn kỹ bằng vải hoặc miếng đệm. Kính hiển vi phải để cố định, không nên di chuyển nhiều và tránh để ở nơi có nhiều chấn động.

- *Chống nóng và chống ăn mòn:*

Các hệ thống thấu kính, các đoạn tiếp xúc thường gắn bằng một loại nhựa đặc biệt, nếu để nơi nhiệt độ cao thì nhựa dễ chảy ra gây di lệch, giảm độ chính xác. Không để gần các chất acid hoặc kiềm mạnh. Không để ánh sáng mặt trời rọi thẳng vào kính.

- *Chống xước:* Khi lau chùi nên dùng quả bóp thổi không khí cho hết bụi, dùng chổi lông quét và vải mềm sạch hoặc giấy đặc biệt để lau, không dùng vải cứng hoặc giấy thường để lau để làm xước và mờ hệ thống quang học.

- *Chống ẩm:* để kính ở phòng khô ráo, có điều hoà nhiệt độ, có hút ẩm, nếu không có điều kiện phải bảo quản trong chụp bằng thuỷ tinh có chất hút ẩm thay hàng ngày.

- *Chống mốc:*

Không để kính ở nơi có độ ẩm cao vì dễ tạo điều kiện cho nấm mốc phát triển. Máy móc quang học chỉ chịu được độ ẩm không khí khoảng 65% nên để kính hiển vi trong phòng có điều hoà nhiệt độ và máy hút ẩm hoặc để trong tủ có bóng điện thấp sáng cả ngày đêm với nhiệt độ cao hơn nhiệt độ phòng khoảng 5°C. Nếu không có điện thì để kính ở chỗ râm, thoáng, gần vị trí có ánh sáng, đặt cạnh túi đựng silicagel có tác dụng hút ẩm. Silicagel khi còn tác dụng thì có màu xanh lơ, nếu chuyển sang màu hồng thì hết khả năng hấp thụ nước, lúc đó cho silicagel vào tủ sấy khô rồi dùng lại

- *Lau mốc*

Mốc thường phát triển từ ngoài vào giữa do các bào tử nấm rơi vào các khe. Muốn biết các hệ thống thấu kính có bị mốc hay không ta di chuyển (xoay) các thị kính hay vật kính, nếu vết mờ xoay theo thì đúng là mốc.

- Các phương tiện lau mốc:

- + Quả bóp cao su

- + Chổi lông mềm

- + Bông hút nước, vải mềm

- + Nước cất, xylene, cồn, ether

- + Tước nơ vít các cỡ, khoá mở chốt

- Lau chùi: trước khi lau người làm phải rửa tay sạch, lau tay khô, trải một miếng vải sạch để đựng các bộ phận tháo ra. Dùng nước cất lau qua một lần, lấy vải mềm lau khô, dùng xylene hoặc acetone lau lại, cuối cùng dùng ether lau cho thật khô.

Chú ý: Khi lau nên chọn ngày khô ráo, nếu vào ngày ẩm ướt sẽ gây mốc thêm. Di chuyển kính phải dùng hai tay, một tay đỡ đế kính, một tay cầm trụ (thân kính) hiển vi.

Chương 9

ĐẢM BẢO CHẤT LƯỢNG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC VÀ TRUYỀN MÁU

Cùng như các hoạt động khác, hoạt động truyền máu và xét nghiệm huyết học cũng có sản phẩm.

Sản phẩm của một hoạt động là kết quả cuối cùng do hoạt động đem lại. Đối với các hoạt động sản xuất thì sản phẩm có chất lượng có nghĩa là đáp ứng một cách tốt nhất mục đích sử dụng sản phẩm đó. Đối với công tác xét nghiệm huyết học thì sản phẩm là kết quả xét nghiệm. Chất lượng xét nghiệm được đảm bảo có nghĩa là kết quả phản ánh kịp thời, chính xác và rõ ràng các chỉ số huyết học ở bệnh nhân mà lâm sàng yêu cầu.

Công tác truyền máu được đảm bảo chất lượng có nghĩa là máu và thành phẩm truyền cho bệnh nhân đáp ứng tốt nhất yêu cầu điều trị và hạn chế đến mức thấp nhất các kết quả không mong muốn.

1. Một số khái niệm về đảm bảo chất lượng

1.1. Chính sách về chất lượng

Bất kỳ một hoạt động gì muốn có chất lượng phải có chính sách phù hợp, đó là chính sách quan tâm đến chất lượng. Chính sách có tác dụng chỉ đạo và định hướng ưu tiên đến chất lượng, chất lượng của sản phẩm còn có giá trị bảo vệ thương hiệu của cơ sở sản xuất.

1.2. Quản lý chất lượng hay hệ thống chất lượng

Bao gồm tất cả các hoạt động nhằm có sản phẩm đạt chất lượng tốt. Những hoạt động này được soạn thảo bằng văn bản gồm cả những quy định về quy trình và quá trình hoạt động. Việc xem xét chất lượng sản phẩm hay chất lượng kết quả xét nghiệm được coi là quan trọng dựa trên các hoạt động từ đầu tư, đào tạo... đến bố trí nhân lực.

1.3. Đảm bảo chất lượng

Những hoạt động kiểm tra, xem xét và đánh giá các quy trình, quá trình nhằm kết quả có chất lượng, tức là sản phẩm đáp ứng tốt mục đích sản xuất nó, bao gồm việc đề ra các biện pháp, các khâu để chất lượng của sản phẩm được coi là tốt nhất, hay phải có tiêu chuẩn rõ ràng về chất lượng của mỗi sản phẩm.

1.4. Kiểm tra chất lượng

Gồm các kiểm tra, đánh giá định kỳ hay đột xuất việc thực hiện quy trình, kiểm tra chất lượng của phương tiện sản xuất, của dụng cụ hay nguyên liệu cho đến sản phẩm. Bao gồm kiểm tra chất lượng nội bộ và đánh giá chất lượng từ ngoài.

1.4.1. Kiểm tra chất lượng nội bộ

Kiểm tra định kỳ có kế hoạch, có biện pháp và kiểm tra việc thực hiện kiểm tra. Kiểm tra trình độ nhân viên, kiểm tra thực hiện quy trình. Kiểm tra chất lượng sản phẩm (kiểm tra kết quả xét nghiệm, chất lượng máu hoặc phế phẩm) theo tiêu chuẩn đã quy định.

1.4.2. Đánh giá chất lượng từ ngoài

Sử dụng một trung tâm độc lập gửi mẫu xét nghiệm đến nhiều phòng xét nghiệm, sau đó thu thập kết quả và xử lý bằng thuật toán, để đánh giá chất lượng của các phòng xét nghiệm khác nhau. Hoặc một trung tâm bên ngoài đến các cơ sở sản xuất lấy sản phẩm ngẫu nhiên và phân tích chất lượng.

1.5. Ghi chép và thống kê

Việc ghi chép kết quả có tính khoa học, thống kê kết quả xét nghiệm hàng ngày, hàng tuần, hàng tháng cũng giúp phát hiện những sai sót có thể xảy ra.

1.6. Việc thanh tra, kiểm tra

Cũng là một hình thức để đảm bảo chất lượng xét nghiệm hoặc chất lượng sản phẩm máu qua đánh giá thực trạng tổ chức, đánh giá việc thực hiện các quy trình, quy định, kiểm tra sản phẩm tại chỗ.

1.7. Tự đánh giá lại

Là việc tự xem xét lại quá trình thực hiện hoặc xem xét lại từng khâu đã được tiến hành có trao đổi để phát hiện những khâu có thể sai sót.

Nói tóm lại, chất lượng của thành phần máu, hay thực tế hơn là kết quả của hoạt động truyền máu (bao gồm từ tuyển chọn, sàng lọc, thu gom máu, chiết tách, bảo quản và truyền máu lâm sàng) và kết quả của xét nghiệm cũng như một sản phẩm của một quá trình sản xuất phụ thuộc vào nhiều yếu tố: từ năng lực tổ chức và chính sách của toàn hệ thống đến chất lượng của nguyên liệu, loại quy trình kỹ thuật được áp dụng, chất lượng của trang bị, năng lực của nhân công... Do đó hoạt động để đảm bảo chất lượng bao gồm từ những hoạt động có tính vĩ mô đến việc thực hiện các biện pháp cụ thể cho quy trình cụ thể.

2. Đảm bảo chất lượng xét nghiệm huyết học

Mục tiêu của xét nghiệm là đáp ứng được yêu cầu lâm sàng. Do vậy công tác đảm bảo chất lượng xét nghiệm huyết học là thực hiện những việc cần thiết để đảm bảo kết quả kịp thời, có độ tin cậy cao. Trong công tác xét nghiệm huyết học có bốn hoạt động đảm bảo chất lượng.

2.1. Kiểm tra chất lượng nội bộ (nội kiểm tra)

Là các hoạt động của labo nhằm đảm bảo xét nghiệm có độ tin cậy.

- Kiểm tra độ xác thực: Ví dụ: sử dụng máu chuẩn (với máy đếm tế bào).

Kiểm tra độ lặp lại:

Ví dụ: + 1 mẫu được kiểm tra 2-3 lần (kiểm tra tính ổn định)

+ Ngày sau xét nghiệm lại các mẫu của ngày trước

- Kiểm tra phương tiện và sinh phẩm: ví dụ máy đo pH, máy li tâm, kính hiển vi, máy đếm tế bào tự động và sinh phẩm của máy...

- Kiểm tra bằng kỹ thuật khác.

Để tiến hành nội kiểm tra, người chịu trách nhiệm chất lượng xét nghiệm của labo phải nghiên cứu kỹ quy trình kỹ thuật, đặt ra các chế độ kiểm tra thường quy có tính định kỳ, đồng thời đề ra các biện pháp giải quyết các tình huống khác nhau. Nếu sử dụng các phương tiện xét nghiệm có quản lý bằng phần mềm, cần đặt ra trong chương trình các báo động cần thiết để nhắc việc nội kiểm tra.

Với các labo thông thường nhiều khi dễ bỏ qua công tác nội kiểm tra nên cần đặt ra một nguyên tắc, ví dụ người chịu trách nhiệm chất lượng xét nghiệm tế bào máu trước khi ký trả kết quả xét nghiệm phải ký vào tờ kết quả xét nghiệm lại các mẫu ngày trước, đồng thời khi xây dựng quy trình cho một ngày làm việc cần có mục tiêu kiểm tra chất lượng nội bộ.

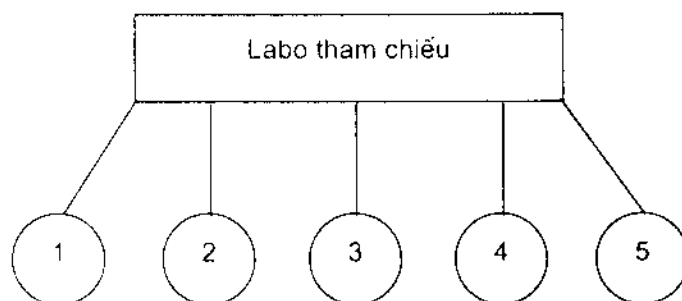
2.2. Đánh giá chất lượng từ ngoài

Có cơ quan chất lượng được thực hiện đúng quy chuẩn độc lập tổ chức kiểm tra định kỳ hoặc đột xuất bằng cách gửi mẫu xét nghiệm đến các labo trong hệ thống và thu thập, xử lý kết quả.

- Tác dụng của đánh giá chất lượng từ ngoài là thống nhất được hệ thống hay nói cách khác làm cho các phòng xét nghiệm khác nhau cùng đưa ra một kết quả tương tự đối với một mẫu nghiệm.

- Với hệ thống chất lượng xét nghiệm chặt chẽ, người ta yêu cầu các phòng xét nghiệm phải tham gia vào hệ thống đánh giá chất lượng.

Ví dụ:



Labo tham chiếu định kỳ gửi mẫu đến các labo 1, 2, 3, 4, 5 và sau đó thu thập kết quả, xử lý. Labo nào có kết quả tách rời xa các labo khác thì cần xem lại.

Các labo 1, 2, 3, 4, 5 chỉ được phép hoạt động nếu có giấy chứng nhận chất lượng định kỳ của labo tham chiếu.

2.3. Giám sát quy trình

Một phòng xét nghiệm hoạt động phải có các quy trình:

- Quy trình tổ chức, sắp xếp
- Quy trình đào tạo nhân lực
- Quy trình thực hiện công việc: từ sáng đến chiều, ai làm gì, ai chịu trách nhiệm
- Quy trình tiến hành kỹ thuật
- Quy trình lưu, ghi chép, trả kết quả.

* Việc kiểm tra thường xuyên xem có theo đúng quy trình này là điều cần thiết, cần có nhân viên kiểm tra thực hiện quy trình.

* Thường xuyên phải xem xét lại và bàn bạc khâu nào chưa thực sự tốt cần sửa chữa.

Quy trình tổ chức labo tạo một dây truyền (hay đường đi) của một xét nghiệm sao cho hợp lý, tiết kiệm nhân lực, tiết kiệm thời gian và tránh mọi nhầm lẫn, sai sót, quy trình sắp xếp nhân lực để đảm bảo kết quả xét nghiệm được thực hiện khách quan và được người có trách nhiệm kiểm tra, đánh giá.

Khi xây dựng quy trình tổ chức labo cần lưu ý tất cả các khâu từ địa điểm, hình thức, điều kiện nhận bệnh phẩm đến trả kết quả.

Quy trình đào tạo nhân lực: Đào tạo nhân lực phải được luôn chú ý, vừa để củng cố kiến thức chuyên sâu, vừa cập nhật các hiểu biết ứng dụng mới. Thường ở một phòng xét nghiệm có nhiều loại công việc từ đơn giản đến phức tạp. Cán bộ khi về nhận công tác được bố trí công việc và sẽ được đào tạo dần trong cả quá trình để thực hiện những công việc ngày càng cao.

Quy trình thực hiện công việc và quy trình tiến hành kỹ thuật có mối quan hệ rất chặt chẽ. Tuy nhiên, để thực hiện đúng kỹ thuật một khối lượng xét nghiệm lớn lại phải đáp ứng về mặt thời gian nên yêu cầu bố trí công việc khoa học để mọi lao động đều được tận dụng và có hiệu quả.

Khi xây dựng quy trình kỹ thuật xét nghiệm cần lưu ý đến các điều kiện liên quan như cách lấy bệnh phẩm, thời gian giữ bệnh phẩm tối đa, điều kiện vận chuyển, lưu giữ bệnh phẩm...

Sau khi có kết quả xét nghiệm, việc ghi chép sổ sách lưu theo mẫu thống nhất, khoa học để sao cho có thể kiểm tra đánh giá được. Người ta căn cứ kết quả từng thông số sau đó lập đồ thị. Nhiều khi dựa vào đồ thị có thể giúp nhận ra quy luật bệnh tật hay phát hiện sai sót trong xét nghiệm. Ví dụ máy đếm tế bào trong một thời gian dài cho thấy tất cả bệnh nhân đều có MCV (thể tích trung bình

hồng cầu) trên 100 fl. lúc đó nếu vẽ đồ thị cho thấy đồ thị đi lên và duy trì mãi ở độ cao đó hoặc càng ngày càng cao. Khi đó cần xem ngay lại chất lượng của xét nghiệm, chất lượng của máy đếm.

2.4. Tiêu chuẩn và chuẩn hoá

Là đặt ra các tiêu chuẩn của cán bộ, của trang bị, của kỹ thuật để tuân thủ.

Tiêu chuẩn và chuẩn hoá không phải giống nhau cho tất cả các labo mà tùy cấp, mức độ phục vụ.

Tuỳ điều kiện trang bị mà đặt ra tiêu chuẩn của labo cần đạt. Chuẩn hoá đặt ra yêu cầu rất cao, nhiều thông số được kiểm tra chặt chẽ. Tuy nhiên đã là labo huyết học dù ở mức độ nào cũng phải có các tiêu chuẩn chặt chẽ để đảm bảo kết quả xét nghiệm đạt độ tin cậy cần thiết.

Chuẩn hoá là dùng các phương pháp, quy trình, vật liệu đã biết, đã được đánh giá là tốt để áp dụng trong các labo.

Nhiều thông số đặt ra cho việc chuẩn hoá của labo xét nghiệm:

- Chuẩn tham chiếu: một chất, một thiết bị, một quy trình được gọi là chuẩn khi nó đáp ứng được những yêu cầu chặt chẽ về chất lượng, về độ tin cậy khi tính đến mọi yếu tố.

- Vật liệu tham gia: vật liệu đã được nhiều trung tâm nghiên cứu đánh giá phù hợp cho một xét nghiệm đặc thù dùng để làm chuẩn.

- Phương pháp tham chiếu: kỹ thuật được mô tả chính xác, rõ ràng cho một xét nghiệm cụ thể được hội đồng chuyên môn xem xét và xác nhận, phương pháp này dùng để đánh giá cả phương pháp labo khác. Phương pháp chuẩn quốc tế là phương pháp được thiết lập nhờ hội đồng khoa học quốc tế.

- Lựa chọn phương pháp xét nghiệm: dựa vào phương pháp chuẩn tham chiếu, căn cứ vào điều kiện kinh tế, trang bị, lao động để lựa chọn phương pháp sử dụng hàng ngày thích hợp vừa đảm bảo mức độ chính xác cần thiết vừa tính đến yếu tố tiết kiệm và khả thi. Ví dụ: phương pháp chuẩn để xét nghiệm thăm dò bệnh hemophilia là định lượng yếu tố VIII hay yếu tố IX bằng các kỹ thuật nhạy, trực tiếp. Một labo đông máu tuyến tỉnh có thể căn cứ vào điều kiện thực tế xét thấy xét nghiệm APTT là hợp lý, vừa kinh tế, có thể thực hiện được, lại không bỏ sót bệnh nhân dù không phải xét nghiệm khẳng định. Một labo tuyến huyện có thể phải chấp nhận sử dụng phương pháp xét nghiệm thời gian Howell.

- Nhiều thông số được chuẩn hoá khác như kit chẩn đoán, điều kiện chuẩn... Tất cả phải được tính đến để làm căn cứ cho các thông số cụ thể của labo chọn lựa sử dụng.

3. Một số biện pháp đảm bảo chất lượng trong truyền máu

3.1. Chu trình truyền máu

- Người cho máu: người cho khỏe mạnh, tự nguyện

- Tuyển chọn: khám, tư vấn người cho
- Lấy máu: kỹ thuật lấy, điều kiện và dụng cụ lấy máu
- Sàng lọc bệnh nhiễm trùng: các trang bị, kit và kỹ thuật được áp dụng
- Điều chế các thành phần máu
- Lưu trữ và phân phối
- Phát máu cho bệnh nhân và thực hành truyền máu lâm sàng

3.2. Yêu cầu của an toàn truyền máu

- Không làm lây bệnh
- Không gây phản ứng (miễn dịch và không miễn dịch)
- Không làm ảnh hưởng sức khỏe của người nhận máu, người cho máu và nhân viên truyền máu
- Có hiệu quả chữa bệnh.

3.3. Một số biện pháp đảm bảo chất lượng

3.3.1. Xây dựng và đảm bảo quy trình

Quy trình từ tuyển chọn người cho đến khám và lấy máu và phải được xây dựng và loại trừ các yếu tố nhằm có người cho hoàn toàn mạnh khỏe, lấy máu an toàn.

- Đối tượng cho máu: quản lý được người cho máu, chú ý lấy ở nhóm ít nguy cơ lây nhiễm bệnh truyền qua đường máu nhằm an toàn cho người nhận, người cho, nhân viên.
- Quy trình và thủ tục ghi chép: nhằm kiểm tra được sức khỏe người cho, quản lý được người cho, không nhầm lẫn máu người này với người khác nhưng vẫn đảm bảo thuận tiện, tránh phiền hà.
- Quy trình nhận máu vào kho, thủ tục giao - nhận.
- Quy trình sàng lọc: từ tổ chức thực hiện kỹ thuật đến quy trình đào tạo cán bộ, quy trình chọn kit, quy trình xử lý chất thải bỏ và trả, thông báo kết quả.
- Quy trình sản xuất để không bị lây nhiễm từ ngoài, không lẫn máu người này với máu khác, thành phần này với thành phần khác. Thành phần máu phải được sản xuất kịp thời, sản phẩm có các thông tin cần thiết.
- Quy trình lưu trữ, phát máu, quy trình truyền máu lâm sàng: làm việc gì trước, việc gì sau, khi lĩnh cần chú ý gì, khi phát cần yêu cầu gì, khi truyền máu phải theo quy trình đã được xem xét và thống nhất.

3.3.2. Áp dụng một số biện pháp tự kiểm tra

- Tự kiểm tra phương tiện, dụng cụ: cân, dụng cụ xét nghiệm, đặt kế hoạch kiểm tra định kỳ có sổ theo dõi.

- Tự kiểm tra kit xét nghiệm và máy.
- Tự kiểm tra định nhóm bằng áp dụng định nhóm hai phương pháp, hai nhân viên độc lập. Kiểm tra hàng ngày các sinh phẩm sử dụng về tính đặc hiệu, độ nhạy, có số, giấy theo dõi, có người chịu trách nhiệm ký tên.
- Kiểm tra máu, sản phẩm máu.

Khi công tác truyền máu có sử dụng hệ thống phần mềm quản lý, cần đặt các chế độ tự kiểm tra trong chương trình để làm sao khi có bất kỳ một sai sót nào sẽ có hệ thống báo động. Ví dụ, mã số của một đơn vị máu từ một người cho lại có hai nhóm khác nhau ở hai chế phẩm (ví dụ khối hồng cầu có nhóm A, huyết tương có nhóm B) thì sẽ có báo động xuất hiện.

3.3.3. Tham gia hệ thống chất lượng

- Hệ thống kiểm tra quy trình
- Hệ thống kiểm tra sản phẩm máu
- Hệ thống kiểm tra chất lượng sàng lọc.

Để có máu và chế phẩm máu đạt chất lượng tốt cần có một trung tâm hoạt động độc lập, có nhiệm vụ tổ chức đánh giá chất lượng của các trung tâm truyền máu trong toàn hệ thống.

Căn cứ vào quy trình, phương pháp chuẩn đã được xây dựng, hàng năm hay hàng quý theo định kỳ, trung tâm này đến xem xét việc áp dụng quy trình, phương pháp. Đồng thời hàng quý hay hàng tháng trung tâm này gửi các mẫu xét nghiệm ví dụ định nhóm khó, mẫu huyết thanh cần sàng lọc đã biết mật độ quang cụ thể (với kỹ thuật ELISA sàng lọc virus) tới các trung tâm truyền máu.

Sau khi nhận được kết quả, trung tâm chất lượng sẽ thông báo lại và đề xuất hướng điều chỉnh. Trường hợp nhiều lần có sai số hay sai số có hệ thống không thể điều chỉnh thì trung tâm chất lượng có thể yêu cầu các cơ quan chức năng đình chỉ hoạt động của trung tâm truyền máu này.

3.3.4. Áp dụng các tiêu chuẩn chất lượng: đặt tiêu chuẩn cụ thể (quy định của Nhà nước) đồng thời từng khu vực yêu cầu thêm.

3.3.5. Áp dụng kỹ thuật mới trong sàng lọc, phổ biến kiến thức (đào tạo) sử dụng máu.

Cần có kế hoạch đào tạo cụ thể, từ đơn giản đến phức tạp, để có đội ngũ cán bộ thành thạo vừa có tay nghề cao vừa có hiểu biết cần thiết để có thể xử lý ở mọi tình huống.

3.4. Tiêu chuẩn GMP (Good Manufacturing Practice)

Hiện nay trong lĩnh vực truyền máu người ta nhắc nhiều đến thực hiện tiêu chuẩn GMP. Vậy GMP là gì?

GMP (Good Manufacturing Practice) là mọi hoạt động trong cả dịch vụ nhằm có sản phẩm đạt được mục đích sản xuất ra nó (có thể gọi là quá trình thực hành tốt).

Mục đích của công tác truyền máu là hiệu quả chữa bệnh ở người bệnh. Muốn người bệnh dùng máu, chế phẩm máu đạt hiệu quả cao (nhận đúng cái mình cần và an toàn) thì phải có sự phối hợp của tất cả các hoạt động trong cả dây chuyền, các công tác từ quản lý chất lượng, kiểm tra chất lượng và tính thành thạo của cán bộ, đến việc tổ chức thực hiện, tổ chức đào tạo tuyển lựa nhân viên cũng như các can thiệp có tính kiểm tra chặt chẽ, của đường lối chính sách đầu tư phối hợp.

Không thể kiểm tra chất lượng hết các thông số cho tất cả các sản phẩm do vậy đánh giá một cơ sở sản xuất, một ngân hàng máu tốt là dựa vào việc cơ sở đó có đạt GMP hay không? Các trung tâm truyền máu lớn trên thế giới hiện nay đang cố gắng đạt GMP.

Chương 10

CÁC GIÁ TRỊ SINH HỌC VỀ HUYẾT HỌC VÀ MIỄN DỊCH HUYẾT HỌC

(Giai đoạn 1995 - 2005)

1. Kháng nguyên hệ hồng cầu

1.1. Kháng nguyên nhóm máu hệ ABO

Dân tộc	n	A (%)	B (%)	O (%)	AB (%)
Kinh	4025	21,14	28,34	45,08	5,44
Êđê	540	29,2	31,9	23,6	15,3
Dao	1122	30,60	21,21	41,71	6,42
Sán Dìu	619	26,60	28,10	37,31	7,90
Mông	683	33,70	13,6	48	4,7
Phương pháp		Ngưng kết, kháng thể đơn dòng của Sanofi (Pháp)			

1.2. Kháng nguyên hệ Rh (Kháng nguyên D)

Dân tộc	n	Kháng nguyên (%)	
		Kháng nguyên D ⁺	Kháng nguyên D
Kinh	1483	99,93	0,07
Sán Dìu	300	100	0
Mông	300	100	0
Tổng	2083	99,977	0,023
Phương pháp		Ngưng kết, kháng thể đơn dòng của Sanofi (Pháp)	

1.3. Các kháng nguyên (gen) hệ Rh

Dân tộc	n	Kháng nguyên (%)					
		D	d	C	c	E	e
Kinh	320	100	0	95,31	47,5	33,12	94,68
Phương pháp		Ngưng kết, kháng thể đơn dòng của Sanofi (Pháp)					

1.4. Tỷ lệ cặp gen hệ Rh

Dân tộc	n	Cặp kháng nguyên (%)					
		CC	cc	CC	EE	ee	Ee
Kinh	320	52,18	4,7	41,25	3,4	66,56	28,12
Phương pháp		Ngưng kết, kháng thể đơn dòng của Sanofi (Pháp)					

1.5. Kháng nguyên hệ Kell, hệ Duffy, hệ Kidd, hệ Ss

Hệ	Duffy (n=192)				Kidd (n=204)				Kell (n=181)			Ss (n=95)		
Kháng nguyên (%)	Fy (a+b-)	Fy (a+b+)	Fy (a-b+)	Fy (a-b-)	Jk (a+b-)	Jk (a+b+)	Jk (a-b+)	Jk (a-b-)	KK	Kk	kk	SS	Ss	ss
Kinh	86,46	11,74	0	1,8	18,77	2,63	41,61	36,99	0	0	100	1,2	8,4	80,4
Phương pháp	Ngưng kết, kháng thể đơn dòng của Sanofi (Pháp)													

2. Các giá trị sinh học về tế bào máu ngoại vi

2.1. Các thông số hồng cầu

Nhóm tuổi	Giới	n	Hồng cầu (T/l)	Huyết sắc tố - Hb (g/l)	Hematocrit- Hct (l/l)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/l)	Hồng cầu mạng (%)
2-6	Nam	234	4,88±0,38	126±10	0,38±0,02	79±5	25±2	332±18	
	Nữ	218	4,85±0,44	127±10	0,38±0,03	80±5	26±2	333±36	
7 - 17	Nam	399	4,78±0,44	128±10	0,388±0,029	81±6	26±2	332±5	
	Nữ	394	0,80±0,49	128±9	0,388±0,029	81±6	26±3	329±5	
18-59	Nam	4673	5,05±0,38	151±6	0,44±0,03	88±4	30±2	339±17	1,2±0,4
	Nữ	3035	4,66±0,36	135±5	0,41±0,03	87±4	29±2	336±15	1,7±7
60-80	Nam	38	4,43±0,36	141±13	0,41±0,03	91±5	31±1	347±10	1,0±0,5
	Nữ	36	4,38±0,26	132±8	0,37±0,02	88±4	30±1	343±6	1,3±0,4
Phương pháp		Máy đếm tế bào tự động Hycel (Pháp), Sysmex (Nhật)							Nhuộm xanh cresyl

MCV: Mean Cell Volume

(fl: Feltolit)

MCH: Mean Cell Hemoglobin

(pg: Picogam)

MCHC: Mean Cell Hemoglobin Concentration (g/l: gam/lít)

T/l: Tera/lít ($\times 10^{12}$ tế bào/lít)

G/l: Giga/lít ($\times 10^9$ tế bào/lít)

Hct: Hematocrit

Hb: Hemoglobin (HST)

2.2. Các thông số bạch cầu

Nhóm tuổi	Giới	n	Bạch cầu (G/l)	Bạch cầu trung tính (%)	Bạch cầu acid (%)	Bạch cầu mono (%)	Bạch cầu lympho
2-6	Nam	234	10,4±3,0	45,0±11,0			44,6±9,5
	Nữ	218	10,1±4,5	42,7±10,0			46,6±9,0
7 - 17	Nam	399	9,7±2,4	45,9±8,9			43,8±7,9
	Nữ	394	9,2±2,1	47,1±9,4			45,9±8,0
18-59	Nam	4945	8,0±2,0	57,4±8,4	3,2±2,6	3,8±0,5	35±7,2
	Nữ	3326	8,1±2,0	57,4±8,4	2,8±2,1	3,8±0,5	35,6±6,4
60-80	Nam	38	6,1±0,8	64,7±7,0	3,9±3,0	1,7±1,7	30,5±7,0
	Nữ	36	6,1±1,2	61,7±7,0	2,8±2,0	1,09±1,09	32,3±8,0
Phương pháp			Máy đếm tế bào tự động Hycel (Pháp), Sysmex (Nhật)	Kính hiển vi quang học			

2.3. Các thông số tiểu cầu

Nhóm tuổi	Giới	n	Số lượng tiểu cầu (G/l)	Độ ngưng tập tiểu cầu	
				ADP 10μmol (MA %)	Collagen 1mg/ml (MA %)
2-6	Nam	234	344 ± 91		
	Nữ	218	360 ± 98		
7 - 17	Nam	399	339 ± 101		
	Nữ	394	338 ± 103		
18-59	Nam	4945	263 ± 61	66,69 ± 6,25	65,97 ± 7,1
	Nữ	3326	274 ± 63	67,26 ± 6,8	65,06 ± 6,3
60-80	Nam	38	233 ± 48	67,0 ± 6,5	65,5 ± 6,7
	Nữ	36	267 ± 63		
Phương pháp			Máy đếm tế bào tự động Hycel (Pháp), Sysmex (Nhật)	Kính hiển vi quang học	

G/l : Giga/lít (10⁹/lít)

ADP : Adenosine diphosphate

MA : Maximum Agregation

3. Các giá trị sinh học về tế bào tủy người trưởng thành

3.1. Số lượng tế bào có nhân và tế bào gốc sinh máu CD₃₄₊

Thông số	n	$\bar{X} \pm SD$ (G/l)	Phương pháp
Tế bào có nhân tủy	79	57,36 ± 15,50	Miễn dịch huỳnh quang trực tiếp, kit simultest của Becton - Dickinson (Mỹ)
Tế bào gốc CD ₃₄₊ tủy	79	1,219 ± 0,798	

3.2. Các thông số dòng hồng cầu (n = 79)

Các thông số	$\bar{X} \pm SD$	
	%	Số lượng (G/l)
HC có nhân	19,14 $\pm$ 3,3	
Nguyên tiền HC	0,09 $\pm$ 0,11	
HC ưa base	2,4 $\pm$ 1,5	
HC đa sắc	6,4 $\pm$ 2,3	
HC ưa acid	10,7 $\pm$ 3,7	
HC lưới	1,25 $\pm$ 0,31	48,20 $\pm$ 13,67
HC trưởng thành		4,80 $\pm$ 0,50 (T/l)
Chỉ số trưởng thành dòng HC	0,37 $\pm$ 0,15	
Phương pháp	- Máy đếm tế bào tự động Hycl (Pháp), Sysmex (Nhật). - Kính hiển vi quang học.	

3.3. Các thông số bạch cầu (n=79)

Các thông số	$\bar{X} \pm SD$	
	%	Số lượng (G/l)
BC hạt	59,2 $\pm$ 7,5	30,99 $\pm$ 10,16
Lympho	17,4 $\pm$ 7,6	9,97 $\pm$ 3,51
Mono	0,76 $\pm$ 0,71	0,44 $\pm$ 0,44
Phương pháp	- Máy đếm tế bào tự động Hycl (Pháp), Sysmex (Nhật). - Kính hiển vi quang học.	

3.4. Các thông số bạch cầu hạt (n=79)

Các thông số	$\bar{X} \pm SD$	
	%	Số lượng (G/l)
Nguyên tuỷ bào	0,69 $\pm$ 0,69	0,79 $\pm$ 0,79
Tiền tuỷ bào	0,82 $\pm$ 0,82	0,76 $\pm$ 0,75
Tuỷ bào trung tính	5,6 $\pm$ 2,7	4,07 $\pm$ 3,49
Hậu tuỷ bào trung tính	8,1 $\pm$ 3,6	5,29 $\pm$ 3,70
Đũa trung tính	8,5 $\pm$ 3,7	5,53 $\pm$ 3,30
Đoạn ưa acid	2,2 $\pm$ 1,5	1,66 $\pm$ 1,47
Đoạn trung tính	33,2 $\pm$ 8,5	22,03 $\pm$ 14,85
Chỉ số trưởng thành	0,17 $\pm$ 0,13	
Phương pháp	- Máy đếm tế bào tự động Hycl (Pháp), Sysmex (Nhật). - Kính hiển vi quang học.	

3.5. Các dưới nhóm lympho (n=79)

Các thông số	%	Số lượng (G/l)	Phương pháp
Lympho B (CD19)	23,8 ± 8,97	2,131 ± 0,697	Miễn dịch huỳnh quang trực tiếp, kit simultest của Becton- Dickinson (Mỹ), kính hiển vi huỳnh quang.
Tế bào NK (CD16 + CD 56)	11,86 ± 4,03	1,366 ± 0,528	
Lympho T (T CD ₃)	58,7 ± 11,33	6,619 ± 3,590	Miễn dịch huỳnh quang trực tiếp, kit simultest của Becton-Diackinson (Mỹ), máy FACS count.
T CD ₄	23,82 ± 9,3	2,451 ± 1,261	
T CD ₈	31,18 ± 9,14	3,606 ± 1,972	
CD ₄ /CD ₈	0,71 ± 0,22		

3.6. Các thông số dòng mẫu tiểu cầu (n=79)

Các thông số	% MTC	Phương pháp
Nguyên MTC	0,72 ± 0,69	Kính hiển vi quang học
MTC ưa base	9,26 ± 4,51	
MTC có hạt chưa sinh tiểu cầu	45,91 ± 7,73	
MTC có hạt đang sinh tiểu cầu	30,37 ± 9,45	
MTC nhân trơ	13,62 ± 6,55	

4. Tế bào gốc sinh máu có dấu ấn CD₃₄⁺ (Hemopoietic Stem Cell)

Mẫu xét nghiệm	n	Giá trị CD ₃₄ ⁺ (G/l)	Phương pháp
Máu ngoại vi	63	0,22 ± 0,07	Miễn dịch huỳnh quang trực tiếp, kit simultest của Becton - Dickinson, kính hiển vi huỳnh quang
Máu dây rốn trẻ sơ sinh	50	0,24 ± 0,13	
Tủy xương	79	1,219 ± 0,798	

5. Tốc độ máu lắng, thời gian máu chảy, thời gian máu đông

5.1. Thông số tốc độ máu lắng người trưởng thành (n=520)

Giới	Pachenkow (mm/giờ)		Westergreen (mm/giờ)	
	Giờ thứ nhất	Giờ thứ hai	Giờ thứ nhất	Giờ thứ hai
Nam	4,7 ± 3,22	16,73 ± 5,31	3,05 ± 2,26	15,41 ± 9,33
Nữ	7,35 ± 3,94	19,86 ± 15,00	6,12 ± 5,25	19,51 ± 14,67

5.2. Thông số thời gian máu chảy, máu đông (n=130)

Thông số	Giá trị	Phương pháp
Thời gian máu chảy	3 phút 30 giây	Duke
Thời gian máu đông	6 phút - 9 phút 30 giây	Lee - White

6. Các thông số protein huyết tương

6.1. Protein, albumin, globulin và tỷ lệ A/G trong huyết thanh

Thông số	Đơn vị đo	Lứa tuổi	Giới	n	$\bar{X} \pm SD$	Kỹ thuật
Protein	g/l	Người trưởng thành	Nam	225	73,10 $\pm$ 6,06	Phương pháp Biure sử dụng kit của Boehringer-Mannheim trên máy 4010
			Nữ	189	74,33 $\pm$ 4,82	
Albumin	g/l	Người trưởng thành	Nam	36	56,67 $\pm$ 5,28	Vert Bromocresol pH 4,2 trên máy Hitachi 704
			Nữ	38	53,72 $\pm$ 4,26	
Albumin	g/l	2-5	Chung	92	44,21 $\pm$ 2,58	Vert Bromocresol
		6-10	Chung	169	45,85 $\pm$ 3,49	
		11-15	Chung	112	47,27 $\pm$ 3,41	
Globulin	g/l	2-5	Chung	92	30,87 $\pm$ 3,38	
		6-10	Chung	169	31,64 $\pm$ 4,03	
		11-15	Chung	112	33,45 $\pm$ 3,55	
Tỷ lệ A/G		2-5	Chung	92	1,45 $\pm$ 0,21	Tính tỷ lệ
		6-10	Chung	169	1,48 $\pm$ 0,30	
		11-15	Chung	112	1,43 $\pm$ 0,19	

6.2. Điện di protein huyết thanh

Thành phần protein	Đơn vị đo	Lứa tuổi	Giới	n	$\bar{X} \pm SD$	Kỹ thuật
Albumin %	%	Người trưởng thành	Chung	52	56,3 $\pm$ 3,52	Điện di trên acetat cellulose
Globulin α 1%	%	Người trưởng thành	Chung	52	2,5 $\pm$ 0,52	
Globulin α 2%	%	Người trưởng thành	Chung	52	8,83 $\pm$ 1,34	
Globulin β %	%	Người trưởng thành	Chung	52	11,6 $\pm$ 1,22	
Globulin γ %	%	Người trưởng thành	Chung	52	20,6 $\pm$ 2,82	
A/G	%	Người trưởng thành	Chung	52	1,31 $\pm$ 0,99	

7. Các thông số miễn dịch

7.1. Cytokin

Thông số đo	Đơn vị đo	n	$\bar{X} \pm SD$	Kỹ thuật
TNF α	pg/ml	34	19,5 $\pm$ 11,3	ELISA (kit CLB club) (chuẩn WHO: 11,7 pg/ml)
IL1 β	pg/ml	34	27,4 $\pm$ 15,2	ELISA (kit CLB club)
IL6	pg/ml	34	36,0 $\pm$ 22,2	ELISA (kit CLB club)
TNF α	ng/ml	30	0,13 $\pm$ 0,14	RIA, kit IMK-480 (CIAE)
MIF (yếu tố ức chế di tản bạch cầu)	Chỉ số di tản (MI)	30	63,2% $\pm$ 6,9%	George B và Clausen M. (1974) thử với Con-A của hãng Welcone - UK)
NPT (neopterin)	nmol/l	30	6,70 $\pm$ 2,50	ELISA; kit Henning Berlin GmBH

7.2. Nồng độ globulin miễn dịch trong huyết thanh

7.2.1. IgG (mg %)

Nhóm tuổi	n	$\bar{X} \pm SD$	CI 95%	Kỹ thuật
Người trưởng thành	223	1368 $\pm$ 93	1355,8 - 1380,2	Khuếch tán trong thạch: Mancini
Người trưởng thành	56	1780 $\pm$ 202	1745,9 - 1814,1	Khuếch tán trong thạch: Mancini
	60	1707 $\pm$ 247	1668,9 - 1745,1	Đo độ đục miễn dịch
5 - 10 tuổi	30	1549 $\pm$ 392	1432,4 - 1665,6	Khuếch tán trong thạch: Mancini

7.2.2. IgA (mg %)

Nhóm tuổi	n	$\bar{X} \pm SD$	CI 95%	Kỹ thuật
Người trưởng thành	223	326 $\pm$ 11	324,6 - 327,4	Khuếch tán trong thạch: Mancini
Người trưởng thành	56	363 $\pm$ 30	357,9 - 368,1	Khuếch tán trong thạch: Mancini
	60	263 $\pm$ 65	253,0 - 273,0	Đo độ đục miễn dịch
5 - 10 tuổi	30	323 $\pm$ 49	308,4 - 337,6	Khuếch tán trong thạch: Mancini

7.2.3. IgM (mg %)

Nhóm tuổi	n	$\bar{X} \pm SD$	CI 95%	Kỹ thuật
Người trưởng thành	223	93 $\pm$ 17	90,8 - 95,2	Khuếch tán trong thạch: Mancini
Người trưởng thành	56	238 $\pm$ 48	229,9 - 246,1	Khuếch tán trong thạch: Mancini
	60	277 $\pm$ 88	263,4 - 290,6	Đo độ đục miễn dịch
5 - 10 tuổi	30	172 $\pm$ 43	159,2 - 184,8	Khuếch tán trong thạch: Mancini

7.2.4. IgE (ng/ml)

Nhóm tuổi	n	$\bar{X} \pm SD$	CI 95%	Kỹ thuật
Người trưởng thành	62	435 $\pm$ 171	409,8 - 460,2	ELISA

7.3. Nồng độ thành phần bổ thể C₃, C₄ và yếu tố B

Thông số đo	n	$\bar{X} \pm SD$	Kỹ thuật
Hoạt tính bổ thể toàn phần	43	114,0 $\pm$ 10,0	Teresoi Aguado M CH50/1ml
Hoạt tính C ₃	43	105,0 $\pm$ 19,0	Mancini (mg/dl)
Hoạt tính yếu tố B	38	629,0 $\pm$ 113,0	Teresoi Aguado M CH50/1ml

7.4. Các tế bào có thẩm quyền miễn dịch

7.4.1. TCD_3 (tế bào/ μ l)

Nhóm tuổi	Giới	n	$\bar{X} \pm SD$	Kỹ thuật
18 - 55	Nam	47	1571,0 $\pm$ 350,0	FACS count
	Nữ	46	1685,0 $\pm$ 261,0	
19 - 25	Chung	40	1644,77 $\pm$ 306,25	
60 - 85	Nam	25	1282,0 $\pm$ 415,0	
	Nữ	26	1381,0 $\pm$ 285,0	
19 - 25	Chung	120	2007,35 $\pm$ 662,97	Miễn dịch huỳnh quang trực tiếp
19 - 25	Nam	34	1176 $\pm$ 479	Miễn dịch huỳnh quang gián tiếp

7.4.2. TCD_4 (tế bào/ μ l)

Nhóm tuổi	Giới	n	$\bar{X} \pm SD$	Kỹ thuật
18 - 55	Nam	47	746,0 $\pm$ 171,0	FACS count
	Nữ	46	839,0 $\pm$ 158,0	
19 - 25	Chung	40	781,87 $\pm$ 176,45	
60 - 85	Nam	25	643,0 $\pm$ 199,0	
	Nữ	26	774,0 $\pm$ 176,0	
19 - 25	Chung	120	1023,08 $\pm$ 384,79	Miễn dịch huỳnh quang trực tiếp
19 - 25	Chung	20	1247,30 $\pm$ 434,76	Miễn dịch huỳnh quang gián tiếp

7.4.3. TCD_8 (tế bào/ μ l)

Nhóm tuổi	Giới	n	$\bar{X} \pm SD$	Kỹ thuật
18 - 55	Nam	47	636,0 $\pm$ 173,0	FACS count
	Nữ	46	698,0 $\pm$ 173,0	
19 - 25	Chung	40	681,9 $\pm$ 175,5	
60 - 85	Nam	25	601,0 $\pm$ 220,0	
	Nữ	26	516,0 $\pm$ 163,0	
19 - 25	Chung	120	862,27 $\pm$ 306,77	Miễn dịch huỳnh quang trực tiếp
19 - 25	Chung	20	1172,7 $\pm$ 357,5	Miễn dịch huỳnh quang gián tiếp

7.4.4. TCD_4/TCD_8

Nhóm tuổi	Giới	n	$\bar{X} \pm SD$	Kỹ thuật
18 - 55	Nam	47	$1,12 \pm 0,26$	FACS count
	Nữ	46	$1,25 \pm 0,25$	
19 - 25	Chung	40	$1,2 \pm 0,34$	
60 - 85	Nam	25	$1,36 \pm 0,57$	
	Nữ	26	$1,61 \pm 0,52$	
19 - 25	Chung	120	$1,25 \pm 0,45$	Miễn dịch huỳnh quang trực tiếp
19 - 25	Chung	20	$1,08 \pm 0,24$	Miễn dịch huỳnh quang gián tiếp

7.4.5. BCD_{19} (tế bào/ μl)

Giới	n	$\bar{X} \pm SD$	Kỹ thuật
Chung	120	$419,02 \pm 206,99$	Miễn dịch huỳnh quang trực tiếp

PHIẾU XÉT NGHIỆM

TẾ BÀO MÁU NGOẠI VI

MS: 32/BV-99

Số:

n: Nam

Thường ☐

Cấp cứu ☐

Số:

Họ tên người bệnh: Tuổi: Nam/Nữ

Địa chỉ: Số BHYT

Số giường: Buồng: Khoa:

Chẩn đoán:

Chỉ số	Số lượng	Kết quả	Chỉ số	Kết quả
☐ Số lượng HC - n - nữ	4,2-5,4 T/l 4,0-4,9 T/l		☐ Số lượng BC (5-10 G/l)	
☐ Huyết sắc tố - n - nữ	130-160 g/l 125-142 g/l		☐ Thành phần bạch cầu (%) - Tế bào máu bất thường	
☐ Hematocrit - n - nữ	0,40-0,47 l/l 0,37-0,42 l/l		+ Nguyên tủy bào + Tiên tủy bào	
☐ MCV	85-95 fl		+ Tủy bào	
☐ MCH	28-32 pg		+ Hậu tủy bào	
☐ MCHC	320-360		- Bạch cầu dứa	
☐ Hồng cầu có nhân (G/l)			- Đoạn trung tính	
☐ Hồng cầu lưới	0,5-1,5%		- Đoạn ưa acid	
☐ Số lượng tiểu cầu	150-500 G/l		- Đoạn ưa base	
☐ Máu lắng - 1h - 2h - Chỉ số IK (≤ 15)			- Monocyt - Lymphocyt	

Nhận xét:

.....
.....
.....
.....

.....giờ.....ngày.....tháng.....năm 200...

.....giờ.....ngày.....tháng.....năm 200...

BÁC SĨ ĐIỀU TRỊ

TRƯỞNG KHOA XÉT NGHIỆM

Họ tên:

Họ tên:

PHIẾU XÉT NGHIỆM

HUYẾT - TUỖ ĐỒ

MS: 33/BV-99

Số:

n: Nam

Số:

Họ tên người bệnh: Tuổi: Nam/Nữ

Địa chỉ: Số BHYT

Số giường: Buồng: Khoa:

Tóm tắt quá trình bệnh lý, chứng thực thể (gan, lách, hạch)

Chẩn đoán lâm sàng:

Yêu cầu xét nghiệm:

Làm xét nghiệm: ...giờ...ngày...tháng...năm 200... Ngày...tháng...năm 200..

Kết quả test xylocain 2%

BÁC SĨ ĐIỀU TRỊ

Bác sĩ đọc test xylocain 2%

Họ tên:

KẾT QUẢ

Chỉ số	Kết quả	Chỉ số	Kết quả
Số lượng hồng cầu (T/l)		Số lượng bạch cầu (G/l)	
Lượng huyết sắc tố (g/l)		Chỉ số trưởng thành BC hạt	
Hematocrit (l/l)		Tỷ lệ hồng cầu/ bạch cầu hạt	
MCV (fl)		Số lượng tế bào tuỷ xương (G/l)	
MCH (pg)		Hoá học tế bào:	
MCHC (g/l)		+ Peroxydase	
Hồng cầu có nhân (G/l)		+ Sudan	
Hồng cầu lưới máu (%)		+ Esterase không ức chế	
Hồng cầu lưới tuỷ (%)		+ Esterase ức chế bằng NaF	
Chỉ số trưởng thành HC		+ P.A.S	
Số lượng tiểu cầu (G/l)			

Nhận xét:

Kết luận:

Đề nghị:

Ngày tháng năm 200...

TRƯỞNG KHOA XÉT NGHIỆM

Họ tên:

HUYẾT - TUYẾT ĐỎ LẦN THỨ.....

Tế bào		Tủy bình thường (%)	Kết quả	
			Tủy	Máu
Tế bào bất thường				
Myeloblast	(Nguyên tủy bào)	0-2		
Promyelocyte	(Tiền tủy bào)	0-3		
Myelocyte (Tủy bào)	Neutrophil (Trung tính)	5-10		
	Eosinophil (Ưa acid)	0.5-3		
	Basophil (Ưa base)			
Metamyelocyte (Hậu tủy bào)	Neutrophil (Trung tính)	5-12		
	Eosinophil (Ưa acid)	0-1		
	Basophil (Ưa base)			
Band (BC dũa)	Neutrophil (Trung tính)	5-12		
	Eosinophil (Ưa acid)	0-0.3		
	Basophil (Ưa base)			
Segmen (Đoạn)	Neutrophil (Trung tính)	20-40		
	Eosinophil (Ưa acid)	1-4		
	Basophil (Ưa base)	0-1		
Lymphoblast	(Nguyên bào lympho)	0-0.1		
Prolymphocyte	(Tiền lympho)	0-0.1		
Lymphocyte	(Lympho)	8-2.5		
Plasmoblast	(Nguyên tương bào)			
Proplasmocyte	(Tiền tương bào)			
Plasmocyte	(Tương bào)	0-1		
Monoblast	(Nguyên bào mono)			
Promonocyte	(Tiền mono)			
Monocyte	(Mono)	0-2		
Proerythroblast	(Nguyên tiền hồng cầu)	0-0.3		
Erythroblast basophil	(Nguyên hồng cầu ưa base)	1-4		
Erythroblast polycromatophil	(Nguyên hồng cầu đa sắc)	3-10		
Erythroblast acidophil	(Nguyên hồng cầu ưa acid)	7-15		
Megakaryoblast	(Nguyên mẫu tiểu cầu)	0-1		
Megakaryocyte basophil	(Mẫu tiểu cầu ưa base)	5-14		
Megakaryocyte granular	(MTC hạt chưa sinh TC)	38-53		
Megakaryocyte mature	(MTC hạt đang sinh TC)	20-40		

Duyệt mẫu 29-12-2000

PHIẾU XÉT NGHIỆM ĐÔNG MÁU

Số:

- ☐ XN thường: Họ và tên: Tuổi: Nam/Nữ
- ☐ XN cấp: Số BHYT: Số bệnh án:
- Khoa: Phòng: Giường
- Chẩn đoán:

	Tên xét nghiệm	Kết quả	Chỉ số bình thường
☐	Đông máu cơ bản: - PT (%) - Fibrinogen (g/l) - APTT: + T.gian (giây) - Bệnh/chứng - Số lượng tiểu cầu ($10^9/l$)		70 - 140 % 2-4 g/l Chứng: B/ch: 0,85 - 1,2 150.10 ⁹ - 400.10 ⁹ /l
☐	Co cục máu đông		Co hoàn toàn
☐	Dấu hiệu dây thắt		Âm tính
☐	PT: - Thời gian (giây) - % - INR		Chứng: 70 - 140%
☐	APTT: - Thời gian (giây) - Bệnh/chứng		Chứng: B/ch: 0,85 - 1,2
☐	TT (T/gian Thrombin): - Thời gian (giây) - Bệnh/chứng		Chứng: B/ch: 0,85 - 1,15
☐	Nghiệm pháp rượu (L'Ethanol Test)		Âm tính
☐	Thời gian tiêu Euglobulin (N.F.Von - Kaulla)		> 60 phút
☐	FDPs		
☐	D-Dimer		
☐	Định lượng yếu tố VIII		30 - 180%
☐	Định lượng yếu tố IX		30 - 150%
☐	Định lượng yếu tố khác:		
☐	Ngưng tập tiểu cầu với các chất khác (Collagen, ADP)		60 - 70%
☐	AT III (Antithrombin III)		
☐	Protein S		
☐	Protein C		
☐	Kháng đông lưu hành đường nội sinh		
☐	Kháng đông lưu hành đường ngoại sinh		
☐	Các XN khác:		

Nhận xét:

.....giờ.....ngày... tháng... năm 200...

Ngày.....tháng.....năm 200...

BÁC SĨ ĐIỀU TRỊ

TRƯỞNG PHÒNG ĐÔNG MÁU

Họ tên: Họ tên:

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AABB (2006): *Technical Manual*
15th Edition, by AABB, 2006
2. Vũ Triệu An và CT. (1982): *Kỹ thuật cơ bản về miễn dịch*, NXB Y học, Tập 1
3. Trần Văn Bé và CT. (2003): *Thực hành Huyết học - Truyền máu*
NXB Y học, TP HCM, 2003
4. Văn Đình Hoa và CT. (2003): *Các giá trị sinh học về miễn dịch*
Trong: *Các giá trị sinh học người Việt Nam bình thường, thập kỷ 90/XX*,
NXB Y học, Hà Nội, 2003
5. Nguyễn Thế Khánh, Phạm Tử Dương (1976): *Kỹ thuật xét nghiệm*
NXB Y học, Hà Nội, 1976
6. Đỗ Trung Phấn (1979): *Miễn dịch trung gian tế bào*
NXB Y học, Hà Nội, 1979
7. Đỗ Trung Phấn và CT (2003): *Các giá trị sinh học về huyết học*
Trong: *Các giá trị sinh học người Việt Nam bình thường thập kỷ 90/XX*
NXB Y học, Hà Nội, 2003
8. Đỗ Trung Phấn (2000): *An toàn truyền máu*
NXB Y học, Hà Nội, 2000
9. Hoffman R. (1995): *Special tests and procedures in Hematology*
In: *Hematology, Basic principles and practice*
Ed. by Hoffman, Pub. by Churchill Livingstone, New York, 1995, p: 2201-2274
10. Mitchell Lewis (1999): *Laboratory practice*
In: *Postgraduate Hematology*, Ed. by Hoffbrand V.,
Pub. by Plant a Tree, Italy, 1999
11. Ivan Roitt et.al. 1998): *Immunological techniques*.
Ed. by Roitt, Pub. by Mosby, London, 1998
12. Williams Hematology (1995): *Laboratory techniques: Principles and Interpretation*.
Ed. Beutler E., pub. by McGraw-Hill, 1995

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

Kỹ thuật
XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC VÀ TRUYỀN MÁU
ỨNG DỤNG TRONG LÂM SÀNG

Chịu trách nhiệm xuất bản
HOÀNG TRỌNG QUANG

<i>Biên tập:</i>	BS. NGUYỄN LAN
<i>Sửa bản in:</i>	NGUYỄN LAN
<i>Trình bày bìa:</i>	CHU HÙNG
<i>Kt vi tính:</i>	TRẦN THANH TÚ

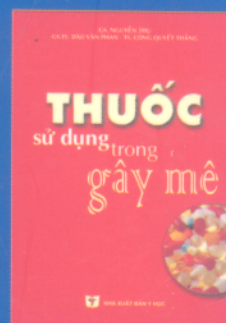
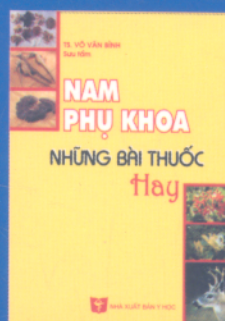
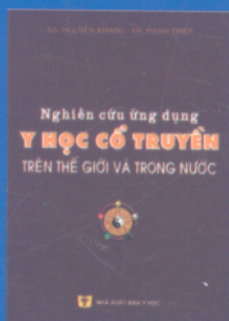
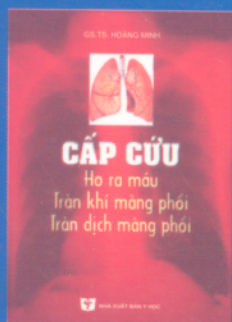
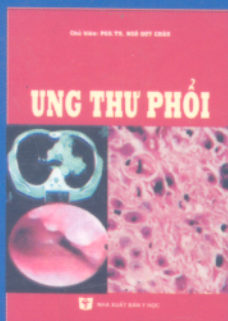
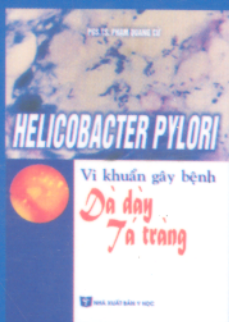
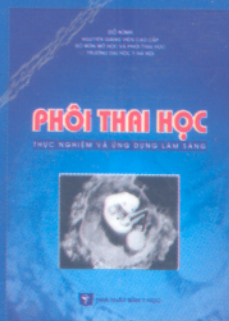
In 1000 cuốn, khổ 19 x 27cm tại Xưởng in Nhà xuất bản Y học.

Giấy phép xuất bản số: 25 - 2009/CXB/268- 168/YH

In xong và nộp lưu chiểu quý II năm 2009.

KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC VÀ TRUYỀN MÁU

ỨNG DỤNG TRONG LÂM SÀNG



 **NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC**

Địa chỉ: 352 Đội Cấn - Ba Đình - Hà Nội
Điện thoại: 04.7 625 922 - 7 625 934 * Fax: 04.7 625 923
Website: www.xuatbanyhoc.vn * Email: xuatbanyhoc@fpt.vn
Chi nhánh: 699 Trần Hưng Đạo - Quận 5 - TP. Hồ Chí Minh
Điện thoại: 08.9 235 648 * Fax: 08.9 230 562

