BỘ Y TẾ

KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM
HUYẾT HỌC - TRUYỀN MÁU

SÁCH ĐÀO TẠO CỬ NHÂN KỸ THUẬT Y HỌC

Mã số: ĐK.01.Z03
ĐK.01.Z04
ĐK.01.Z05
ĐK.01.Z06

Chủ biên: TS. BSCK2. Hà Thị Anh

58034

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC
HÀ NỘI – 2009

CHỈ ĐẠO BIÊN SOẠN:

Vụ Khoa học và Đào tạo, Bộ Y tế

CHỦ BIÊN:

TS. BSCK2. Hà Thị Anh

THAM GIA BIÊN SOẠN:

TS. BSCK2. Hà Thị Anh
TS. BS. Bùi Thị Mai An
CN. Huỳnh Hữu Duyên
CN. Đào Thanh Hiền
CN. Trần Thuỳ Lên
TS.BS. Nguyễn Thị Nữ
CN. Phạm Thanh Nguyên
CN. Nguyễn Thị Kim Nương
CN. Nguyễn Kim Trung

© Bản quyền thuộc Bộ Y tế (Vụ Khoa học và Đào tạo)

LỜI GIỚI THIỆU

Thực hiện một số điều khoản của Luật Giáo dục, Bộ Giáo dục và Đào tạo và Bộ Y tế đã ban hành chương trình khung đào tạo Đại học Ngành Y tế. Bộ Y tế tổ chức biên soạn tài liệu dạy và học các môn cơ sở, chuyên môn và cơ bản chuyên ngành theo chương trình trên nhằm từng bước xây dựng bộ sách chuẩn trong công tác đào tạo nhân lực y tế.

Sách "Kỹ thuật xét nghiệm Huyết học - Truyền máu" được biên soạn dựa trên chương trình giáo dục của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh trên cơ sở chương trình khung đã được phê duyệt.

Sách được các nhà giáo lâu năm và tâm huyết với công tác đào tạo biên soạn theo phương châm: kiến thức cơ bản, hệ thống; nội dung chính xác, khoa học; cập nhật các tiến bộ khoa học, kỹ thuật hiện đại và thực tiễn Việt Nam. Sách đã được Hội đồng chuyên môn chuyên ngành Kỹ thuật Y học thẩm định. Bộ Y tế ban hành làm tài liệu chính thức của ngành trong giai đoạn hiện nay, sau 3-5 năm phải được cập nhật.

Bộ Y tế xin chân thành cảm ơn các nhà giáo của Khoa Điều dưỡng Kỹ thuật Y học - Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh và Bộ môn Huyết học - Truyền máu - Trường đại học Y Hà Nội đã dành nhiều công sức để hoàn thành cuốn sách này; cảm ơn GS.TSKH. Đỗ Trung Phấn, PGS.TS. Phạm Quang Vinh đã đọc, phản biện để cuốn sách được hoàn chỉnh kịp thời phục vụ cho công tác đào tạo nhân lực Ngành Y tế.

Lần đầu xuất bản, chúng tôi mong nhận được ý kiến đóng góp của đồng nghiệp, các bạn sinh viên và các độc giả để lần xuất bản sau được hoàn thiện hơn.

VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

LỜI NÓI ĐẦU

Sách "Kỹ thuật xét nghiệm Huyết học – Truyền máu" được biên soạn cho các đối tượng sinh viên Cử nhân kỹ thuật y học chuyên ngành xét nghiệm.

Sách được biên soạn dựa trên chương trình giáo dục của Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh trên cơ sở chương trình khung đã được phê duyệt.

Phương châm biên soạn là kiến thức cơ bản, hệ thống. Nội dung cụ thể, khoa học, cập nhật các tiến bộ khoa học, kỹ thuật hiện đại và thực tiễn Việt Nam. Cuối mỗi bài đều có các câu hỏi tự lượng giá và bảng kiểm giúp sinh viên tự học, tự kiểm tra các thao tác kỹ thuật.

Chúng tôi xin hết sức biết ơn GS.TSKH. Đỗ Trung Phấn đã tận tình hướng dẫn, góp ý chỉnh sửa để cuốn sách được hoàn chỉnh.

Vì là lần đầu xuất bản nên mặc dù đã rất cố gắng, vẫn không tránh khỏi những thiếu sót nhất định. Kính mong được sự lượng thứ và chúng tôi rất mong nhận được những ý kiến đóng góp quý báu của quý đồng nghiệp và của sinh viên để khi biên soạn lại sẽ được hoàn chỉnh hơn.

Chủ biên

TS.BSCK2. HÀ THỊ ANH

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

1.	ARN	Acid ribonucleic
2.	BC	Bạch cầu
3.	BCB	Brilliant Cresyl Blue
4.	ED	Eau distillé
5.	EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetate
6.	GRAN	Granulocyte
7.	Hb	Hemoglobin
8.	HCL	Hồng cầu lưới
9.	HCM	Hồng cầu mẫu
10.	HCN	Hồng cầu có nhân
11.	HTM	Huyết thanh mẫu
12.	MCH	Mean corpuscular Hemoglobin
13.	MCHC	Mean corpuscular Hemoglobin Concentration
14.	MCV	Mean corpuscular Volume
15.	MID	Mixed cell
16.	OD	Optical Density
17.	Plt	Platelet
18.	RDV	Red blood cell distribution
19.	TBCN	Tế bào có nhân
20.	TC	Tiểu cầu
21.	TCK	Temps de Cephalin – Kaolin
22.	TQ	Temps de Quick
23.	VS	Vitesse de sedimentation

MỤC LỤC

Lời giới thiệu 3
Lời nói đầu 5
Danh mục chữ viết tắt 7

Chương I
MỘT SỐ VẤN ĐỀ CƠ BẢN TRONG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC

Bài 1. Các đơn vị đo lường trong huyết học 11
Bài 2. Tổ chức phòng xét nghiệm Huyết học – Truyền máu 14
Bài 3. Điều chế các loại dung dịch thuốc thử trong xét nghiệm huyết học 19
Bài 4. Kỹ thuật kéo lam máu dàn 24
Bài 5. Kỹ thuật lấy máu mao quản 27
Bài 6. Kỹ thuật lấy máu tĩnh mạch 30
Bài 7. Kỹ thuật nhuộm tiêu bản 33

Chương II
KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC TẾ BÀO

Bài 8. Đếm số lượng bạch cầu 36
Bài 9. Đếm số lượng hồng cầu 41
Bài 10. Đếm số lượng tiểu cầu 48
Bài 11. Đếm hồng cầu lưới 51
Bài 12. Nhận định bạch cầu 56
Bài 13. Công thức bạch cầu 59
Bài 14. Kỹ thuật đo thể tích khối hồng cầu 63
Bài 15. Định lượng huyết sắc tố 68
Bài 16. Đo tốc độ máu lắng 75
Bài 17. Máy đếm tế bào – Nguyên tắc hoạt động và phương pháp sử dụng 79
Bài 18. Huyết đồ 82
Bài 19. Tủy đồ 85
Bài 20. Xét nghiệm tế bào trong dịch não tủy 89
Bài 21. Xét nghiệm tế bào trong cặn lắng nước tiểu 92
Bài 22. Tinh dịch đồ 102

Chương III
KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM ĐÔNG – CẦM MÁU

Bài 23. Dấu hiệu dây thắt 108
Bài 24. Thời gian máu chảy 111
Bài 25. Thời gian máu đông 114
Bài 26. Co cục máu 117
Bài 27. Thời gian prothrombin 120
Bài 28. Thời gian thromboplastin từng phần hoạt hóa 124
Bài 29. Thời gian Von -Kaulla 128
Bài 30. Nghiệm pháp rượu 131
Bài 31. Định lượng D -Dimer 133
Bài 32. Định lượng các yếu tố đông máu tham gia đường đông máu nội sinh 136
Bài 33. Xác định sự có mặt của các chất kháng đông lưu hành đường nội sinh 139
Bài 34. Định lượng các yếu tố chống đông sinh lý antithrombin III, protein C, protein S 141

Chương IV
TRUYỀN MÁU

Bài 35. Tuyển chọn người hiến máu 148
Bài 36. Kỹ thuật thu gom máu 153
Bài 37. Kỹ thuật sàng lọc các bệnh truyền qua đường truyền máu 155
Bài 38. Kỹ thuật định nhóm máu ABO 160
Bài 39. Kỹ thuật định nhóm máu Rhesus 167
Bài 40. Xét nghiệm Coombs 170
Bài 41. Phản ứng hòa hợp (Phát máu an toàn) 175
Bài 42. Quy trình truyền máu tại giường bệnh (Định lại nhóm máu ABO) 179
Bài 43. Kỹ thuật điều chế các sản phẩm máu: huyết tương – khối hồng cầu – khối tiểu cầu 182
Bài 44. Kỹ thuật sản xuất huyết thanh mẫu, hồng cầu mẫu 185
Bài 45. Phương pháp hiệu giá kháng thể miễn dịch 191
Tài liệu tham khảo 195

Chương I

MỘT SỐ VẤN ĐỀ CƠ BẢN TRONG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC

Bài 1

CÁC ĐƠN VỊ ĐO LƯỜNG TRONG HUYẾT HỌC

MỤC TIÊU

1. *Trình bày được các đại lượng đo lường.*
2. *Trình bày được các đơn vị đo lường quốc tế trong huyết học.*

1. HỆ THỐNG ĐO LƯỜNG QUỐC TẾ

Có nhiều hệ thống

- 1901: Hệ mét
- 1960: Hệ đơn vị đo lường quốc tế (SI: System International).
- Đơn vị SI đã được quốc tế công nhận. Tại Việt Nam, hệ thống SI đã được sử dụng trong huyết học.

2. CÁC ĐƠN VỊ SỬ DỤNG TRONG HUYẾT HỌC

2.1. Huyết học sử dụng 4 đơn vị cơ bản

Đại lượng	Tên SI	Ký hiệu
Chiều dài	Mét	m
Khối lượng	kilôgram	kg
Thời gian	giây	s
Số lượng vật chất	mol	mol

2.2. Các đơn vị SI thông thường

Đại lượng	Đơn vị SI	Ký hiệu	
Diện tích	Mét vuông	m^2	1m x 1m
Thể tích	Mét khối	m^3	1m x 1m x 1m
Tốc độ	Mét/giây	m/s	1m /1 giây

2.3. Các bội số và ước số

Chữ ghép vào trước	Ký hiệu	Hệ số nhân hoặc chia	
mega	M	x 1.000.000	(x 10^6)
Kilo	K	x 1.000	(x 10^3)
centi	c	/100	(x 0,01 hay x 10^{-2})
mili	m	/1.000	(x 0,001 hay x 10^{-3})
micro	μ	/1.000.000	(x 10^{-6})
nano	n	/1.000.000.000	(x 10^{-9})

Thí dụ:

1 kilomet (km) = 1.000 mét

1 centimet (cm) = 0,01 mét (0,01 hay 10^{-2} m)

1 milimet (mm) = 0,001 mét (0,001 hay 10^{-3} m)

1 micromet (μm) = 0,000001 mét (0,000001 hay 10^{-6} m)

3. CÁC ĐƠN VỊ SI SỬ DỤNG TRONG HUYẾT HỌC

So với đơn vị cổ điển và các yếu tố chuyển đổi

Tên hiện nay	Đơn vị SI	Tên cổ điển	Đơn vị cổ điển	Yếu tố chuyển đổi
Số lượng hồng cầu	Số x10^{12}/Lít (Tetra/lít = T/L)	Số đếm hồng cầu	Triệu/mm^3	Không có yếu tố chuyển đổi - 4,5 triệu/mm^3 = 4,5 x 10^{12}/L = (4,5T/L) - 5 x 10^{12}/L = 5 triệu /mm^3
Thể tích khối hồng cầu	L/L	Hct hay thể tích huyết cầu	%	- Hct 38% x 0,01 = thể tích khối hồng cầu là 0,38 L/L. - Thể tích khối hồng cầu là 0,40 x 100 = Hct 40%
Số lượng bạch cầu	Số x10^9/L (Giga/lít = G/L)	Số đếm bạch cầu	Số / mm^3	- 8000/mm^3 x 0,001 = 8 x 10^9/L (8G/L) - 7,5 x 10^9/L x 1000 = 7500/mm^3
Số lượng tiểu cầu	Số x 10^9/L (Giga/lít = G/L)	Số đếm tiểu cầu	Số / mm^3	- 220000/mm^3 x 0,001 = 220 x 10^9/L (220G/L) - 250 x 10^9/L x 1000 = 250000/mm^3

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Hãy trình bày đơn vị SI và ký hiệu của các đại lượng:

- Chiều dài
- Khối lượng
- Thời gian
- Số lượng vật chất

2. Chuyển đổi kết quả huyết đồ sau đây thành đơn vị SI

	Đơn vị cũ	Đơn vị SI
Hồng cầu	4.700.000/mm^3	
Hematocrit	45,4%	
Bạch cầu	5.870/mm^3	
Tiểu cầu	145.000/mm^3	

Bài 2

TỔ CHỨC PHÒNG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC - TRUYỀN MÁU

MỤC TIÊU

1. *Trình bày được tổ chức, nhiệm vụ phòng xét nghiệm Huyết học – Truyền máu tuyến huyện.*
2. *Trình bày được tổ chức, nhiệm vụ phòng xét nghiệm Huyết học – Truyền máu tuyến tỉnh.*
3. *Trình bày được tổ chức, nhiệm vụ Trung tâm Truyền máu – Huyết học.*

1. TỔ CHỨC PHÒNG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC – TRUYỀN MÁU Ở BỆNH VIỆN TUYẾN HUYỆN

1.1. Tổ chức

Là phòng xét nghiệm tổng hợp: Truyền máu, Huyết học, Sinh hóa, Vi trùng.

1.2. Chức năng

Thực hiện các xét nghiệm huyết học, đông máu và truyền máu.

1.2.1. Huyết học tế bào

- Đếm hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu.
- Huyết đồ.
- Thể tích khối hồng cầu.
- Định lượng huyết sắc tố.
- Tốc độ lắng máu.
- Công thức bách phân bạch cầu.
- Đếm tế bào dịch não tủy.
- Đọc cặn lắng nước tiểu.

- Tìm ký sinh trùng sốt rét.
- Đo sức bền hồng cầu.

1.2.2. Huyết học đông máu

- Thời gian máu chảy
- Thời gian máu đông
- Thời gian Quick
- Thời gian TCK
- Thời gian co cục máu

1.2.3. Truyền máu

- Phân loại nhóm máu ABO
- Chứng nghiệm phù hợp
- Xét nghiệm Coombs trực tiếp và gián tiếp
- Phát hiện viêm gan B, HIV, HCV, giang mai, sốt rét.

1.2.4. Thực hiện truyền máu theo y lệnh của bác sĩ

- Máu toàn phần
- Khối hồng cầu O
- Huyết tương tươi đông lạnh

1.3. Nhân sự

- 1 bác sĩ chuyên khoa Truyền máu - Huyết học.
- 1 cử nhân xét nghiệm.
- 2 kỹ thuật viên xét nghiệm.

2. TỔ CHỨC PHÒNG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC – TRUYỀN MÁU Ở BỆNH VIỆN TUYẾN TỈNH

2.1. Tổ chức

Khoa Truyền máu và khoa Huyết học.

2.2. Chức năng

2.2.1. Huyết học tế bào

- Các xét nghiệm huyết học tế bào như bệnh viện tuyến huyện.

- Tìm tế bào Hargrave.
- Khảo sát tủy đồ.
- Khảo sát hạch đồ.
- Điện di huyết sắc tố.
- Tế bào các dịch: xét nghiệm tế bào cặn nước tiểu, dịch ổ bụng, dịch màng phổi...

2.2.2. Huyết học đông máu

- Các xét nghiệm huyết học đông máu như ở bệnh viện tuyến huyện.
- Định lượng fibrinogen.
- Thời gian thrombin.
- Định lượng các yếu tố đông máu VII, VIII, IX.
- Xét nghiệm Von - Kaulla.
- Xét nghiệm Ethanol.

2.2.3. Lấy và lưu trữ máu và các sản phẩm máu

Điều chế các thành phần máu:

- Huyết tương tươi đông lạnh và tủa lạnh.
- Khối hồng cầu giảm bạch cầu.
- Tiểu cầu đậm đặc.

2.2.4. Truyền máu

- Các xét nghiệm truyền máu như ở bệnh viện tuyến huyện.
- Tìm kháng thể bất thường.
- Định nhóm Rhesus.
- Hiệu giá kháng thể ABO.
- Xét nghiệm ELISA: HBsAg, anti HBV, HIV.
- VDRL.

2.3. Nhân sự

- Có ít nhất 1 đến 2 bác sĩ chuyên khoa Huyết học - Truyền máu.
- 2 cử nhân xét nghiệm.
- 2 đến 4 kỹ thuật viên xét nghiệm.

3. TRUNG TÂM TRUYỀN MÁU - HUYẾT HỌC KHU VỰC

Phục vụ cho các bệnh viện đa khoa và chuyên khoa địa phương. Đây là một trung tâm riêng nằm ngoài các bệnh viện, hoạt động theo kế hoạch và chỉ đạo của Nhà nước.

3.1. Tổ chức

3.1.1. Khối hành chính

- Phòng y vụ
- Phòng tổ chức cán bộ
- Phòng quản trị
- Phòng hành chính

3.1.2. Khối chuyên môn

3.1.2.1. Về truyền máu

- Khoa lấy máu và dự trữ.
- Khoa huyết thanh học
- Khoa sàng lọc bệnh nhiễm trùng, sản xuất, lưu trữ và phân phối máu và các chế phẩm máu.

3.1.2.2. Về huyết học

- Tế bào
- Đông cầm máu
- Sinh hóa huyết học
- Sinh học phân tử và xét nghiệm kỹ thuật cao.

3.1.2.3. Lâm sàng bệnh máu

3.1.2.4. Khoa nghiên cứu và huấn luyện

3.2. Chức năng

3.2.1. Tổ chức tốt phong trào hiến máu nhân đạo: đáp ứng nhu cầu máu trong thời bình và thời chiến.

3.2.2. Sàng lọc các bệnh nhiễm trùng

3.2.3. Sản xuất các loại chế phẩm máu: để đáp ứng cho nhu cầu địa phương và nhu cầu các nơi khác.

3.2.4. Bảo đảm an toàn truyền máu bệnh viện: phát máu an toàn, truyền máu tại giường bệnh an toàn..

58934

3.2.5. Chỉ đạo và kiểm tra chất lượng

- Về kỹ thuật xét nghiệm truyền máu và xét nghiệm huyết học của các đơn vị y tế trong khu vực.
- Về công tác điều trị lâm sàng các bệnh máu.

3.2.6. Giảng dạy và huấn luyện chuyên ngành Huyết học – Truyền máu, tổ chức các lớp đào tạo lại cho nhân viên xét nghiệm.

3.2.7. Nghiên cứu khoa học

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày tổ chức, chức năng phòng xét nghiệm Huyết học – Truyền máu tuyến huyện.

2. Trình bày tổ chức, chức năng phòng xét nghiệm Huyết học – Truyền máu tuyến tỉnh.

3. Cho biết các chức năng của Trung tâm truyền máu địa phương.

Bài 3

ĐIỀU CHẾ CÁC LOẠI DUNG DỊCH THUỐC THỬ TRONG XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện pha chế chính xác các loại dung dịch, thuốc thử trong xét nghiệm huyết học.*
2. *Trình bày được các nguyên tắc pha chế dung dịch thuốc thử trong xét nghiệm huyết học.*

1. NGUYÊN TẮC

- Phải đựng dung dịch thuốc thử trong chai lọ đúng quy định, có nắp đậy cẩn thận.
- Phải dán nhãn ghi rõ tên, công thức hóa học, nồng độ của dung dịch thuốc thử chứa trong chai.
- Điều kiện bảo quản của từng loại thuốc thử phải được đảm bảo: nhiệt độ, ánh sáng, thời gian sử dụng.
- Đối với những dung dịch thuốc thử có độc, phải dán nhãn "CHẤT ĐỘC" và bảo quản riêng một nơi.
- Thuốc thử phải để ở nơi khô ráo, tránh xa nguồn nhiệt. Nên sắp xếp thuốc thử theo thứ tự A, B, C.
- Phải cân đong chính xác và thực hiện đúng thứ tự pha chế.

2. DỤNG CỤ

- Cầu bình
- Cốc có mỏ
- Chai lọ
- Cân
- Ống đong

- Ống hút
- Que khuấy thủy tinh

3. CÁCH PHA CÁC LOẠI DUNG DỊCH THUỐC THỬ

3.1. Dung dịch đếm số lượng hồng cầu

3.1.1. Dung dịch MARCANO

- Natri sulfat: 50g
- Formol: 5ml
- Nước cất cho đủ: 1.000ml

3.1.2. Dung dịch nước muối sinh lý

- Natri clorua: 8,5g
- Nước cất cho đủ: 1.000ml

3.2. Dung dịch đếm số lượng bạch cầu

3.2.1. Dung dịch LAZARUS

- Acid acetic (CH_3COOH): 5ml
- Methylene blue 1%: 2-3 giọt
- Nước cất vừa đủ: 100ml

Trong ống đong có chứa sẵn 50ml nước cất, cho acid acetic vào khuấy đều, cho nước cất cho đủ 100ml. Sau đó thêm 2 – 3 giọt methylene blue, lắc đều. Acid acetic làm tan hồng cầu, methylene blue để nhuộm màu nhân bạch cầu.

3.2.2. Dung dịch TURK

- Acid acetic: 2ml
- Gentian violet: 1 giọt
- Nước cất vừa đủ: 98ml

Trộn Gentian violet với acid acetic. Sau đó cho nước cất vào lắc đều. Acid acetic làm tan hồng cầu, gentian violet nhuộm màu nhân bạch cầu.

3.3. Dung dịch đếm tiểu cầu

3.3.1. Dung dịch REES -ECKER

- Natri citrat: 3,8g
- Formol: 0,2ml

- Xanh cresyl ánh: 0,1g
- Nước cất vừa đủ: 100ml

Natri citrat là chất kháng đông, xanh bóng cresyl nhuộm màu tiểu cầu. Thời gian sử dụng là một tháng và phải lọc trước khi dùng. Luôn điều chế và sử dụng mới vì dung dịch để lâu dễ bị oxy hóa.

3.3.2. Dung dịch MARCANO

- Natri sulfat: 10g
- Formol 4%: 1ml
- Nước cất vừa đủ: 200ml

3.4. Dung dịch đếm tế bào dịch não tủy

- Glacial acetic acid: 10ml
- Crystal violet: 0,1g
- Nước cất: 90ml

3.5. Dung dịch đếm tinh trùng

- Sodium bicarbonat: 5g
- Formol: 1ml
- Nước cất: 100ml

3.6. Cách pha loãng cồn

Chúng ta có sẵn cồn 95°, từ đó ta có thể điều chế các cồn có nồng độ sau:

- Cồn: 85°
  + Cồn 95°: 98,4ml
  + Nước cất: 10,6ml
- Cồn 70°
  + Cồn 95°: 72,6ml
  + Nước cất: 27,4ml
- Cồn có Iod 2%
  + Iodine (I_2): 2g
  + Cồn 70°: 100ml

3.7. Dung dịch chống đông

3.7.1. EDTA (Ethylenediamine tetra acetate)

- Bột EDTA: 1g
- Nước cất vừa đủ: 100ml

Trong một ống nghiệm sạch, cho vào 0,2ml EDTA, sấy khô hay để khô tự nhiên.

3.7.2. Natri citrat 3,8%

Natri citrat: 3,8g

Nước cất vừa đủ: 100ml

3.8. Cách pha các loại thuốc nhuộm

3.8.1. Thuốc nhuộm Wright

- Wright bột: 1,2g
- Glycerin: 15ml
- Cồn methylic: 454ml

Nghiền thật kỹ bột Wright với glycerin trong cối, sau đó cho methanol vào trộn hòa tan thật đều. Bảo quản ở $37^0 - 40^0C$, tránh ánh sáng. Lọc trước khi sử dụng.

3.8.2. Thuốc nhuộm Giemsa đậm đặc

- Giemsa bột: 7,6g
- Cồn methylic: 750ml
- Glycerin: 250ml
  + Cho Giemsa bột vào cối bằng sứ, cho glycerin vào từ từ, nghiền thật mịn bằng chày sứ.
  + Cho cồn methylic vào trộn đều.
  + Dung dịch được đựng vào lọ màu, bọc bằng giấy màu đen hay để chỗ tối trong 4 ngày liền, mỗi ngày lắc 3 lần.

3.8.3. Dung dịch nhuộm hồng cầu lưới: dung dịch xanh cresyl ánh

- Xanh cresyl ánh: 1g
- Natri citrat 3%: 20ml
- Nước muối 0,9‰: 80ml

Bảo quản ở tủ lạnh, lọc trước khi dùng. Thời gian sử dụng: 1 tháng.

3.9. Dung dịch sulfochromic ngâm dụng cụ và lam

- Potassium bichromat: 100g
- Acid sulfuric: 100ml
- Nước: 1.000ml

Khuấy cho tan đều. Cho thêm từ từ acid sulfuric 100ml. Phải đậy kín dung dịch.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc pha chế thuốc thử
2. Cách bảo quản dung dịch thuốc thử
3. Công thức pha chế dung dịch Lazarus
4. Công thức pha chế dung dịch Rees -Ecker

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ hoá chất để điều chế thuốc thử và thuốc nhuộm.	Dụng cụ và hoá chất phải đầy đủ.	1	2	2,5
2	Cân, đong hoá chất.	Đảm bảo cân, đong hoá chất, thuốc thử chính xác.	1	2	2,5
3	Trình tự pha chế	Phải tuân thủ đúng thứ tự pha chế.	1	2	2,5
4	Kiểm tra chất lượng thuốc thử.	Thuốc thử phải đạt tiêu chuẩn.	1	2	2,5

Bài 4

KỸ THUẬT KÉO LAM MÁU DÀN

MỤC TIÊU

1. *Kéo được một lam máu dàn đẹp*
2. *Trình bày được nguyên tắc kéo lam máu dàn*

1. NGUYÊN TẮC

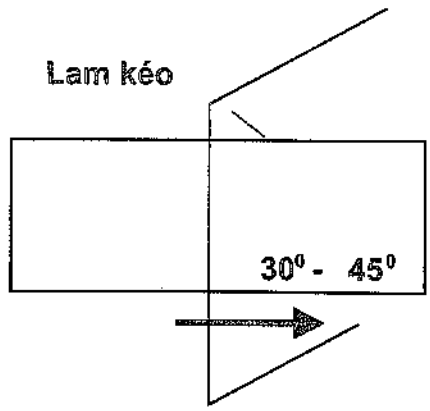
Nhỏ một giọt máu lên một đầu lam kính và dùng một lam kính khác kéo giọt máu đó thành một làn mỏng.

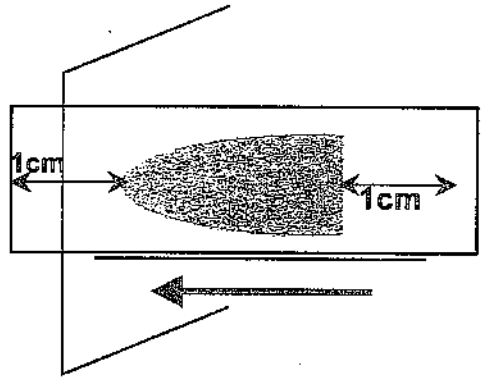
2. DỤNG CỤ VÀ MẪU THỬ

- Lam kính, lam kéo.
- Bông thấm nước, khăn sạch.

3. QUY TRÌNH KỸ THUẬT

- Cho một giọt máu nhỏ lên lam cách đầu lam khoảng 2cm (lam kính phải khô và sạch).
- Một tay cầm lam kính đã có giọt máu, còn tay kia cầm lam kéo đặt trước giọt máu một khoảng cách như hình vẽ.





- Nghiêng lam kéo một góc khoảng 30° về phía giọt máu và kéo lùi lam kéo đến khi chạm phải giọt máu, để cho giọt máu lan ra tỏa hai bên cạnh của lam máu, kéo tới đều đặn.
- Để khô tự nhiên hay lắc nhanh cho làn máu khô hoàn toàn. Dùng viết chì ghi tên hay mã số của bệnh nhân lên phần dày của làn máu.

4. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Làn máu có lỗ hổng do lam bẩn, có dính dầu mỡ.
- Lam kéo không nhẵn cạnh tạo răng cưa trên làn máu mỏng.
- Giọt máu quá to hay quá nhỏ.
- Góc độ kéo quá lớn làn máu sẽ ngắn và dày. Góc độ kéo quá nhỏ khi kéo hết lam, máu vẫn còn.
- Tốc độ kéo không đều gây sọc, ngấn.
- Giọt máu kéo nhanh khi nó chưa lan ra hai cạnh của kính đựng vật khiến làn máu có bề ngang hẹp và dày.

5. BIỆN LUẬN

5.1. Một lam máu dàn đẹp đạt yêu cầu phải hội đủ những điều kiện sau:

- Máu tràn đều về hai bên càng về đuôi càng mỏng.
- Phần mỏng của làn máu có chiều dài 2cm và có hình dạng như cái "lưỡi mèo" ở phần cuối.
- Độ dày đạt yêu cầu, không mỏng quá, không dày quá.
- Chiều dài của làn máu không chiếm hết chiều dài của lam kính, cách hai đầu lam kính khoảng 1cm.
- Làn máu không có sọc, có ngấn.
- Làn máu không có lỗ hổng.

5.2. Lưu ý khi sử dụng máu mao quản: khi nhỏ lên lam ta phải kéo ngay thành làn máu. Nếu không làn máu sẽ không đạt yêu cầu vì máu bị đông lại.

5.3. Trong khi chờ đợi làn máu khô để nhuộm nên bảo quản kỹ, tránh nơi ẩm ướt, nguồn nhiệt.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Nêu mục đích và nguyên tắc của kỹ thuật kéo lam máu dàn.
2. Góc độ kéo lam có ảnh hưởng như thế nào đối với độ dày và chiều dài làn máu.
3. Tốc độ kéo lam có ảnh hưởng như thế nào đối với độ dày và chiều dài làn máu.
4. Mô tả một lam máu dàn kéo đẹp.

BẢNG KIỂM

Kỹ thuật làm tiêu bản máu dàn

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ để kéo lam máu	Dụng cụ phải đầy đủ để kéo lam	0,4	0,5	0,5
2	Kiểm tra tên bệnh nhân	Đối chiếu tên trên phiếu thử và tên trên mẫu máu cẩn thận	0,4	0,8	1
3	Lắc đều máu trước khi lấy máu kéo lam	Lắc nhẹ 15-20 lần	0,4	0,8	1
4	Nhỏ máu lên lam kính	Cách đầu lam kính khoảng 2cm	0,2	0,3	0,5
5	Đặt lam máu lên lam kính	Góc nghiêng khoảng 30^0	0,2	0,3	0,5
6	Thao tác kéo	Kéo lam kéo đến khi vừa chạm giọt máu, chờ cho máu lan ra hai bên sau đó kéo lùi lại với tốc độ vừa phải	0,2	0,3	0,5
7	Làm khô lam máu	Lắc đều lam máu cho khô	0,4	0,8	1
8	Ghi mã số lên lam máu	Ghi mã số hoặc tên bệnh nhân lên lam máu	0,4	0,8	1
9	Tiêu chuẩn cần đạt	Chiều dài 2-3cm Có lưỡi ở cuối Không sọc, không ngấn Không răng cưa	1	0,8	4

Bài 5

KỸ THUẬT LẤY MÁU MAO QUẢN

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thao tác lấy máu mao quản thành thạo.*
2. *Trình bày được nguyên tắc lấy máu mao quản.*

1. NGUYÊN TẮC

Máu mao quản được chích lấy bởi một dụng cụ vô trùng với một độ sâu tiêu chuẩn để giọt máu chảy tự do.

2. DỤNG CỤ

- Kim chích vô trùng (Lancet)
- Gòn
- Cồn sát trùng 70%
- Băng cá nhân

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

- Để bệnh nhân ngồi hoặc nằm thoải mái.
- Chọn vị trí lấy máu ở đầu ngón áp út đối với người lớn; hoặc ở gót chân hay đầu ngón chân cái đối với trẻ em.
- Dùng bông gòn thấm cồn sát khuẩn vị trí lấy máu.
- Nắm nhẹ nhàng và căng vừa phải đầu ngón tay cho da được thẳng bằng cách dùng bàn tay trái, trong lúc bàn tay phải ta cầm dao vô trùng đâm nhanh một phát rất gọn vào đầu ngón tay sâu chừng 3mm. Vùng này ít gây sự đau đớn đối với bệnh nhân hơn ở vùng đỉnh và bề mặt đầu ngón tay vì ít có đầu các dây thần kinh cảm giác.
- Lau bỏ giọt máu đầu vì có thể bị lẫn với nước mô.

- Không nên nắn bóp để máu chảy nhanh, chỉ nên vuốt nhẹ nhàng ngón tay và cách xa chỗ chích.
- Khi đủ lượng máu cần thiết, dùng gòn khô đè nhẹ lên chỗ chích để máu ngừng chảy.

4. BIỆN LUẬN

- Kim chích tĩnh mạch không được dùng để lấy máu mao quản, vì mũi kim có lỗ dễ gây nhiễm trùng và vết thương không được rộng để máu thoát ra tự do và đủ để xét nghiệm.
- Tất cả các dao vô trùng chỉ nên dùng 1 lần cho một bệnh nhân.
- Hãy chờ cho cồn bốc hơi khô nơi sát trùng và để khô tự nhiên trước khi lấy máu, nếu không máu sẽ trào lên từng giọt nơi đầu ngón tay còn ướt.
- Nếu máu ít không chảy ra tự do, chúng ta nên chọn chỗ khác lấy máu lại.
- Số lượng bạch cầu giảm dần theo từng giọt máu và giọt máu thứ ba sẽ có số lượng bạch cầu bằng số lượng bạch cầu ở máu tĩnh mạch. Số lượng tiểu cầu cũng giảm theo từng giọt máu chảy trừ khi máu chảy ra được thong thả. Tuy nhiên chúng ta nên dùng giọt máu đầu hay giọt máu thứ hai để đếm tiểu cầu.
- Không lấy máu ở nơi bị phù nề, có u hoặc nghi tắc mạch.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày vị trí lấy máu mao quản.
2. Tại sao phải dùng cồn 70° mà không dùng nồng độ cao hơn hoặc thấp hơn?
3. Những điều cần tránh khi lấy máu mao quản?
4. Tại sao không nên dùng kim chích tĩnh mạch để lấy máu mao quản?
5. Tại sao khi sát trùng phải để khô trước khi lấy máu?

BẢNG KIỂM

Kỹ thuật lấy máu mao quản

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ hoá chất	Dụng cụ hoá chất phải đầy đủ	0,8	1,5	2
2	Sát trùng vị trí lấy máu	Sát trùng theo hình xoắn ốc	0,8	1,5	2
3	Thao tác chích	Đúng vị trí và độ sâu để máu chảy ra được tự do	0,8	1,5	2
4	Hứng lấy máu từ vết chích	Lấy đủ lượng máu bằng những dụng cụ cần thiết	0,8	1,5	2
5	Cầm máu	Dùng gòn khô vô trùng bịt kín vết thương sau đó dán băng cá nhân lên vết chích	0,8	1,5	2

Bài 6

KỸ THUẬT LẤY MÁU TĨNH MẠCH

MỤC TIÊU

1. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ để lấy máu tĩnh mạch.*
2. *Thực hiện thao tác lấy máu tĩnh mạch thành thạo.*

1. NGUYÊN TẮC

Lấy máu tĩnh mạch bằng cách chích kim vào tĩnh mạch với một bơm tiêm hay lấy trực tiếp qua kim chảy vào ống nghiệm.

2. DỤNG CỤ

- Bông gòn
- Cồn sát trùng 70°
- Dây garô
- Kim lấy máu và bơm tiêm
- Ống nghiệm có hay không có chất chống đông
- Băng cá nhân

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

- Tiếp đón, hỏi tên, tuổi, giải thích cho bệnh nhân yên tâm.
- Ống nghiệm đựng máu phải được dán nhãn ghi họ tên bệnh nhân, tuổi, số giường, phòng bệnh đúng như trên phiếu xét nghiệm của bệnh nhân.
- Kiểm soát xem pitton có xê dịch thong thả, dễ dàng trong lòng bơm tiêm và vát kim phải hướng lên trên.
- Bệnh nhân ngồi ngay ngắn, tay duỗi thẳng trên bàn. Nếu lấy máu tại giường thì tay bệnh nhân cũng duỗi thẳng trên giường.
- Vị trí lấy máu thường là tĩnh mạch khuỷu tay, mu bàn tay. Khi cần có thể lấy máu ở tĩnh mạch bẹn hay bộc lộ tĩnh mạch.

- Trẻ em có thể lấy máu ở tĩnh mạch cổ hay đầu.
- Thắt dây garô ở cánh tay, trên nếp khuỷu tay 10cm. Tránh cột quá chặt và không nên cột dây quá 2 phút trước khi lấy máu.
- Xác định vị trí lấy máu rồi sát khuẩn vị trí định lấy máu.
- Dùng ngón tay trỏ của bàn tay trái căng da nơi tĩnh mạch được chọn để lấy máu. Đầu ngón tay này cách nơi mũi kim đâm vào da 3cm ở phía trước và bên trái mũi kim. Tay phải cầm ống chích nghiêng 30° so với cánh tay duỗi thẳng của bệnh nhân, đầu ngón trỏ của tay phải giữ đầu kim và ống tiêm. Hạ thấp mũi kim xuống và đâm đầu kim vào da ngay trên tĩnh mạch, đẩy kim theo chiều song song với tĩnh mạch, xong hướng đầu kim vào tĩnh mạch bằng một động tác nhẹ nhàng ấn đầu kim vào lòng tĩnh mạch.
- Kéo lui pitton nhẹ nhàng và liên tục để lấy đủ lượng máu cần thiết.
- Khi lấy đủ lượng máu cần thiết, cho bệnh nhân mở tay nắm ra, ép bông gòn vào vị trí vừa chích lấy máu. Tháo dây garô trước khi rút nhanh kim ra khỏi tĩnh mạch.
- Đậy nắp mũi kim và lấy kim ra khỏi ống chích, rồi bơm nhẹ máu vào ống nghiệm để tránh máu khỏi bọt và hồng cầu khỏi bị vỡ. Máu lấy vào ống chống đông thì ta phải lắc nhẹ nhàng nhiều lần đến khi chất kháng đông tan hết, đậy nút kín.
- Sau khi cho máu vào ống nghiệm, hãy gắn kim vào ống chích trở lại cho vào nơi quy định để sau đó hủy bỏ.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Các vị trí thường chọn để lấy máu tĩnh mạch.
2. Các bước chuẩn bị khi lấy máu tĩnh mạch.
3. Các thao tác khi lấy máu.
4. Nêu cách làm nổi rõ tĩnh mạch.
5. Những điều cần tránh khi lấy máu tĩnh mạch.

BẢNG KIỂM

Kỹ thuật lấy máu tĩnh mạch

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ hóa chất để lấy máu tĩnh mạch	Dụng cụ và hóa chất phải đầy đủ.	0,5	1	1,5
2	Cột dây garô.	Cách vị trí lấy máu khoảng 10cm và không cột quá 2 phút trước khi lấy máu.	0,5	1	1,5
3	Sát trùng vị trí lấy máu.	Sát trùng theo hình xoắn ốc.	0,5	1	1,5
4	Thao tác chích tĩnh mạch.	Chích đúng tĩnh mạch để có thể lấy được máu.	1	1,5	2,5
5	Lấy kim ra khỏi tĩnh mạch bệnh nhân.	- Tháo dây garo - Rút kim ra khỏi tĩnh mạch. - Dùng gòn khô vô trùng đè lên vết thương 3-5 phút	0,5	1	1,5
6	Dặn bệnh nhân.	Dặn bệnh nhân đè lên vết chích, không được chà xát.	0,5	1	1,5

Bài 7

KỸ THUẬT NHUỘM TIÊU BẢN

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thao tác nhuộm Wright và nhuộm Giemsa đúng quy trình.*
2. *Trình bày được nguyên tắc nhuộm tiêu bản Wright và Giemsa.*
3. *Trình bày được nguyên nhân sai lầm và cách khắc phục.*

1. NHUỘM WRIGHT

1.1. Nguyên tắc

Nhuộm Wright là một phương pháp nhuộm tiêu bản máu dàn nhiều màu, gồm rượu methylic, phẩm methylen blue và eosin. Rượu methylic để cố định làn máu. Những phần tử ưa acid bắt màu eosin có màu hồng đến màu vàng nhạt. Những phần tử trung tính bắt màu tím. Xanh methylen nhuộm màu xanh các phần tử ưa kiềm. Eosin nhuộm màu hồng đến màu vàng các phần tử ưa acid.

1.2. Dụng cụ và thuốc thử

- Giá nhuộm
- Giá đựng lam
- Thuốc nhuộm Wright
- Dung dịch đệm Wright.

1.3. Tiến trình kỹ thuật

- Kéo lam máu dàn, để khô.
- Cố định bằng cồn 95°.
- Đặt làn máu nằm ngang trên giá nhuộm, làn máu hướng lên trên.
- Phủ thuốc nhuộm Wright lên làn máu. Để yên 2 phút (thời gian có thể thay đổi tùy đợt pha chế).

- Phủ dung dịch đệm Wright đầy làn máu nhưng không được để dung dịch tràn ra ngoài. Để yên 4 phút (tùy đợt pha chế).
- Rửa nhẹ làn máu với nước cất, dung dịch đệm hay nước thường.
- Lau sạch thuốc nhuộm phía sau lam máu dàn.
- Dựng lam máu dàn vào giá, để khô tự nhiên.

1.4. Nguyên nhân sai lầm

- Lam máu dàn quá dày; rửa không đủ; thời gian nhuộm quá lâu; thuốc nhuộm, dung dịch đệm hay nước rửa quá kiềm làm tiêu bản nhuộm quá xanh. Điều chỉnh bằng cách nhỏ từng giọt acid acetic 1% hay acid chlohydric 1% vào dung dịch đệm Wright nếu làn máu nhuộm quá kiềm.
- Thuốc nhuộm, dung dịch đệm hay nước rửa quá acid làm lam máu dàn nhuộm quá acid. Điều chỉnh bằng cách nhỏ từng giọt potassium bicarbonat 1% vào thuốc nhuộm Wright, nếu làn máu nhuộm quá acid.
- Rửa lâu, nhuộm thiếu thời gian, dung dịch đệm quá nhiều làm lam máu dàn có màu nhạt.
- Làn máu bị trôi một phần hay toàn bộ do rửa dưới vòi nước quá mạnh, làn máu chưa khô đem đi nhuộm.
- Rửa lam máu không kỹ hay nhuộm Wright ở nơi có gió mạnh, thuốc nhuộm Wright bốc hơi nhanh làm làn máu có cặn.
- Một lam máu dàn đã phai màu có thể phục hồi bằng cách rửa với rượu methylic 95% và rửa trở lại với nước thường, để khô, nhuộm lại với thuốc nhuộm Wright.

2. NHUỘM GIEMSA

2.1. Nguyên tắc (theo phương pháp Romanoski)

Các thành phần trong thuốc nhuộm, nhuộm màu các yếu tố hữu hình trong máu tùy theo tính kiềm hay tính acid của các yếu tố này.

Có nhiều cách nhuộm Giemsa, trong huyết học thường hay nhuộm Giemsa pha loãng tỉ lệ 1/10 trên lam máu dàn hoặc tủy dàn.

2.2. Dụng cụ và thuốc thử

- Giá nhuộm, ống đong hoặc cốc có vạch, pipette.
- Giemsa mẹ, cồn cố định (90°, 95° hoặc 99°)
- Lam máu dàn hoặc tủy dàn.

2.3. Tiến trình kỹ thuật

- Cố định tiêu bản bằng cách nhỏ 1 – 2 giọt cồn (từ 90° trở lên) trên lam máu dàn. Để khô tự nhiên.

- Pha thuốc nhuộm Giemsa 10% (10ml Giemsa mẹ với 90 ml dung dịch đệm).
- Đặt lam máu dàn cần nhuộm lên giá nhuộm.
- Phủ lên khắp lam máu dàn dung dịch Giemsa 10%.
- Thời gian nhuộm 5 đến 10 phút. Rửa nước thường cho sạch hết cặn.
- Dựng lam máu dàn đã nhuộm vào giá và để khô tự nhiên.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc của phương pháp nhuộm Wright và nhuộm Giemsa.
2. Trình bày những nguyên nhân sai lầm ảnh hưởng đến làn máu nhuộm.
3. Cách phục hồi một tiêu bản máu dàn cũ đã phai màu.
4. Tiến trình kỹ thuật nhuộm Giemsa.

BẢNG KIỂM

Kỹ thuật nhuộm Wright

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ thuốc thử để nhuộm tiêu bản	Dụng cụ và thuốc thử phải đầy đủ.	0,6	1,2	1,5
2	Đặt lam máu dàn lên giá nhuộm.	Mặt có làn máu hướng lên trên, lam máu phải đặt cân bằng.	0,6	1,2	1,5
3	Nhỏ thuốc nhuộm.	Khoảng 1ml phủ đều lên hết làn máu.	0,6	1,2	1,5
4	Canh thời gian.	Tùy theo quy định của đợt thuốc nhuộm, thường là 2 phút.	0,6	1,2	1,5
5	Nhỏ dung dịch đệm Wright.	Khoảng 1ml.	0,6	1,2	1,5
6	Rửa lam máu.	Rửa dưới vòi nước nhẹ nhàng, sau đó để khô tự nhiên.	0,6	1,3	1,5
7	Quan sát trên kính hiển vi để khảo sát lam máu.	Quan sát đúng theo quy trình và quy định.	0,6	0,7	1,0

CHƯƠNG II

KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC TẾ BÀO

Bài 8

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

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo kỹ thuật đếm số lượng bạch cầu.*
2. *Trình bày được nguyên tắc 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 trước bằng cách pha loãng mẫu máu với một dung dịch làm tan hồng cầu trong một ống hút pha loãng. Tỷ lệ pha loãng nhất định và cho một phần mẫu thử trộn đều vào buồng đếm của huyết cầu kế.

2. DỤNG CỤ - THUỐC THỬ

2.1. Dụng cụ

- Dụng cụ lấy máu mao quản hay lấy máu tĩnh mạch.
- Kính hiển vi quang học.
- Buồng đếm
- Ống pha loãng bạch cầu
- Máy lắc.

2.2. Thuốc thử

Dung dịch đếm bạch cầu có thể dùng dung dịch Lazarus, dung dịch Hayem

2.3. Mẫu thử

- Máu mao quản hay máu tĩnh mạch.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

Kiểm soát tên của bệnh nhân trên chai máu với tên trên phiếu thử hay tên của bệnh nhân với tên trên phiếu thử.

- Dùng ống pha loãng bạch cầu hút máu lên đúng vạch 0,5.
- Lau sạch đầu ống pha loãng bạch cầu.
- Cho đầu ống pha loãng vào dung dịch đếm bạch cầu, hút từ từ đến vạch 11, vừa hút vừa xoay nhẹ ống pha loãng.
- Ngừng hút khi đến vạch 11, lấy ống pha loãng ra khỏi dung dịch pha loãng, đặt ngón trỏ vào đầu của ống pha loãng, tháo dây hút ra.
- Dùng ngón cái và ngón trỏ bịt chặt 2 đầu ống pha loãng.
- Lắc đều để trộn đều máu với dung dịch pha loãng trong 3 phút. Lưu ý không để có bọt khi hút máu và trong dung dịch pha loãng.
- Buồng đếm phải thật sạch và khô.
- Thấm ướt hai bờ viền và dán lá kính.
- Mẫu thử sau khi trộn đều, bỏ đi 3 – 4 giọt đầu. Nhỏ 1 giọt hỗn dịch vào đầy buồng đếm sao cho lan tỏa khắp buồng đếm nhưng không tràn ra ngoài.
- Để lắng 2 phút.
- Dùng vật kính X10 để tìm vùng đếm và đếm bạch cầu.

3.1. Buồng đếm Neubauer: Đếm 4 ô vuông lớn (mỗi ô có 16 ô vuông nhỏ) ở 4 góc.

- Đếm lần lượt từng ô vuông lớn.
- Mỗi ô đếm tất cả các tế bào nằm trong 16 ô nhỏ.
- Đếm từ trái qua phải bắt đầu từ hàng thứ nhất.
- Rồi từ phải qua trái ở hàng kế tiếp và tiếp tục như thế.
- Đối với tế bào nằm tiếp xúc với đường phân chia thì chỉ đếm tế bào nằm ở phía trên và bên trái. Không đếm tế bào nằm ở phía dưới và bên phải.
- Tỷ lệ pha loãng 0.5/11: 0.5/10 = 1/20
- Chiều sâu buồng đếm: 1/10mm
- Diện tích 4 ô đếm được: $4mm^2$
- Thể tích 4 ô đếm được:

$$V = h \times s$$
$$= 1/10 \times 4 = 4/10 = 2/5\ mm^3$$

Gọi X là số bạch cầu đếm được trong 4 ô vuông (2/5mm^3), ta có:

X x 5/2 x 20 = 100/2 = 50

X x 50 BC/ mm^3 máu

3.2. Buồng đếm MALASSEZ

Đếm bạch cầu trong 1/2 buồng đếm tức là trong 5 dãy ngang 3, 4, 5, 6, 7.

- Thể tích buồng đếm là 1 mm^3.
- Thể tích 5 dãy đếm được 1/2 mm^3.

Gọi X là số bạch cầu đếm được trong 5 dãy ta có hệ số pha loãng là 1/20.

X x 2 BC/ 1 mm^3 máu pha loãng.

X x 2 x 20 BC/ mm^3 máu nguyên.

X x 40 BC/ mm^3 máu

3.3. Buồng đếm THOMA

Đếm bạch cầu trong toàn bộ buồng đếm gồm các dãy 1, 2, 3, 4 kể cả những đường viền xung quanh và đường kép.

- Thể tích buồng đếm: 0,1 mm^3 = 1/10 mm^3.

Gọi X là số lần bạch cầu đếm được trong toàn bộ buồng đếm và với hệ số pha loãng là 1/20.

Ta có: X x 10 x 20

X x 200 BC/mm^3 máu

4. TRỊ SỐ BÌNH THƯỜNG

- Trẻ sơ sinh: 9 x 10^9/L đến 30 x 10^9/L
- Trẻ em: 6 x 10^9/L đến 14 x 10^9/L
- Người lớn: 5 x 10^9/L đến 10 x 10^9/L.

5. BIỆN LUẬN

- Trong trường hợp số bạch cầu quá cao như trong bệnh ung thư máu, phải pha loãng với ống pha loãng hồng cầu. Khi đó máu được hút lên đến vạch 1, hút dung dịch pha loãng 101. Hệ số pha loãng là 1/100.
- Nếu bạch cầu dưới 2.500/mm^3 (trong suy tủy), hút máu đến vạch 1, hút dung dịch pha loãng vạch 11. Hệ số pha loãng là 1/10.

- Dung dịch pha loãng dùng để đếm bạch cầu làm tan tất cả các hồng cầu không nhân. Riêng hồng cầu có nhân không tan nên được đếm luôn trong khi đếm bạch cầu.

Nếu số hồng cầu có nhân thấy trên lam máu theo phương pháp nhuộm Wright lớn hơn 10% số bạch cầu đã xác định, thì số bạch cầu thực sự được tính theo công thức.

- Trên huyết cầu kế có X tế bào có nhân (BC + HCN)
- Trên phết máu ngoại biên cứ 100 BC có a tế bào có nhân, ta có:

(100 + a) TBCN → 100 BC

X TBCN → Y BC ?

$$\boxed{Y\ BC = \frac{X \times 100}{100 + a}}$$

Y là số bạch cầu thực sự đếm được.

Thí dụ:

Trên lam	:	100 BC có 25 HCN		
Trên huyết cầu kế	:	25.000 tế bào có nhân (TBCN)		
Lam	:	(100 + 25) TBCN	→	100 BC
Huyết cầu kế	:	25.000 TBCN	→	Y BC

$$Y = \frac{25.000 \times 100}{100 + 25} = \frac{2.500.000}{125} = 20 \times 10^9/L$$

6. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Buồng đếm có bụi bẩn.
- Ống pha loãng bẩn và bị mẻ đầu.
- Dung dịch pha loãng có cặn hoặc vẩn đục.
- Lấy máu không đúng quy cách: máu bị đông dây hoặc máu mao quản bị pha loãng bởi dịch gian bào do nặn bóp nhiều khi lấy máu.
- Không trộn đều máu và dung dịch pha loãng.
- Hút máu không đúng vạch quy định.
- Dán lá kính không đúng cách, không khít.
- Đếm tế bào không đúng: đếm sai, đếm không đủ ô.
- Tính kết quả sai.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày tiến trình kỹ thuật đếm bạch cầu.

2. Cho biết trị số bình thường của bạch cầu.

3. Cho biết các nguyên nhân sai lầm khi đếm bạch cầu?

4. Trong trường hợp nào chúng ta dùng pipette pha loãng hồng cầu để hút đếm bạch cầu? Giải thích.

BẢNG KIỂM

Kỹ thuật đếm số lượng bạch cầu

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ và hóa chất	Dụng cụ và hóa chất phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Lấy máu tĩnh mạch hoặc mao quản	Lấy và bảo quản máu phải đúng cách	0,4	0,8	1
3	Kiểm soát tên bệnh nhân với phiếu thử hoặc với ống máu	Đối chiếu kỹ lưỡng tên bệnh nhân.	0,4	0,8	1
4	Hút máu đến vạch 0,5 hoặc vạch số 2	Cột máu phải liên tục tránh có bọt khí hay cách quãng.	0,4	0,8	1
5	Chỉnh máu cho đúng vạch	Dùng giấy không thấm để chỉnh đúng vạch	0,4	0,8	1
6	Hút dung dịch pha loãng đúng vạch 101.	Hút dung dịch tránh không có bọt khí, không chạm đầu ống hút vào đáy lọ.	0,4	0,8	1
7	Lắc trộn đều máu và dung dịch pha loãng trong 3 phút	Lắc mạnh và đều.	0,4	0,8	1
8	Dán lá kính	Lá kính phải dính trên buồng đếm, tránh làm tràn dung dịch trên bờ viền.	0,4	0,8	1
9	Cho vào buồng đếm	Dung dịch cho vừa đủ không để tràn dung dịch trong buồng đếm	0,4	0,8	1
10	Đếm số lượng của bạch cầu	Đếm đúng, đủ số lượng tuân thủ nguyên tắc đếm.	0,4	0,8	1

Bài 9

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

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật đếm số lượng hồng cầu chính xác, thành thạo.*
2. *Trình bày được nguyên tắc đếm số lượng hồng cầu bằng kính hiển vi quang học.*

1. NGUYÊN TẮC

Đếm số lượng hồng cầu của máu toàn phần trong một thể tích đã biết trước bằng cách pha loãng máu với dung dịch đẳng trương đặc biệt trong ống hút pha loãng. Tỷ lệ pha loãng nhất định. Trộn đều và cho một phần mẫu thử vào buồng đếm của huyết cầu kế.

2. DỤNG CỤ - THUỐC THỬ

2.1. Dụng cụ

- Dụng cụ lấy máu mao quản hay tĩnh mạch
- Kính hiển vi quang học.
- Lá kính
- Dây hút, máy lắc, máy đếm tay.
- Buồng đếm
- Ống pha loãng hồng cầu

2.2. Thuốc thử

- Marcano
- Nước muối sinh lý (NaCl)

2.3. Mẫu thử

- Nếu lấy máu mao quản: chuẩn bị lấy máu ở ngón tay 3, 4.
- Nếu lấy máu tĩnh mạch: phải được chống đông bằng EDTA khô 1,5mg/ml.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

- Kiểm soát tên của bệnh nhân trên chai máu với tên trên phiếu thử hay tên của bệnh nhân với tên trên phiếu thử.
- Lắc kỹ ống máu. Nếu lấy máu mao quản phải thấm bỏ giọt máu đầu.
- Dùng ống hút pha loãng hồng cầu hút máu lên đúng vạch 0,5.
- Lau sạch đầu ống hút.
- Điều chỉnh vạch cho đúng với vạch 0,5 bằng cách chấm vào tờ giấy.
- Đưa đầu ống pha loãng vào dung dịch pha loãng, hút từ từ đến vạch 101, vừa hút vừa xoay nhẹ ống pha loãng.
- Ngừng hút khi đến vạch 101, rút ống pha loãng ra khỏi dung dịch pha loãng, đặt ngón trỏ vào đầu của ống pha loãng, tháo dây hút ra.
- Lắc ống pha loãng trong 3 phút, có 3 cách lắc:
  + Lắc hình số 8.
  + Đặt ống pha loãng vào khoảng lõm bàn tay trái ở vị trí nằm ngang, ngón cái và ngón trỏ tay phải, xoay tròn đều ống hút.
  + Lắc bằng máy lắc.
- Chú ý không để có bọt khi hút máu và dung dịch pha loãng.
- Thấm ướt hai bờ viền và dán lá kính lên buồng đếm khô và sạch.
- Mẫu thử sau khi trộn đều, bỏ đi 3 – 4 giọt đầu, lau khô đầu ống pha loãng. Cho hỗn dịch lan tỏa vào đầy buồng đếm nhưng không được tràn ra ngoài, để yên trong 2 phút.
- Dùng vật kính X10 để tìm vùng đếm và dùng vật kính X40 để đếm hồng cầu. Cách đếm tùy thuộc vào buồng đếm sử dụng.

3.1. Buồng đếm Neubauer

- Gồm có 9 ô vuông lớn. Đếm hồng cầu ở ô vuông lớn trung tâm.
- Ô vuông lớn trung tâm chia làm 25 ô trung bình. Đếm hồng cầu trong 5 ô: 4 ô ở 4 góc và 1 ô ở giữa.
- Ô vuông trung bình chia làm 16 ô nhỏ.
- Đếm lần lượt từng ô vuông trung bình.
- Mỗi ô, đếm tất cả các tế bào nằm trong 16 ô vuông nhỏ.
- Đếm từ trái qua phải, từ hàng đầu 4 ô nhỏ.
- Rồi từ phải qua trái ở hàng kế tiếp và tiếp tục như thế.

- Đối với tế bào nằm trên đường phân chia thì chỉ đếm tế bào nằm ở phía trên và bên trái. Không đếm tế bào nằm ở phía dưới và bên phải.
- Ghi kết quả đếm được của từng ô, cộng lại kết quả 5 ô đếm.

Cách tính kết quả

- Tỷ lệ pha loãng 0,5/101: 0.5/100 = 1/200
- Chiều sâu buồng đếm: 1/10mm
- Diện tích đếm: 5/25mm^2
- Thể tích 4 ô đếm được:

V = h x s

= 1/10 x 5/25 = 5/250 = 1/50 mm^3

Gọi X là số hồng cầu đếm được trong 1/50 mm^3 máu, ta suy ra được số hồng cầu đếm được trong mm^{3}máu toàn phần là:

X x 50 x 200

X x 10.000 HC/ mm^3 máu

3.2. Buồng đếm MALASSEZ

Đếm hồng cầu trong 4 ô của 4 góc:

- 5 dãy ngang: 1/5mm
- 4 dãy dọc: 1/4 mm
- Thể tích toàn phần: 1mm^3
- Diện tích đếm được: 1/ 20 x 4 = 4/ 20 = 1/5 mm^3
- Chiều sâu buồng đếm 1/ 5mm
- Thể tích hồng cầu đếm được / 4 ô: V= s x h =1/ 5 x 1/ 5 = 1/ 25.
- Hệ số pha loãng: 1/ 200.
- Gọi X là số hồng cầu đếm được trong 4 ô (1/ 25mm^3).
- Ta suy ra được số hồng cầu đếm được trong 1mm^3 máu:

X x 5.000 HC/ mm^3 máu

3.3. Buồng đếm THOMA

- Đếm hồng cầu trong 5 ô vuông lớn:
- Buồng đếm chia thành 16 ô vuông lớn (không kể đường viền)
- 1 ô vuông lớn chia thành 16 ô vuông nhỏ.

- Diện tích toàn buồng đếm là: $1mm^2$.
- Diện tích 1 ô vuông nhỏ: $1/400mm^2$ (cạnh 1/ 200mm x 1/ 20mm).
- Diện tích 1 ô vuông lớn: 1/ 400 x 16 = 16/ 400 = $4/100mm^2$.
- Diện tích 5 ô vuông lớn đếm được: 4/100 x 5 = 20/ 100 = $1/ 5mm^2$.
- Chiều cao buồng đếm: 1/ 10mm.
- Thể tích 5 ô vuông lớn đếm được: V = 1/ 5 x 1/ 10 = $1/ 50mm^3$.
- Hệ số pha loãng: 1/ 200.
- Gọi X là số hồng cầu đếm được trong 5 ô vuông lớn.
- Ta suy ra được số hồng cầu đếm được trong 1 mm^3 máu toàn phần.

X x 50 x 200

X x 10.000 HC/mm^3 máu

4. TRỊ SỐ BÌNH THƯỜNG

- Trẻ sơ sinh : 5×10^{12}/L đến 6×10^{12}/L
- Trẻ em : $3,8 \times 10^{12}$/L đến $5,4 \times 10^{12}$/L
- Người lớn :
  + Nữ : $3,8 \times 10^{12}$/L đến $4,2 \times 10^{12}$/L.
  + Nam : $4,2 \times 10^{12}$/L đến 5×10^{12}/L.

5. BIỆN LUẬN

Trong trường hợp số lượng hồng cầu quá cao:

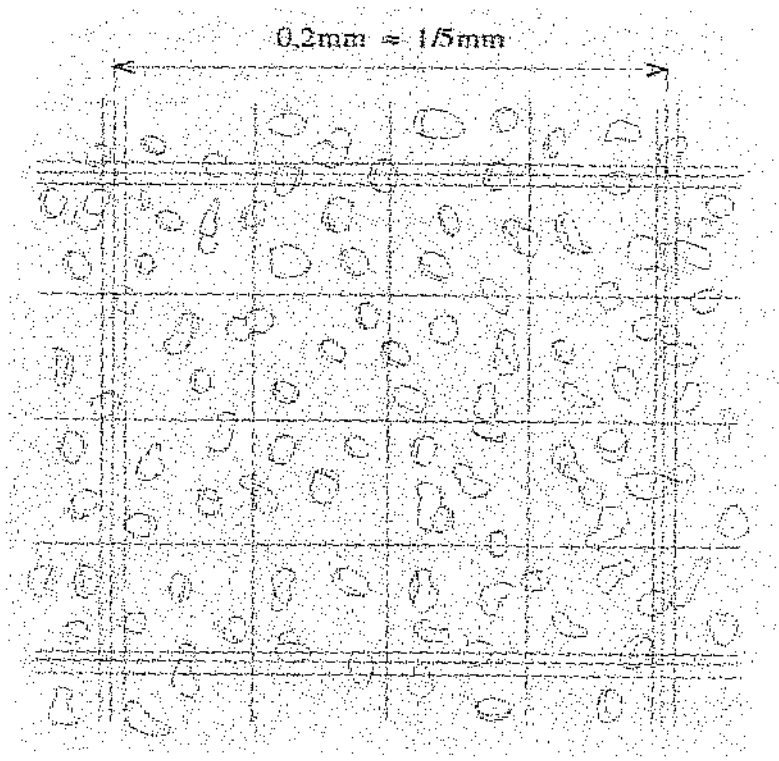
- Hút máu đến vạch số 0,3.
- Hút dung dịch pha loãng đến vạch 101.
- Hệ số pha loãng: 0,3/101 = 1/ 333.

Trong trường hợp số hồng cầu quá thấp:

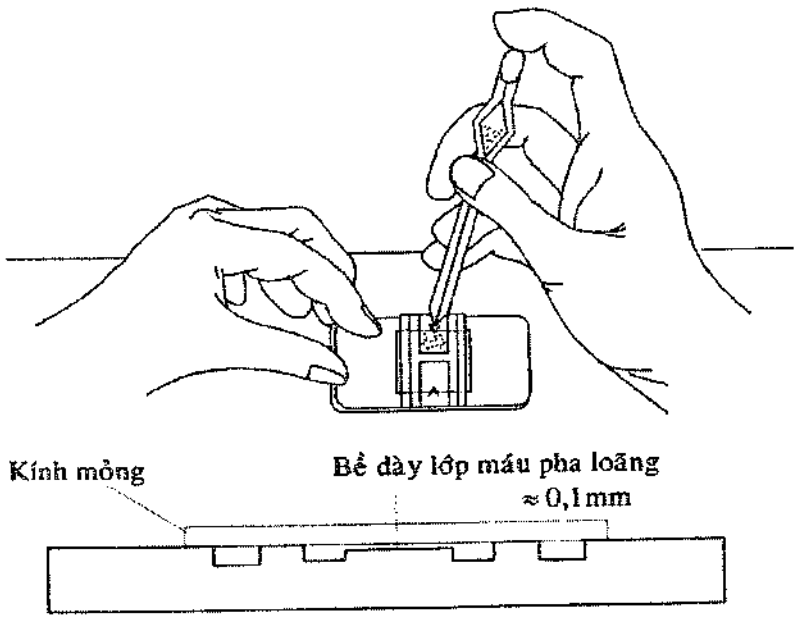
- Hút máu đến vạch số 1.
- Hút dung dịch pha loãng đến vạch 101.
- Hệ số pha loãng: 1/100.

6. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

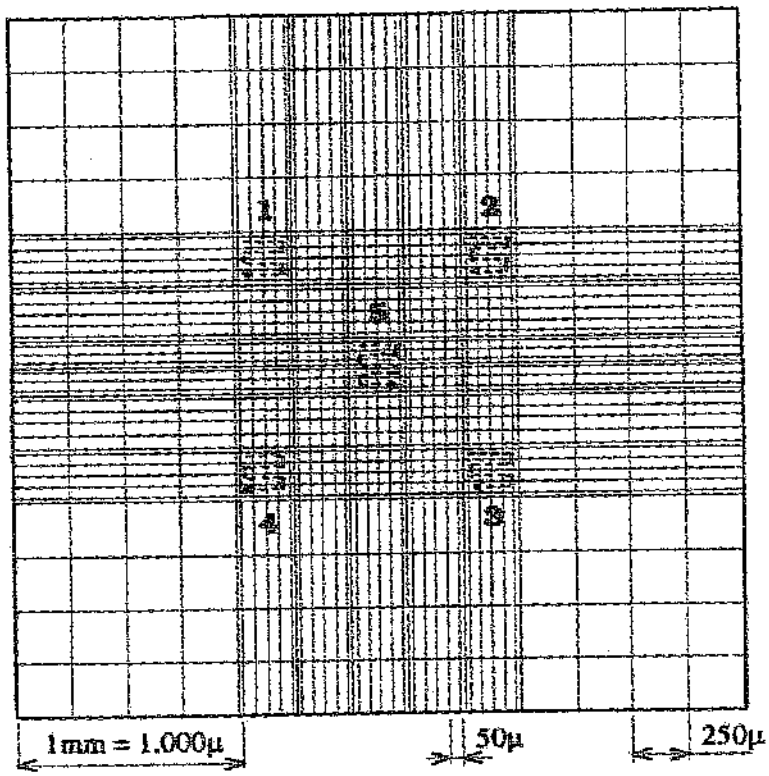
- Buồng đếm bẩn hay có nước.
- Ống pha loãng bẩn, ướt, sứt mẻ.
- Dung dịch pha loãng nhiều cặn hay vẩn đục.
- Lấy máu không đúng quy cách, đông dây, máu mao mạch bị pha loãng bởi dịch gian bào do nặn bóp đầu ngón tay nhiều khi chích máu.
- Không trộn đều máu và dung dịch pha loãng không chuẩn: hút máu không đúng vạch, dung dịch pha loãng thiếu hoặc thừa.
- Dán lá kính không đúng cách.
- Đếm tế bào không đúng: đếm sai, đếm không đủ ô.
- Tính sai kết quả.



Hình 9.1. Đếm hồng cầu trên ô quy định



Hình 9.2. Kỹ thuật châm đầy buồng đếm



Hình 9.3. Buồng đếm hiệu Neubauer loại cải tiến

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày tiến trình kỹ thuật đếm hồng cầu khi sử dụng buồng đếm Neubauer.

2. Cho biết trị số bình thường của hồng cầu.

3. Khi đưa ống pha loãng vào hút thuốc thử có nên để đầu ống pha loãng chạm vào đáy lọ thuốc thử không? Tại sao?

4. Tại sao dùng dung dịch đẳng trương để đếm hồng cầu? chúng ta có thể dùng dung dịch ưu trương hay nhược trương được không? Nêu lý do?

BẢNG KIỂM

Kỹ thuật đếm số lượng hồng cầu

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ và hóa chất	Dụng cụ và hóa chất phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Lấy máu tĩnh mạch hoặc mao quản	Lấy và bảo quản máu phải đúng cách	0,4	0,8	1
3	Kiểm soát tên bệnh nhân với phiếu xét nghiệm và với ống máu	Đối chiếu tên bệnh nhân kỹ lưỡng.	0,4	0,8	1
4	Hút máu	Cột máu phải liên tục, tránh có bọt khí hay cách quãng	0,4	0,8	1
5	Chỉnh máu cho đúng vạch	Dùng giấy không thấm để chỉnh đúng vạch.	0,4	0,8	1
6	Hút dung dịch pha loãng đúng vạch 101	Hút dung dịch tránh không có bọt khí, không chạm đầu ống hút vào đáy lọ.	0,4	0,8	1
7	Lắc trộn đều máu và dung dịch pha loãng trong 3 phút	Lắc nhẹ nhàng trộn đều dung dịch thuốc thử với máu.	0,4	0,8	1
8	Dán lá kính	Lá kính phải dính trên buồng đếm, tránh làm tràn dung dịch trên bờ viền.	0,4	0,8	1
9	Cho mẫu thử vào buồng đếm	Dung dịch vừa đủ không để tràn dung dịch trong buồng đếm.	0,4	0,8	1
10	Đếm số lượng hồng cầu	Đếm đúng, đủ số lượng tuân thủ nguyên tắc đếm, vùng đếm.	0,4	0,8	1

Bài 10

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

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật đếm số lượng tiểu cầu thành thạo, chính xác.*
2. *Trình bày được nguyên tắc 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 bằng cách pha loãng máu với một dung dịch đẳng trương và nhuộm màu đặc biệt trong ống pha loãng hồng cầu. Sau khi trộn đều, một phần mẫu thử được cho vào buồng đếm của huyết cầu kế.

2. DỤNG CỤ – THUỐC THỬ

- Dụng cụ lấy máu mao mạch hay máu tĩnh mạch
- Kính hiển vi quang học, máy lắc, máy đếm.
- Buồng đếm và lá kính.
- Ống pha loãng hồng cầu
- Dung dịch Marcano hay dung dịch Rees – Ecker.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

- Tráng ống pha loãng hồng cầu với dung dịch Rees - Ecker bằng cách hút dung dịch vào đầy ống pha loãng hồng cầu, sau đó thổi hết dung dịch ra khỏi ống pha loãng, bên trong lòng ống sẽ có một lớp mỏng dung dịch còn sót lại tráng hết thành ống.
- Hút máu mao quản (sau khi đã loại bỏ giọt máu đầu) hay máu tĩnh mạch đến vạch 0,5 và lau đầu ống hút.
- Hút nhanh dung dịch Rees - Ecker đến vạch 101.
- Dùng máy lắc hay lắc tay trong vài phút để trộn đều máu và dung dịch Rees - Ecker. Chú ý không để có bọt khi hút máu và dung dịch pha loãng, không hút máu quá vạch chuẩn.

- Nhỏ 4 - 5 giọt đầu bỏ đi, sau đó nhỏ mẫu thử vào 2 buồng đếm khô và sạch.
- Chờ 15 phút để cho các tiểu cầu lắng đọng và nằm yên trên buồng đếm. Để ngừa sự bốc hơi, buồng đếm được đặt lên 1 miếng vải thưa ướt và đậy lại bằng nắp hộp Petri.
- Dùng vật kính X40 để đếm tất cả các tiểu cầu nằm trên ô vuông lớn trung tâm, và đếm tiểu cầu ở cả 2 vùng đếm. Cách đếm như cách đếm hồng cầu.

Với sự điều chỉnh ánh sáng đúng và phải luôn luôn điều chỉnh ốc vi cấp, các tiểu cầu hiện ra bắt màu xanh dương lợt, óng ánh và có thể hình tròn, hình bầu dục, hình dấu phẩy, kích thước từ 2 – 5μm.

4. TÍNH KẾT QUẢ

Buồng đếm Neubauer

- Diện tích đếm: 1 mm
- Chiều cao huyết cầu kế 1/10mm.
- Thể tích bằng $1/10mm^3$
- Độ pha loãng bằng: 1/ 200
- Số tiểu cầu đếm được trong buồng đếm bằng X

$$TC/\ mm^3 = X \times 10 \times 200$$

$$\boxed{X \times 2000 = TC/mm^3 \text{ máu}}$$

5. TRỊ SỐ BÌNH THƯỜNG

$150 \times 10^9/L$ đến $350 \times 10^9/L$

6. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Lấy máu xét nghiệm không đúng quy cách: đông dây, máu mao mạch bị pha loãng bởi dịch gian bào do nặn bóp ngón tay nhiều khi chích máu.
- Dụng cụ không đủ tiêu chuẩn: huyết cầu kế bẩn, trầy xước, lá kính và ống pha loãng bẩn.
- Dung dịch pha loãng có cặn, vẩn đục.
- Dung dịch Rees - Ecker quá cũ, không được lọc trước khi dùng.
- Pha loãng không chuẩn: hút máu không đúng vạch quy định, dung dịch pha loãng thiếu hoặc thừa.
- Không trộn đều máu và dung dịch pha loãng.
- Đếm sai
- Tính kết quả sai.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc của đếm tiểu cầu

2. Dung dịch dùng để đếm tiểu cầu là dung dịch nào? Có thể dùng dung dịch đó để đếm hồng cầu được không? Tại sao?

3. Trình bày tiến trình kỹ thuật đếm tiểu cầu.

4. Nguyên nhân sai lầm khi đếm tiểu cầu.

BẢNG KIỂM

Kỹ thuật đếm số lượng tiểu cầu

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ và hóa chất	Dụng cụ và hóa chất phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Lấy máu tĩnh mạch hoặc mao quản	Lấy và bảo quản máu phải đúng cách	0,4	0,8	1
3	Kiểm soát tên bệnh nhân với phiếu xét nghiệm và với ống máu	Đối chiếu tên bệnh nhân kỹ lưỡng	0,4	0,8	1
4	Hút máu đến vạch 0,5 hoặc vạch số 2 chỉnh máu đúng vạch	Cột máu phải liên tục tránh có bọt khí hay cách quãng.	0,4	0,8	1
5	Hút dung dịch pha loãng đúng vạch 11	Hút dung dịch tránh không có bọt khí, hút lượng dung dịch vừa đủ, không chạm đầu ống pha loãng vào đáy lọ	0,4	0,8	1
6	Lắc trộn đều máu và dung dịch pha loãng trong 3 phút	Lắc mạnh và đều	0,4	0,8	1
7	Dán lá kính	Lá kính phải dính trên buồng đếm, tránh làm tràn dung dịch trên bờ viền huyết cầu kế	0,4	0,8	1
8	Cho mẫu thử vào buồng đếm	Dung dịch nhỏ vừa đủ không để tràn dung dịch trong buồng đếm	0,4	0,8	1
9	Ủ huyết cầu kế từ 1 - 3 phút	Đúng thời gian	0,4	0,8	1
10	Đếm số lượng của tiểu cầu	Đếm đúng, đủ số lượng, tuân thủ nguyên tắc đếm	0,4	0,8	1

Bài 11

ĐẾM HỒNG CẦU LƯỚI

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật đếm hồng cầu lưới thành thạo, chính xác.*
2. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ hóa chất.*
3. *Trình bày được nguyên tắc đếm hồng cầu lưới.*

MỤC ĐÍCH

Khảo sát hồng cầu lưới ở máu ngoại vi nhằm mục đích đánh giá khả năng sinh sản dòng hồng cầu của tủy xương, đánh giá khả năng đáp ứng của tủy xương đối với tình trạng thiếu máu của cơ thể.

1. NGUYÊN TẮC

Hồng cầu lưới là giai đoạn trung gian giữa hồng cầu có nhân và hồng cầu trưởng thành, đặc trưng là còn sót lại các mảnh ARN trong bào tương.

Có thể khảo sát hồng cầu lưới ở máu ngoại vi bằng cách nhuộm máu toàn phần với màu nhuộm siêu sinh (supravital stain) như Brilliant Cresyl Blue (BCB) hay Methylene Blue. Khi đó các mảnh ARN sẽ ăn màu thuốc nhuộm và biểu hiện dưới dạng hạt hoặc dây mảnh nằm rải rác trong hồng cầu.

Quan sát tiêu bản máu nhuộm với xanh cresyl, đếm số lượng hồng cầu lưới có trong 1000 hồng cầu và tính số lượng hồng cầu lưới trong $1mm^3$ máu.

2. DỤNG CỤ – HÓA CHẤT

2.1. Dụng cụ

- Lam kính, lam kéo
- Ống nghiệm khô và sạch
- Pipette Pasteur

- Bình cách thủy hoặc tủ ấm 37^0C
- Kính hiển vi quang học.

2.2. Hóa chất

- Thuốc nhuộm xanh crésyl (BCB)
  + Brilliant cresyl Blue 1g
  + Natri citrate ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) 0,4g
  + NaCl 0,9% 100ml
- Dung dịch BCB trong nước muối:
  + BCB 1g
  + Natri citrate 3,8% 20ml
  + NaCl 0,9% 80ml

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

- Cho vào ống nghiệm nhỏ, khô sạch, có ghi tên hoặc mã số bệnh nhân:
  + 2 giọt thuốc nhuộm BCB.
  + 2 giọt máu bệnh nhân lấy trực tiếp (máu mao quản) hoặc máu có chống đông bằng EDTA (máu tĩnh mạch).
- Lắc ống nghiệm hoặc dùng pipette Pasteur để trộn đều máu với thuốc nhuộm.
- Ủ ống nghiệm trong bình cách thủy 37^0C trong vòng 20 – 30 phút.
- Khi đủ thời gian, lấy ống nghiệm ra, lắc đều.
- Nhỏ một giọt máu nhuộm BCB lên lam kính. Kéo làn máu mỏng, để khô.
- Quan sát và đếm số lượng hồng cầu lưới có trong 1.000 hồng cầu với vật kính dầu. Tính tỉ lệ phần trăm hồng cầu lưới trong 1.000 hồng cầu trưởng thành hoặc số lượng hồng cầu lưới có trong 1 mm^3 máu.
  + Trên tiêu bản hồng cầu lưới có kích thước hơi lớn hơn hồng cầu trưởng thành (hồng cầu lưới 8 -10 μm; hồng cầu trưởng thành 7 - 8 μm). Hồng cầu lưới bắt màu xanh lá cây nhạt, hạt và dây lưới (ARN) bắt màu xanh dương đậm.
  + Chọn vùng quang trường hồng cầu nằm rải đều. Bằng vật kính dầu, đếm số hồng cầu lưới trên tổng số hồng cầu có trong quang trường đó, xong đổi qua quang trường khác (chọn liên tiếp). Đếm cho đến khi đủ 1.000 hồng cầu kể cả hồng cầu lưới.
  + Từ số lượng hồng cầu lưới đếm được trong 1000 hồng cầu, tính tỉ lệ bách phân hồng cầu lưới và số lượng hồng cầu lưới có trong 1mm^3 máu.

4. TÍNH KẾT QUẢ

4.1. Tỷ lệ bách phân hồng cầu lưới

Thí dụ: Trong 1.000 hồng cầu → có 5 hồng cầu lưới.

Suy ra trong 100 hồng cầu → có 0,5 hồng cầu lưới.

Vậy tỉ lệ phần trăm hồng cầu lưới là 0,5%.

4.2. Số lượng hồng cầu lưới trong 1 mm^3 máu

Phải kết hợp với đếm số lượng hồng cầu có trong 1mm^3 máu của bệnh nhân

Thí dụ:

Trong 1.000 hồng cầu → có 5 hồng cầu lưới.

Suy ra trong 4.000.000 hồng cầu → có 20.000 hồng cầu lưới /1mm^3 máu.

Vậy số lượng hồng cầu lưới là 20.000 hồng cầu lưới /1mm^3 máu.

5. TRỊ SỐ BÌNH THƯỜNG

*** Người lớn:**

- Tỷ lệ phần trăm: 0,5% → 1,5% hồng cầu lưới.
- Số lượng hồng cầu lưới tương đương: 25.000 → 75.000 / mm^3 máu.

*** Trẻ sơ sinh:**

- Tỷ lệ phần trăm: từ 2% → 6 %.
- Số lượng hồng cầu lưới tương đương 100.000 → 300.000 / mm^3 máu.

6. BIỆN LUẬN

6.1. Hồng cầu lưới tăng: tủy xương có khả năng đáp ứng tốt trước tình trạng thiếu hụt hồng cầu ở máu ngoại vi. Hồng cầu lưới tăng trong một số trường hợp:

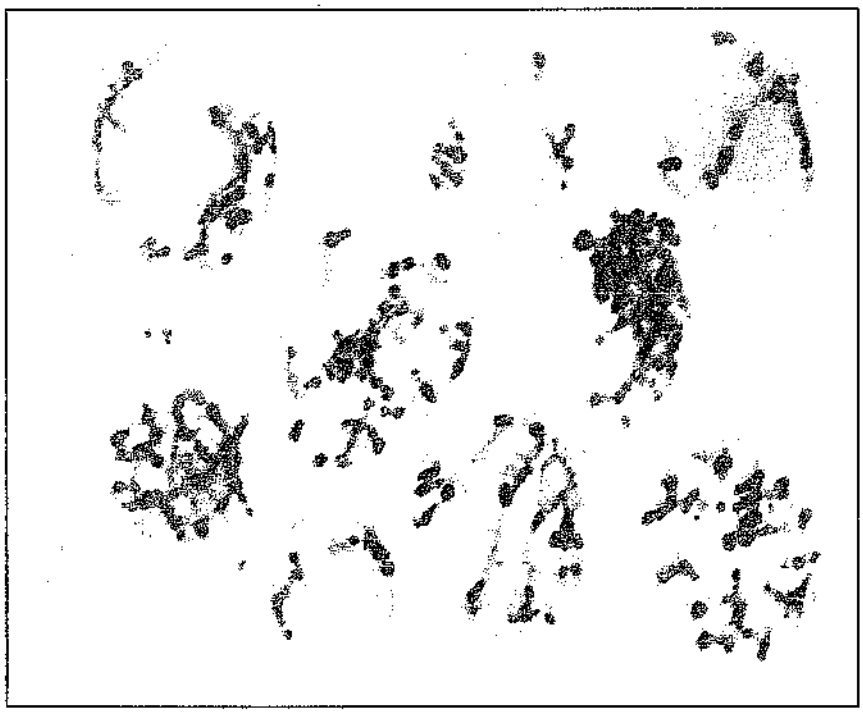
- Giai đoạn đầu của bệnh thiếu máu.
- Mất máu:
  + Do xuất huyết: sau chấn thương, tai nạn, phẫu thuật ...
  + Do tán huyết: nhiễm ký sinh trùng sốt rét, nọc rắn hổ mang ...
- Tăng nhẹ ở phụ nữ sau chu kỳ kinh.

6.2. Hồng cầu lưới giảm hoặc không tăng: khả năng đáp ứng của tủy xương kém trước tình trạng thiếu hụt hồng cầu ở máu ngoại vi. Hồng cầu lưới giảm trong những bệnh lý:

- Suy tủy
- Leukemia
- Thiếu nguyên liệu tạo hồng cầu: thiếu máu do thiếu sắt, vitamin B_{12}, acid folic hay thiếu máu ác tính.

7. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Đọc nhầm cặn thuốc nhuộm với các mảnh ARN trên hồng cầu lưới. Do đó nên lọc kỹ thuốc nhuộm trước khi dùng.
- Cần chú ý phân biệt hồng cầu lưới với hồng cầu có thể Heinz, vì thể Heinz cũng bắt màu nhuộm xanh cresyl nhưng nhạt hơn, kích thước to và thường nằm ở rìa hồng cầu.
- Lắc không đều khi lấy máu để ủ làm tiêu bản.



Hình 11.1. Hình ảnh hồng cầu lưới khi nhuộm xanh cresyl

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Đếm hồng cầu lưới nhằm mục đích gì?

2. Trình bày nguyên tắc của đếm hồng cầu lưới.

3. Cho biết trị số bình thường của hồng cầu lưới.

4. Hồng cầu lưới tăng biểu hiện của tình trạng gì? Tăng trong trường hợp nào?

5. Hồng cầu lưới trên làn máu trộn màu BCB và nhuộm lại với màu Wright cho kết quả như thế nào? Tại sao?

BẢNG KIỂM

Kỹ thuật đếm hồng cầu lưới

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ	Dụng cụ phải đủ, sạch, đúng	0,4	0,8	1
2	Chuẩn bị hóa chất	Hóa chất đúng, đủ	0,4	0,8	1
3	Kiểm tra bệnh nhân	Đối chiếu tên trên phiếu và trên mẫu máu	0,4	0,8	1
4	Lấy máu mao mạch hoặc tĩnh mạch	Thao tác đúng kỹ thuật.	0,4	0,8	1
5	Nhuộm máu với BCB	Đúng tỉ lệ, thao tác nhanh gọn	0,4	0,8	1
6	Lắc đều và ủ	Đúng nhiệt độ và đủ thời gian	0,4	0,8	1
7	Kéo tiêu bản máu nhuộm	Mỏng, đẹp, không quá dầy	0,4	0,8	1
8	Nhận định hồng cầu lưới	Xác định đúng hồng cầu lưới trên tiêu bản	0,4	0,8	1
9	Đếm và ghi kết quả	Tính tỉ lệ % và số lượng hồng cầu lưới đúng	0,4	0,8	1
10	Kết quả chung	Phù hợp	0,4	0,8	1

Bài 12

NHẬN ĐỊNH BẠCH CẦU

MỤC TIÊU

1. *Chọn đúng vùng trên tiêu bản máu để khảo sát bạch cầu.*
2. *Nhận định đúng, chính xác từng loại bạch cầu.*

1. NGUYÊN TẮC

Nhận định bạch cầu chủ yếu dựa vào tất cả các yếu tố sau đây:

- Kích thước.
- Hình dạng tế bào.
- Cấu trúc của nhân.
- Cách bắt màu của nhân, tế bào chất, các hạt của từng loại tế bào.

2. CHUẨN BỊ

- Làn máu đã nhuộm sẵn (nhuộm Wright hoặc Giemsa).
- Kính hiển vi.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT VÀ MÔ TẢ

Chọn nơi khảo sát tế bào là nơi hồng cầu nằm đều nhau hoặc chồng chít lên nhau, không chọn nơi hồng cầu quá dày hoặc quá thưa.

3.1. Bạch cầu hạt trung tính (Segmented Neutrophil)

- Tỉ lệ 41 – 74%.
- Kích thước khoảng 12 – 15 μm.
- Nhân thắt làm nhiều đoạn, thường gặp nhất từ 2 – 5 đoạn, tế bào càng già càng chia nhiều đoạn. Nhiễm sắc chất cấu tạo thô, bắt màu tím đậm.
- Nguyên sinh chất bắt màu hồng nhạt, có những hạt đặc hiệu trung tính.

3.2. Bạch cầu hạt toan tính (Segmented Eosinophil)

- Tỉ lệ 2 – 4%.

- Kích thước khoảng từ 10 – 15μm
- Nhân thắt làm nhiều đoạn, thường gặp nhất là 2 đoạn. Nhiễm sắc chất cấu tạo thô, dày, bắt màu đỏ tím.
- Nguyên sinh chất bắt màu hồng nhạt, chứa đầy các hạt đặc hiệu toan tính kích thước to khá đồng đều bắt màu vàng cam.

3.3. Bạch cầu hạt kiềm tính (Segmented Basophil)

- Tỷ lệ 0 – 1%.
- Kích thước khoảng 12μm.
- Nhân chia làm nhiều đoạn, thường gặp 2 – 4 đoạn.
- Nhiễm sắc chất thô, dày, bắt màu đỏ tím đậm.
- Nguyên sinh chất có nhiều hạt to, không đều, bắt màu tím đen, nằm rải rác đè cả lên nguyên sinh chất và nhân.

3.4. Tân bào (Lymphocyt)

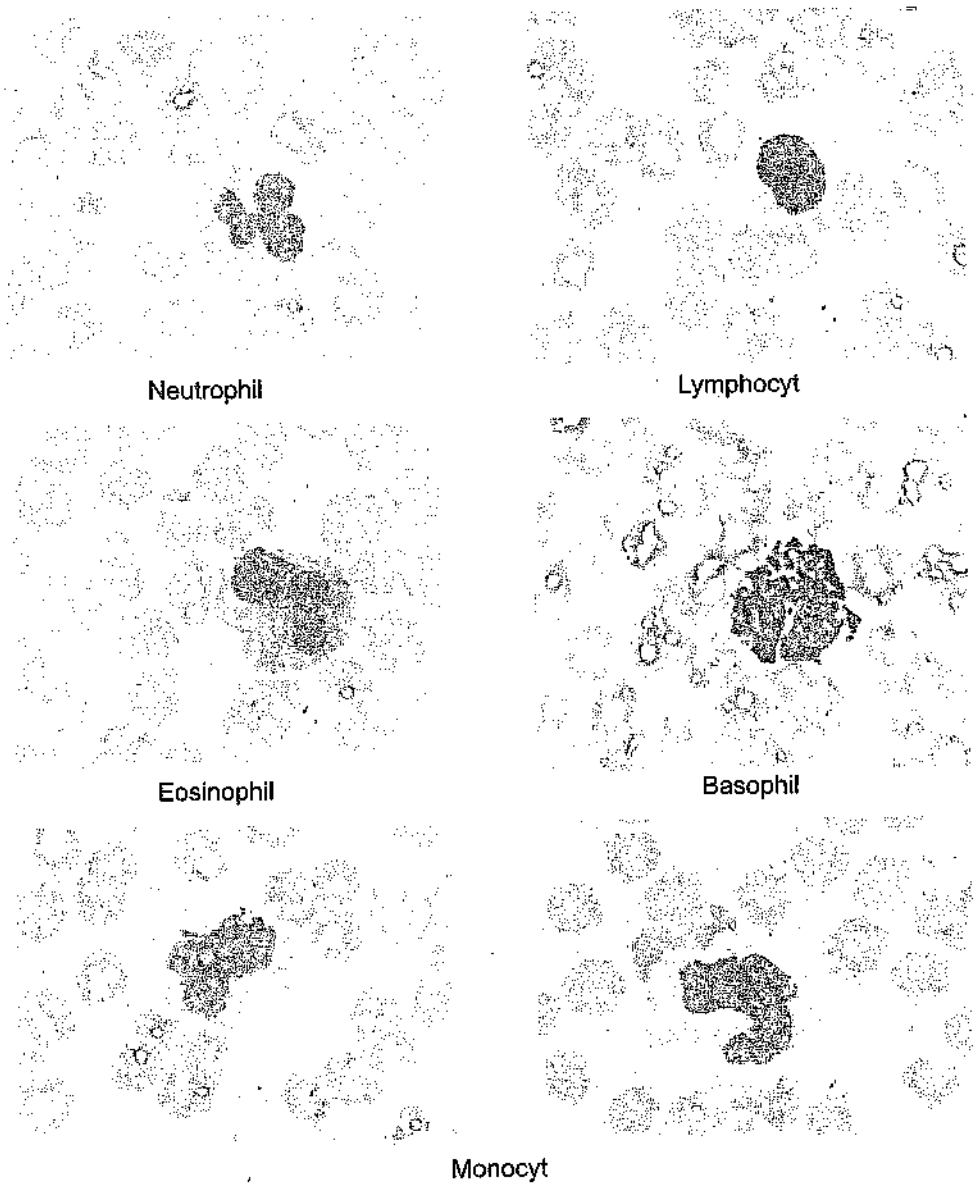
- Tỷ lệ 25 – 35%.
- Lymphocyt nhỏ:
  + Hình tròn, bầu dục hoặc kéo dài.
  + Kích thước từ 7 – 9μm.
  + Nhân tròn, lớn. Cấu trúc chất nhiễm sắc đậm, thô, đồng nhất hoặc tụ thành từng đám lớn.
  + Nguyên sinh chất hẹp, ưa kiềm nhẹ, không có hạt.
- Lymphocyt to:
  + Hình tròn, bầu dục hoặc kéo dài.
  + Kích thước 9 – 12μm.
  + Cấu trúc chất nhiễm sắc trong nhân mảnh hơn, đồng nhất.
  + Nguyên sinh chất rộng, ưa base nhẹ, có thể chứa vài hạt ưa Azurophil, kích thước lớn.

3.5. Đơn bào (Monocyt)

- Tỷ lệ 1 – 4%.
- Kích thước từ 20 – 25μm.
- Nhân nhiều hình dạng: giống hình não bộ, hình bầu dục, hình hạt đậu. Cấu tạo nhiễm sắc chất xốp, có màu đỏ tím nhạt.
- Nguyên sinh chất nhiều, màu xanh xám (màu tro bẩn), có một số hạt Azurophile nhỏ, rải rác màu tím hồng, đôi khi có không bào.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Mô tả bạch cầu hạt trung tính.
2. So sánh bạch cầu hạt trung tính và bạch cầu hạt toan tính.
3. Mô tả bạch cầu hạt kiềm tính.
4. So sánh lymphocyt và monocyt.



Hình 12.1. Hình ảnh các loại bạch cầu trên tiêu bản máu dàn

Bài 13

CÔNG THỨC BẠCH CẦU

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện công thức bạch cầu thành thạo, chính xác.*
2. *Chuẩn bị đủ dụng cụ, hóa chất.*
3. *Trình bày được nguyên tắc thực hiện công thức bạch cầu.*

1. NGUYÊN TẮC

Khảo sát làn máu mỏng ngoại vi đã nhuộm màu Wright hay Giemsa, nhận diện, đếm, và phân loại bạch cầu gặp được rồi ghi lại cho đến khi có được tổng số 100 bạch cầu. Tính tỷ lệ phần trăm của mỗi loại bạch cầu.

2. DỤNG CỤ – HÓA CHẤT

2.1. Dụng cụ

- Dụng cụ lấy máu mao quản hoặc tĩnh mạch.
- Lam kính khô sạch
- Kính hiển vi quang học.
- Dầu soi kính.
- Máy đếm công thức bạch cầu.

2.2. Hóa chất

Thuốc nhuộm Wright hoặc Giemsa.

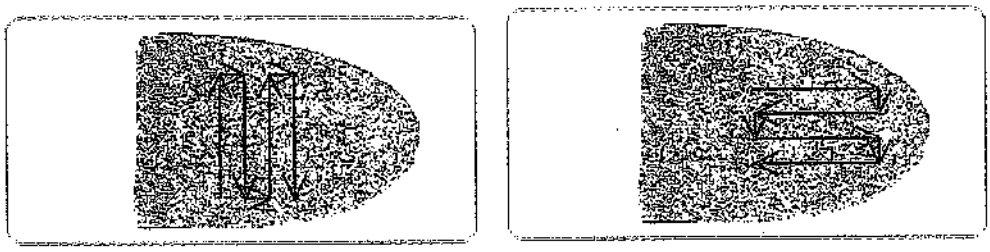
3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

Lấy máu mao quản hoặc máu tĩnh mạch, tiến hành làm tiêu bản kéo làn máu mỏng và nhuộm Wright hoặc nhuộm Giemsa. Để khô, quan sát dưới kính hiển vi.

Dùng vật kính X10 quan sát làn máu về sự phân phối tế bào và màu nhuộm.

Chọn vùng đếm là những vùng làn máu được trải mỏng và ăn màu tốt, hồng cầu nằm gần nhau, hơi nhích lên nhau. Thông thường là vùng gần khúc đuôi của làn máu mỏng.

Dùng vật kính X100 để nhận diện các loại bạch cầu và ghi nhận từng loại vào máy đếm công thức bạch cầu. Di chuyển quang trường từ trên xuống dưới và từ trái qua phải (hoặc từ phải qua trái) theo hai cách như hình vẽ, nhận diện và đếm các loại bạch cầu cho đến khi đủ 100 bạch cầu.



Hình 13.1. Cách đọc tế bào khi thực hiện công thức bạch cầu

Ghi kết quả theo thứ tự quy định như sau:

- Bạch cầu hạt trung tính
- Bạch cầu hạt ưa acid
- Bạch cầu hạt ưa base
- Lymphocyt
- Monocyt

4. TRỊ SỐ BÌNH THƯỜNG

4.1. Tính bằng tỉ lệ bách phân

Tên bạch cầu	Người trưởng thành (tỷ lệ phần trăm)	Trẻ em 10 tuổi (tỷ lệ phần trăm)	Trẻ sơ sinh
Bạch cầu thể gậy	1 - 4	4	6
Bạch cầu hạt trung tính	55 - 75	45 - 60	54 - 86
Bạch cầu hạt ưa acid	2 - 6	1 - 4	0 - 2
Bạch cầu hạt ưa base	0,1	0,1	0,0
Lymphocyt	25 - 35	40 - 59	10 - 38
Monocyt	1 - 4	6	0 - 7

4.2. Tính bằng trị số tuyệt đối (số lượng mỗi loại bạch cầu có trong $1mm^3$ máu): để có trị số tuyệt đối này, ta nhân tỉ lệ bách phân của mỗi loại với số lượng bạch cầu có trong $1mm^3$ máu.

Ví dụ: Lymphocyt = 20% = 0,2

Số lượng bạch cầu /1mm^3 = 5000/mm^3

Trị số tuyệt đối của lymphocyt = 0,2 x 5000 = 1000 /mm^3

- Trong khi làm bách phân bạch cầu nhớ khảo sát hồng cầu
  + Nếu có hồng cầu nhân xuất hiện ở máu ngoại vi, phải ghi nhận số lượng hồng cầu nhân trên tổng số 100 bạch cầu.
  + Lưu ý và ghi nhận những tích thể bất thường của hồng cầu như: thể Howell -Jolly.
  + Khảo sát cách phân bố của hồng cầu: có hiện tượng chuỗi hồng cầu hay hồng cầu tự kết cụm hay không.
  + Khảo sát màu sắc và kích thước của hồng cầu.
- Khảo sát tiểu cầu: ước lượng số lượng tiểu cầu trung bình có trong một quang trường giúp chúng ta có một ý niệm đại khái về sự tăng, giảm tiểu cầu. Đồng thời khảo sát về sự thay đổi kích thước của tiểu cầu, có sự hiện diện của tiểu cầu khổng lồ hay không (giant platelets).

5. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Tiêu bản quá dày hay quá mỏng.
- Thời gian nhuộm sai.
- Chọn vùng bách phân không đúng.
- Nhận diện tế bào sai.
- Đọc một bạch cầu hai lần.
- Đọc tế bào dễ, bỏ qua tế bào khó.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc làm công thức bạch cầu
2. Trình bày tiến trình kỹ thuật khi làm công thức bạch cầu
3. Cho biết tỷ lệ % của các loại bạch cầu ở người bình thường
4. Cho biết những sai lầm có thể mắc phải khi làm bách phân bạch cầu

BẢNG KIỂM

Công thức bạch cầu

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ	Dụng cụ đủ, sạch, đúng	0,4	0,8	1
2	Chuẩn bị hóa chất	Hóa chất đúng, đủ	0,4	0,8	1
3	Kiểm tra bệnh nhân	Đối chiếu tên trên phiếu và trên mẫu máu	0,4	0,8	1
4	Lấy máu mao mạch hoặc tĩnh mạch	Thao tác đúng kỹ thuật	0,4	0,8	1
5	Làm 2 tiêu bản máu dàn	Mỏng, đẹp	0,4	0,8	1
6	Nhuộm Wright hoặc Giemsa	Sạch, không cặn bẩn, làn máu không bị trôi	0,4	0,8	1
7	Khảo sát tiêu bản	Quan sát theo hệ thống	0,4	0,8	1
8	Sự bắt màu thuốc nhuộm của tế bào	Đúng, đẹp sạch	0,4	0,8	1
9	Nhận định 5 loại bạch cầu trên tiêu bản	Chính xác	0,4	0,8	1
10	Ghi kết quả vào phiếu xét nghiệm	Đúng	0,4	0,8	1

Bài 14

KỸ THUẬT ĐO THỂ TÍCH KHỐI HỒNG CẦU

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật đo thể tích khối hồng cầu thành thạo, chính xác*
2. *Chuẩn bị đủ dụng cụ, hoa chất*
3. *Trình bày được nguyên tắc đo thể tích khối hồng cầu bằng phương pháp vi lượng*

Thể tích khối hồng cầu là thể tích mà khối hồng cầu choán chỗ so với lượng máu toàn phần đã biết.

Có hai phương pháp đo thể tích khối hồng cầu

* Phương pháp Wintrobe: còn gọi là phương pháp đại lượng (macrohematocrit method).

* Phương pháp vi lượng (microhematocrit method).

So sánh giữa hai phương pháp thì phương pháp vi lượng được sử dụng phổ biến hơn.

1. PHƯƠNG PHÁP WINTROBE

1.1. Nguyên tắc

Máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA được cho vào ống nghiệm chuyên biệt (ống Wintrobe), đem ly tâm để kết lắng hồng cầu và đo chiều cao khối hồng cầu lắng đọng trong ống nghiệm.

Thể tích khối hồng cầu được xác định bằng tỉ lệ phần trăm giữa khối hồng cầu lắng đọng so với thể tích máu toàn phần trong ống nghiệm Wintrobe.

1.2. Chuẩn bị

1.2.1. Dụng cụ

- Dụng cụ lấy máu tĩnh mạch.
- Ống nghiệm Wintrobe khô, sạch.

- Ống hút (pipette) dài hay ống chích và kim dài.
- Máy quay ly tâm.

1.2.2. Hóa chất: chất chống đông EDTA cho máu tĩnh mạch.

1.2.3. Bệnh phẩm: 5ml máu tĩnh mạch

1.3. Tiến trình kỹ thuật

- Đánh dấu mã số hoặc tên bệnh nhân lên ống Wintrobe.
- Dùng pipette đầu dài hoặc ống chích gắn kim dài hút nhẹ máu đã chống đông bằng EDTA và cho từ từ vào ống nghiệm Wintrobe đến vạch số 100 (lưu ý: tránh gây ra các bọt khí lọt vào cột máu).
- Ống Wintrobe được đặt đối xứng nhau trong máy ly tâm và quay ly tâm với tốc độ 3000 vòng /phút trong thời gian 30 phút.
- Đọc kết quả: chiều cao cột hồng cầu lắng đọng là thể tích khối hồng cầu tính bằng phần trăm (đọc vạch số trên ống Wintrobe tương ứng với bề mặt ngang của lớp hồng cầu).

1.4. Nguyên nhân sai lầm

- Tỉ lệ máu và kháng đông không đúng.
- Không lắc đều ống máu trước khi lấy cho vào ống nghiệm Wintrobe.
- Thời gian ly tâm không đủ 30 phút.
- Có bọt khí trong ống Wintrobe.

2. PHƯƠNG PHÁP VI LƯỢNG (MICROHEMATOCRIT)

2.1. Nguyên tắc

Dựa vào trọng lực và mao lực, mao dẫn máu toàn phần vào một phần ống mao quản. Bịt kín đầu ống không có máu và ly tâm. Lực ly tâm làm hồng cầu lắng xuống thành khối.

Đọc kết quả trên bảng đọc vi thể tích.

Thể tích khối hồng cầu là tỉ lệ bách phân giữa khối hồng cầu trong một thể tích máu toàn phần.

2.2. Dụng cụ - hóa chất

2.2.1. Dụng cụ

- Dụng cụ lấy máu mao quản hay tĩnh mạch.
- Ống vi thể tích loại có tráng heparin hay loại thường.

- Máy ly tâm vi thể tích.
- Đất sét hay chất matis.
- Thước đo kết quả kèm theo máy.

2.2.2. Hóa chất: chất chống đông EDTA nếu bệnh phẩm là máu tĩnh mạch.

2.2.3. Bệnh phẩm: máu mao quản hay máu tĩnh mạch.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

3.1. Lấy máu vào ống vi thể tích: dùng 1 đầu ống mao quản mao dẫn máu vào ống đến khoảng 3/4 ống. Lưu ý:

- Nếu dùng máu tĩnh mạch có chất chống kháng đông, ta có thể dùng ống vi thể tích loại thường.
- Nếu dùng máu mao mạch: phải sử dụng ống vi thể tích loại heparin và phải lau bỏ giọt máu đầu để tránh lẫn máu với nước mô.
- Chỉ dùng một đầu ống mao quản để lấy máu, không cho máu chạy đến đầu còn lại.
- Lau sạch máu ở đầu ống vi thể tích.

3.2. Bịt kín đầu không dính máu bằng đất sét hay chất matis (5-7 mm bề sâu)

3.3. Ly tâm

- Để ống mao quản vào một trong những rãnh có đánh số trên mặt chuyển động tròn của máy ly tâm vi thể tích. Đầu đã bịt kín chạm vào mặt trong của vách ngoài mặt phẳng.
- Đậy nắp phẳng và nắp máy cẩn thận, kiểm tra vận tốc máy (10000vòng/1phút) và thời gian ly tâm (5 phút).
- Khi đủ thời gian máy tự động ngưng, khi máy ngừng hẳn mới được mở nắp và lấy ống vi thể tích.

3.4. Đo kết quả: đo bằng bảng đọc vi thể tích.

4. TRỊ SỐ BÌNH THƯỜNG

Nam: 40 L/L đến 54 L /L

Nữ: 37 L/L đến 47 L /L

5. BIỆN LUẬN

5.1. Thể tích khối hồng cầu tăng trong các trường hợp

- Đa hồng cầu.
- Mất nước, mất huyết tương.
- Hồng cầu ứ nước.

5.2. Thể tích khối hồng cầu giảm trong các trường hợp

- Thiếu máu, suy dinh dưỡng.
- Suy tủy.
- Ung thư máu cấp dòng bạch cầu.

5.3. Kỹ thuật này tiện lợi hơn phương pháp Wintrobe do: kỹ thuật đơn giản, thời gian nhanh hơn, lượng máu sử dụng ít.

6. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Ống vi thể tích bị gãy, bể. Tốt nhất là luôn luôn thực hiện hai ống vi thể tích cho mỗi bệnh nhân để ngừa một ống bị bể khi ly tâm.
- Thước đo và thể tích không đạt chuẩn.
- Máy ly tâm vi thể tích chưa được điều chỉnh vận tốc và thời gian phù hợp.
- Tỉ lệ chất chống đông và máu tĩnh mạch không đúng.
- Máu càng để lâu (quá 6 giờ) kết quả sẽ không chính xác do bị tiêu huyết hoặc huyết tương bay hơi.
- Lắc máu không đều trước khi mao dẫn.
- Đọc kết quả không chính xác:
  + Nhận sai danh số của ống.
  + Đọc lầm mức lắng đọng của hồng cầu:
- Sau khi ly tâm, nếu không đọc kết quả ngay thì phải đặt các ống vi thể tích ở tư thế thẳng đứng đúng theo danh số bệnh nhân. Nếu để các ống vi thể tích nằm ngang trong máy ly tâm quá 30 phút, lớp tế bào sẽ bị nghiêng xéo đi.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc của kỹ thuật đo thể tích khối hồng cầu bằng phương pháp vi lượng.

2. Trình bày tiến trình kỹ thuật đo thể tích khối hồng cầu bằng phương pháp vi lượng.

3. Hãy nêu những nguyên nhân sai lầm trong quá trình thao tác.

4. Cho biết trị số thể tích khối hồng cầu ở người bình thường

BẢNG KIỂM

Phương pháp vi lượng

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ	Dụng cụ đủ, sạch, đúng	0,4	0,8	1
2	Chuẩn bị hóa chất	Hóa chất đúng, đủ	0,4	0,8	1
3	Kiểm tra bệnh nhân	Đối chiếu tên trên phiếu và trên mẫu máu	0,4	0,8	1
4	Lấy máu mao mạch hoặc tĩnh mạch.	Thao tác đúng kỹ thuật	0,4	0,8	1
5	Mao dẫn 2 ống máu vi thể tích.	Đúng kỹ thuật, đủ lượng máu (3/4 ống)	0,4	0,8	1
6	Cho ống vi thể tích vào máy ly tâm	Đối xứng, đúng danh số bệnh nhân	0,4	0,8	1
7	Sử dụng máy ly tâm vi thể tích.	Đúng tốc độ	0,4	0,8	1
8	Đọc kết quả.	Đúng	0,4	0,8	1
9	Ghi kết quả	Đúng	0,4	0,8	1

Bài 15

ĐỊNH LƯỢNG HUYẾT SẮC TỐ

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật định lượng huyết sắc tố thành thạo.*
2. *Chuẩn bị đủ dụng cụ - thuốc thử.*
3. *Trình bày được các nguyên tắc định lượng huyết sắc tố.*

Hai phương pháp định lượng huyết sắc tố

* Phương pháp Sahli - Hellige (phương pháp so màu).

* Phương pháp Cyanmethemoglobin (phương pháp quang phổ kế).

1. PHƯƠNG PHÁP SAHLI – HELLIGE

1.1. Nguyên tắc

Máu toàn phần tác dụng với HCl 0,1N, huyết sắc tố trong hồng cầu sẽ bị biến thành acid hematin.

Tiến hành pha loãng acid hematin bằng nước cất và so sánh màu sắc giữa acid hematin đã được pha loãng với màu thủy tinh mẫu của tỷ sắc kế.

Đọc kết quả nồng độ huyết sắc tố trực tiếp trên ống nghiệm định lượng, tính bằng đơn vị gram /100 ml (g%).

1.2. Dụng cụ - thuốc thử

1.2.1. Dụng cụ: bộ huyết sắc kế Sahli gồm:

- Hộp so màu (tỷ sắc kế).
- Ống nghiệm định lượng có khắc số (chỉ sử dụng số ở mặt có ghi đơn vị từ 2 - 24 g%).
- Pipette Sahli,
- Đũa thủy tinh.

1.2.2. Hoá chất

- Dung dịch HCl 0,1 N (bảo quản không quá 1 tháng).
- Nước cất.

1.2.3. Bệnh phẩm: máu mao quản hoặc máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA.

1.3. Tiến trình kỹ thuật

- Cho HCl 0,1N vào ống nghiệm định lượng đến vạch (2g%).
- Nếu dùng máu mao quản: phải lau bỏ giọt máu đầu để tránh lẫn nước mô. Nếu dùng máu tĩnh mạch: lắc đều máu trước khi dùng.
- Dùng pipette Sahli hút máu (hút đến vạch 20 CMM). Lau máu dính mặt ngoài pipette và cho từ từ cho máu vào ống nghiệm định lượng đã có sẵn HCl.
- Dùng dung dịch trong ống nghiệm hút lên xuống tráng lại pipette 3 lần, sau đó dùng đũa thủy tinh trộn đều máu với HCl.

Lưu ý: khi cho máu vào HCl và khi trộn đều phải cẩn thận để tránh không làm nổi bọt trong ống nghiệm.

- Cho ống nghiệm vào hộp so màu và để yên 10 phút. Trong thời gian này, huyết sắc tố sẽ tác dụng với HCl tạo thành acid hematin có màu nâu sẫm (cường độ màu của acid hematin tăng dần và đạt cực đại sau 30 phút tuy nhiên ở cuối phút thứ 10 đã có 95% lượng hemoglobin bị biến thành acid hematin).
- Sau 10 phút, tiến hành pha loãng acid hematin trong ống nghiệm bằng nước cất. Nhỏ nước cất vào ống nghiệm từng giọt một. Sau mỗi lần nhỏ, dùng đũa thủy tinh khuấy đều. So sánh màu sắc của acid trong ống nghiệm với màu thủy tinh mẫu của tỷ sắc kế dưới ánh sáng tự nhiên.
- Tiếp tục pha loãng cho đến khi màu của hỗn hợp trong ống nghiệm trùng với màu của thủy tinh mẫu trong tỷ sắc kế thì ngưng việc pha loãng.
- Lấy ống nghiệm ra khỏi hộp so màu và đọc kết quả nồng độ huyết sắc tố trực tiếp trên ống nghiệm.
- Con số nằm ngang với mặt đáy cong của hỗn hợp acid trong ống nghiệm chính là giá trị nồng độ huyết sắc tố (được tính bằng g /100ml).

1.4. Trị số bình thường

Nam : 16 ± 2 g/100ml

Nữ : 14 ± 2 g/100ml

1.5. Biện luận

- Cần lưu ý những mẫu máu có số lượng bệnh bạch cầu cao, khi định lượng huyết sắc tố bằng phương pháp Sahli kết quả sẽ tăng so với giá trị thực. Mẫu máu có số lượng bạch cầu >100 x 10^9/L sẽ làm cho acid hematin đục hơn và tăng kết quả nồng độ huyết sắc tố từ 5% -10%.
- Huyết sắc tố F (HbF) của bào thai và methemoglobin không bị biến đổi thành acid hematin.
- Kỹ thuật định lượng huyết sắc tố bằng phương pháp Sahli là kỹ thuật so màu bằng mắt thường, kết quả sẽ bị sai số từ 15 - 25%. Do đó không dùng các kết quả của phương pháp Sahli để tính chỉ số máu (MCH, MCHC).

1.6. Nguyên nhân sai lầm

- Pipette hoặc ống nghiệm bẩn.
- Màu thủy tinh mẫu của tỷ sắc kế không đúng chuẩn.
- Dung dịch HCl để quá lâu hoặc pha không đúng nồng độ 0,1N.
- Không lắc đều ống máu.
- Lấy máu không chính xác.
- Làm nổi bọt trong ống nghiệm.
- Đọc kết quả sai, đọc kết quả vội vã hoặc không đủ điều kiện ánh sáng.

2. PHƯƠNG PHÁP QUANG PHỔ KẾ

2.1. Nguyên tắc

Khi cho máu toàn phần kết hợp với dung dịch Drabkin (dung dịch potassium ferricyanide và potassium cyanide), huyết sắc tố và các chất chuyển hóa của nó sẽ bị biến thành cyanmethemoglobin.

Đo mật độ quang học của dung dịch cyanmethemoglobin bằng quang phổ kế ở bước sóng 540nm.

Vì mật độ quang học tỷ lệ thuận với nồng độ huyết sắc tố nên ta tính được lượng huyết sắc tố của mẫu nghiệm.

2.2. Dụng cụ – hóa chất

2.2.1. Dụng cụ

- Dụng cụ lấy máu mao quản hay tĩnh mạch.
- Máy quang phổ kế có bước sóng 540nm.

- Ống nghiệm khô, sạch.
- Pipette thể tích 0,02ml.
- Ống hút có khắc vạch: 5ml, 10ml.

2.2.2. Bệnh phẩm: máu mao quản hoặc máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA.

2.2.3. Hóa chất

- Thuốc chống đông EDTA khô.
- Dung dịch Hemotrol chuẩn.
- Dung dịch Drabkin chuẩn đậm đặc pha sẵn: khi sử dụng, pha loãng 1/50 thành dung dịch Drabkin trực dụng.
  + Dung dịch Drabkin đậm đặc: 1 ml
  + Nước cất: 49 ml

2.3. Tiến trình kỹ thuật

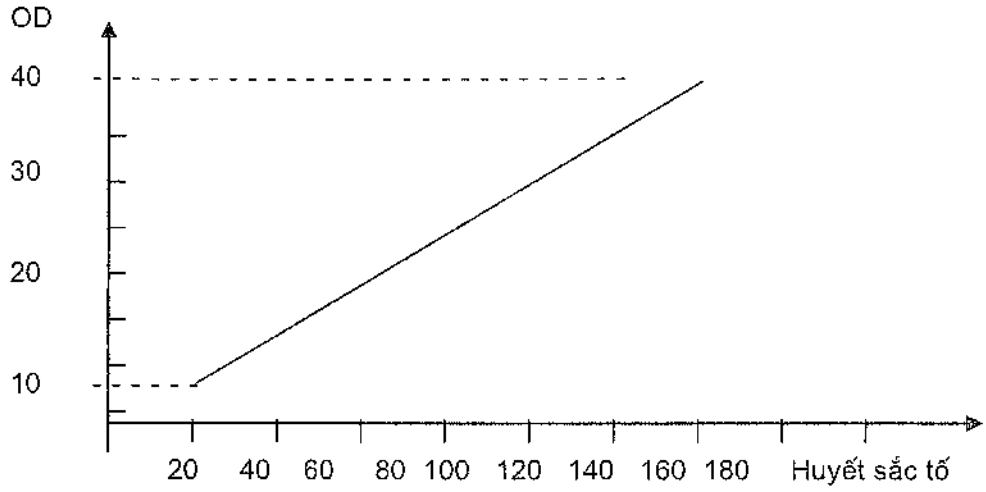
2.3.1. Thiết lập biểu đồ mẫu

- Sử dụng dung dịch cyanmethemoglobin chuẩn (dung dịch Hemotrol chuẩn) mà hiệu giá cyanmethemoglobin đã được xác định chính xác và ghi rõ trên mỗi mẫu vào khoảng 60mg/100ml. Nghĩa là mật độ quang học tương ứng với một mẫu máu chứa một lượng hemoglobin khoảng 15g/100ml khi được pha loãng trong dung dịch Drabkin (0,02ml trong 5ml Drabkin).
- Thực hiện trên một loạt ống nghiệm theo sơ đồ sau:

Số ống nghiệm / Dung dịch	1	2	3	Blank
Hemotrol	5ml	10ml	5ml	0 ml
DD Drabkin 1/50	0 ml	5 ml	10 ml	5ml
Nồng độ Hb (g/100ml máu)	15	10	5	0

- Chỉnh máy ở bước sóng 540 nm, độ truyền quang (transmittance) 100% với dung dịch Drabkin.
- Hút 5ml dung dịch trong các ống nghiệm 1, 2, 3 đổ vào 3 ống nghiệm cuvettes.
- Lần lượt đo độ hấp thu (OD) của dung dịch huyết sắc tố trong mỗi cóng.

- Sử dụng loại giấy có kẻ ô vuông nhỏ đặc biệt (semilogarithmic) để vẽ đồ thị, trục tung là độ hấp thu, trục hoành là phân lượng huyết sắc tố tính bằng gram.
- Vẽ đường biểu diễn với kết quả tính bằng độ hấp thu của 3 ống cóng kể trên. Ta sẽ có đường biểu diễn chuẩn, thẳng, đi ngang qua 3 điểm của kết quả nói trên.
- Mỗi tuần nên vẽ lại đường biểu diễn chuẩn này.



2.3.2. Đo mẫu xét nghiệm

- Dùng ống hút có khắc vạch hút 5ml dung dịch Drabkin 1/50 cho vào ống nghiệm khô sạch.
- Dùng pippte hút chính xác 0,02ml máu. Lau máu dính ở đầu ống.
- Thổi từ từ máu vào ống nghiệm chứa dung dịch Drabkin 1/50. Dùng dung dịch trong ống tráng lại pipette 3 lần.
- Dùng pipette trộn đều máu và dung dịch.
- Để yên 10 phút và nhận thấy dung dịch có màu vàng cam (do dung dịch Drabkin đã biến đổi hemoglobin thành methemoglobin).
- Đo kết quả
- Chỉnh máy ở bước sóng 540 nm, độ truyền quang (transmittance) 100% với thuốc thử Drabkin nguyên chất (hút 5ml dung dịch Drabkin vào một ống cuvette để làm ống cuvette mẫu – blank cuvette).
- Đổ hỗn dịch trong ống nghiệm vào cóng quang kế.
- Đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm, ghi kết quả.
- Đối chiếu với biểu đồ mẫu tính ra lượng huyết sắc tố.

2.4. Trị số bình thường

Theo Tổ chức Y tế thế giới:

Tuổi	Lượng Hb g /l
Trẻ em đủ tháng	136
Trẻ em 3 tháng	95
Trẻ em 1 tuổi	120
Phụ nữ không có thai	120
Phụ nữ có thai	130
Nam giới	130

2.5. Nguyên nhân sai lầm

- Độ pha loãng không chuẩn
- Huyết tương đục
- Bạch cầu quá cao
- Kính lọc mờ
- Lắc không đều
- Dung dịch Drabkin sử dụng không đúng nồng độ hoặc bị hỏng.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Nêu nguyên tắc định lượng hemoglobin bằng phương pháp Sahli -Hellige?

2. Nêu nguyên tắc định lượng hemoglobin bằng phương pháp Cyanmethemoglobin.

3. Hãy cho biết trị số hemoglobin của người bình thường khi định lượng bằng phương pháp Sahli - Hellige?

4. Cho biết những nguyên nhân sai lầm có thể mắc phải khi định lượng hemoglobin bằng phương pháp Sahli - Hellige?

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Dụng cụ	Dụng cụ đủ, sạch, đúng	0,4	0,8	1
2	Hóa chất	Hóa chất đúng, đủ	0,4	0,8	1
3	Bệnh nhân	Đối chiếu tên trên phiếu và trên mẫu máu	0,4	0,8	1
4	Cho HCl 0,1N vào ống nghiệm định lượng.	Đúng vạch 2g %	0,4	0,8	1
5	Hút máu bằng pipette Sahli, lau pipette	Đúng vạch 20µl, lau sạch máu dính mặt ngoài pipette	0,4	0,8	1
6	Thổi máu vào dung dịch HCl.	Không nổi bọt	0,4	0,8	1
7	Trộn máu và HCl.	Trộn đều, không nổi bọt	0,4	0,8	1
8	Chờ thời gian phản ứng.	Đủ 10 phút	0,4	0,8	1
9	Pha loãng hỗn dịch.	Đúng	0,4	0,8	1
10	Đọc và ghi kết quả.	Đúng	0,4	0,8	1

Bài 16

ĐO TỐC ĐỘ MÁU LẮNG

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật đo tốc độ máu lắng thành thạo.*
2. *Trình bày được nguyên tắc của kỹ thuật đo tốc độ máu lắng.*

Có hai phương pháp đo tốc độ máu lắng

* Phương pháp Pachenkow.

* Phương pháp Westergreen.

Hiện nay, phương pháp Westergreen được sử dụng phổ biến hơn.

1. PHƯƠNG PHÁP PACHENKOW

1.1. Nguyên tắc

Máu toàn phần được pha loãng với dung dịch chống đông natricitrat 3,8% và được cho vào một ống thủy tinh có chia vạch. Để yên ống ở tư thế thẳng đứng, sau một thời gian hồng cầu sẽ lắng xuống để lại lớp huyết tương ở bên trên.

Tốc độ lắng hồng cầu chính là chiều cao của cột huyết tương được hình thành khi hồng cầu đã lắng xuống sau một khoảng thời gian là 1 giờ và 2 giờ.

1.2. Dụng cụ – thuốc thử

- Ống lắng Pachenkow có 100 vạch (0 → 100)
- Giá dựng ống lắng
- Đồng hồ, ống nghiệm khô sạch
- Dung dịch chống đông natricitrat 3,8%
- Máu mao mạch hoặc tĩnh mạch. Lấy máu khi chưa ăn.

1.3. Tiến trình kỹ thuật

- Tráng ống Pachenkow bằng dung dịch chống đông natricitrat 3,8%.

- Dùng ống Pachenkow hút dung dịch chống đông natricitrat 3,8% đến vạch P (50) và thổi vào ống nghiệm khô, sạch.
- Dùng ống Pachenkow hút 2 lần máu đến vạch K (0) và thổi vào ống nghiệm đã có sẵn natricitrat 3,8%.
- Lắc đều máu và chất chống đông.
- Hút hỗn dịch máu đã chống đông ở trên vào ống Pachenkow đến vạch K (0).
- Lau máu dính ngoài thành ống.
- Cắm ống máu lắng lên giá, để yên ở tư thế thẳng đứng.
- Đọc kết quả sau 1 giờ và 2 giờ.

2. PHƯƠNG PHÁP WESTERGREEN

2.1. Nguyên tắc

Máu toàn phần được pha loãng với nước muối sinh lý (NaCl 0,85%) và được cho vào một ống thủy tinh có chia vạch. Để yên ống ở tư thế thẳng đứng, sau một thời gian hồng cầu sẽ lắng xuống để lại lớp huyết tương ở bên trên.

Tốc độ lắng hồng cầu chính là chiều cao của cột huyết tương được hình thành khi hồng cầu đã lắng xuống sau một khoảng thời gian là 1 giờ và 2 giờ.

2.2. Dụng cụ - thuốc thử

2.2.1. Dụng cụ

- Dụng cụ lấy máu tĩnh mạch.
- Ống lắng Westergreen
- Giá dựng ống lắng Westergreen.
- Đồng hồ, ống nghiệm khô sạch.

2.2.2. Hoá chất: dung dịch nước muối sinh lý (NaCl 0,85%).

2.2.3. Bệnh phẩm: 2 ml máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA.

2.3. Tiến trình kỹ thuật

- Dùng ống lắng Westergreen hút 50mm dung dịch NaCl 0,85% cho vào ống nghiệm khô sạch.
- Dùng ống lắng Westergreen hút 200mm máu tĩnh mạch có kháng đông EDTA (hút đến vạch 0). Lau máu dính ngoài ống lắng.
- Cho máu vào ống nghiệm đã có sẵn NaCl 0,85%.
- Lắc ống nghiệm vài lần để trộn đều hay dùng ống Westergreen hút lên xuống vài lần.
- Dùng ống Westergreen hút 200mm hỗn hợp máu – NaCl 0,85% (hút đến vạch số 0). Lau máu dính xung quanh ống.

- Cắm lên giá Westergreen ở tư thế thẳng đứng.
- Đọc kết quả sau 1 giờ, 2 giờ dựa vào chiều cao của cột huyết tương như phương pháp trên.

3. TRỊ SỐ BÌNH THƯỜNG

Phương pháp	Pachenkow		Westergreen	
	1 giờ	2 giờ	1 giờ	2 giờ
Nam giới	1 - 10 mm	7 - 15 mm	3 - 5 mm	7 - 10 mm
Nữ giới	2 - 13 mm	12 - 17 mm	4 - 7 mm	12 - 16 mm

4. BIỆN LUẬN

- Tốc độ máu lắng là một xét nghiệm không chuyên biệt, nó thay đổi tăng hoặc giảm trong nhiều nguyên nhân sinh lý cũng như bệnh lý. Do đó, đây không phải là xét nghiệm có ý nghĩa định bệnh. Tuy nhiên nó rất có ý nghĩa trong việc theo dõi diễn tiến một số bệnh

  Tốc độ máu lắng tăng trong bất kỳ bệnh nào có phản ứng viêm hay mô bị thoái hoá, sinh mủ, hoại tử. Giá trị lớn nhất của tốc độ máu lắng là dùng nó như một bằng chứng hiển nhiên biểu thị sự thuyên giảm hay phát triển của một diễn tiến bệnh lý.

  Tốc độ máu lắng ứng dụng hữu ích trong theo dõi điều trị lao, thấp khớp, nhiễm trùng kinh niên. Khi tốc độ máu lắng tăng biểu hiện bệnh đang tiến triển, tốc độ máu lắng giảm chứng tỏ bệnh đang thuyên giảm.

- Bình thường, tốc độ máu lắng ở nữ cao hơn nam. Trong thời kỳ mang thai, tốc độ máu lắng tăng dần trong 3 tháng đầu và trở lại bình thường sau khi sinh.

5. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Ống lắng bẩn, ướt, sứt mẻ.
- Kháng đông nhiều so với tỉ lệ máu (phương pháp Pachenkow) hoặc nước muối sinh lý pha không đúng nồng độ (phương pháp Westergreen).
- Tỷ lệ pha loãng thiếu chính xác
- Lắc trộn máu không đều
- Máu để quá lâu. Tốc độ lắng máu nên thực hiện trong vòng 2 giờ đầu sau khi lấy máu, càng để lâu tốc độ lắng máu càng tăng.
- Nhiệt độ thích hợp là 20-27°C. Nếu tiến hành xét nghiệm ở nơi có nhiệt độ cao, tốc độ lắng máu sẽ tăng.

– Ống lắng dựng trên giá bị nghiêng, sẽ làm tốc độ lắng máu tăng.

– Trong ống lắng có bọt không khí.

– Đọc kết quả không đúng mức hồng cầu lắng hoặc không đúng thời gian.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày giá trị của tốc độ máu lắng

2. Trình bày nguyên tắc kỹ thuật đo tốc độ máu lắng

3. Ống lắng đo tốc độ máu lắng phải dựng đứng 90^0 nếu chúng ta dựng nghiêng thì kết quả sẽ tăng hay giảm, lý do tại sao?

4. Cho biết nguyên nhân sai lầm có thể mắc phải khi thực hiện tốc độ máu lắng

5. Hãy cho biết tỷ lệ giữa máu và NaCl 0,85% trong phương pháp Westergreen? Nếu tỷ lệ này thay đổi thì kết quả bị ảnh hưởng như thế nào?

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Dụng cụ	Dụng cụ đủ, sạch, đúng	0,4	0,8	1
2	Hóa chất	Hóa chất đúng, đủ	0,4	0,8	1
3	Bệnh nhân	Đối chiếu tên trên phiếu và trên mẫu máu	0,4	0,8	1
4	Lấy máu tĩnh mạch	Thao tác đúng kỹ thuật	0,4	0,8	1
5	Lấy NaCl 0,85% vào ống nghiệm	Đúng kỹ thuật, đủ lượng NaCl (50 mm)	0,4	0,8	1
6	Hút vào ống Westergreen	Đúng kỹ thuật, đủ 200 mm máu	0,4	0,8	1
7	Phân phối máu và trộn đều với NaCl	Trộn đều, không nổi bọt	0,4	0,8	1
8	Hút hỗn hợp máu và NaCl và ống	Đúng 200 mm, không lẫn bọt khí	0,4	0,8	1
9	Dựng ống lắng lên giá	Đúng	0,4	0,8	1
10	Đọc kết quả	Đúng thời gian quy định, đọc đúng mức lắng đọng của hồng cầu	0,4	0,8	1

Bài 17

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

MỤC TIÊU

1. *Sử dụng thành thạo máy đếm tế bào.*
2. *Trình bày được nguyên lý cấu tạo và các thông số đo của máy đếm tế bào.*

1. NGUYÊN TẮC

Nguyên tắc căn bản là trở kháng bao gồm máy đếm tế bào tự động và bán tự động. Có hạn chế là kết quả phân loại bạch cầu chỉ chính xác, trong trường hợp hình thái bạch cầu bình thường. Loại máy sau này có nguyên tắc áp dụng tổng hợp cơ chế trở kháng; laser, xung điện 3 chiều nhuộm men peroxydase. Do đó, khả năng nhận diện tế bào được nâng lên, có thể nhận diện cả tế bào blast. Các máy hiện đại hơn như cell - Dyn 4000 SE-Avante còn có khả năng đếm hồng cầu lưới.

2. PHƯƠNG PHÁP SỬ DỤNG MÁY ĐẾM TẾ BÀO

2.1. Tám thông số cơ bản cho các máy đếm tế bào

- Số lượng hồng cầu: Red blood cell (RBC)
- Số lượng bạch cầu: White blood cell (WBC)
- Thể tích khối hồng cầu: Hematocirit (Hct)
- Lượng huyết sắc tố: Hemoglobine (HGB)
- Thể tích trung bình hồng cầu: Mean corpus Cular Volume (MCV)
- Lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu: Mean Corpus cular Hemoglobine (MCH)
- Nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu: Mean Corpus cular Hemoglobine Concentration (MCHC).
- Số lượng tiểu cầu: Platelet (PLT)

Một số máy có thể có thêm các thông số sau:

- Số lượng và tỷ lệ phần trăm của các loại bạch cầu.
- Độ dao động đường kính tiểu cầu: Platelet Distribution Wide (PDW)

– Thể tích trung bình tiểu cầu: Mean Platelet Volume (MPV)

– Độ dao động đường kính hồng cầu Red distribution Wide (RDW)

Bảng 17.1. Bảng tóm tắt các thông số cơ bản của máy đếm tế bào

STT	Từ viết tắt	Ý nghĩa (tiếng Anh)	Ý nghĩa (tiếng Việt)
1	WBC	White blood cell	Số lượng bạch cầu
2	RBC	Red blood cell	Số lượng hồng cầu
3	HGB	Hemoglobine (Hb)	Lượng huyết sắc tố
4	HCT	Hematocrit (Hct)	Thể tích khối hồng cầu
5	MCV	Mean Corpuscular Volume	Thể tích trung bình hồng cầu
6	MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin	Lượng huyết sắc tố trung bình hồng cầu
7	MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration	Nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu
8	PLT	Platelet	Số lượng tiểu cầu
9	Lym	Lymphocyte percent	Tỷ lệ bách phân tân bào
10	MID	Mixed cell percent	Tỷ lệ bách phân (bạch cầu đơn nhân, bạch cầu đoạn ưa acid, bạch cầu đoạn ưa base)
11	GRAN	Neutrophile percent	Tỷ lệ bách phân bạch cầu đoạn trung tính
12	Lym #	Lymphocyte count	Số lượng tuyệt đối của lymphocyt tân bào
13	GRAN	Neutrophile count	Số lượng tuyệt đối của bạch cầu hạt trung tính
14	RDW	Red distribution Wide	Độ.dao động đường kính hồng cầu
15	PDW	Plated distribution Wide	Độ dao động đường kính tiểu cầu
16	MPV	Mean platelet volume	Thể tích trung bình tiểu cầu

2.2. Chuẩn máy đếm tế bào

– Dùng máy đếm các mẫu máu chuẩn có đủ 3 mức thấp, trung bình, cao.

– Đối chiếu kết quả với các thông số của bộ máu chuẩn.

– Tính hệ số chênh lệch giữa kết quả thu được và thông số của máu chuẩn điều chỉnh hệ số chuẩn của máy.

– Kết quả thu được của quá trình chuẩn máy phải nằm trong khoảng dao động cho phép với cả 3 mức.

2.3. Nguyên tắc sử dụng máy

– Nơi đặt máy phải sạch, khô, mát. Môi trường làm việc tốt nhất là 23°C ± 1°C.

– Phải cử một người hoặc một nhóm nhỏ người chuyên biệt sử dụng máy.

– Phải tuân thủ đúng quy trình sử dụng máy và bảo dưỡng thường xuyên.

- Phải dùng đúng hóa chất theo loại máy và chất chống đông là EDTA chuẩn.
- Phải có dây đất chống nhiễu đúng quy cách.

3. THUỐC THỬ

- Dung dịch pha loãng: Diluent...
- Dung dịch rửa máy sau mỗi lần thực hiện mẫu thử: Detergent...
- Dung dịch rửa máy cuối mỗi ngày sử dụng: Enzymatic clean concentrate.

4. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Những yếu tố gây tăng hồng cầu giả tạo:
  + Tiểu cầu to.
  + Có kháng thể ngưng kết lạnh.
- Những yếu tố gây giảm hồng cầu giả tạo:
  + Người có yếu tố ngưng kết lạnh.
  + Người có chất ngưng kết với chất chống đông EDTA.
  + Hồng cầu bị vỡ.
  + Hồng cầu quá nhỏ.
- Những yếu tố gây tăng huyết sắc tố giả tạo:
  + Số lượng bạch cầu quá cao.
  + Bệnh Kahler.
  + Huyết tương đục.
- Những yếu tố gây ảnh hưởng đến số lượng bạch cầu:
  + Tăng sinh số lượng bạch cầu giả tạo do có hồng cầu nhân xuất hiện máu ngoại vi.
  + Giảm số lượng bạch cầu giả tạo do máu để lâu...
- Những yếu tố gây ảnh hưởng đến số lượng tiểu cầu:

  Tăng số lượng tiểu cầu giả tạo có thể do hồng cầu quá nhỏ, bệnh Thalassemi...

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc cấu tạo của máy đếm tế bào.
2. Cho biết những nguyên nhân sai lầm sử dụng máy đếm tế bào.
3. Cho biết các thông số căn bản của máy đếm tế bào.
4. Thực hiện thao tác chuẩn máy đếm tế bào.
5. Phương pháp sử dụng máy đếm tế bào.

Bài 18

HUYẾT ĐỒ

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật huyết đồ thành thạo.*
2. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ, hoá chất.*
3. *Trình bày được nguyên tắc của huyết đồ.*

1. NGUYÊN TẮC

Nhiều tình trạng sinh lý và bệnh lý của cơ thể được phản ánh qua số lượng, hình thái và thành phần các tế bào máu. Huyết đồ là sự tổng kết toàn bộ các biểu hiện đó nên giúp ích rất nhiều cho lâm sàng trong chẩn đoán bệnh lý.

Các thông số cần thiết gồm:

- Số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu
- Hematocrit
- Lượng huyết sắc tố
- Tốc độ máu lắng
- 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.
- Các chỉ số hồng cầu: MCV, MCH, MCHC.

2. DỤNG CỤ - THUỐC THỬ

2.1. Dụng cụ

- Dụng cụ lấy máu tĩnh mạch.
- Dụng cụ dùng đếm số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu.
- Dụng cụ đo thể tích khối hồng cầu, kéo lam, nhuộm Wight.
- Dụng cụ định lượng huyết sắc tố.
- Kính hiển vi quang học.

2.2. Thuốc thử

- Dung dịch pha loãng để đếm hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu
- Thuốc nhuộm Wright hay Giemsa
- HCl 0.1 N, nước cất

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

- Lấy máu tĩnh mạch.
- Đếm số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu.
- Định lượng huyết sắc tố, đo thể tích khối hồng cầu.
- Kéo lam, nhuộm Wright hay Giemsa để thực hiện công thức bạch cầu kèm theo quan sát đặc điểm hình thái hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu.
- Kéo tiêu bản nhuộm hồng cầu lưới để tính tỷ lệ phần trăm hồng cầu lưới.
- Đo tốc độ máu lắng.
- Đối chiếu các thông số đo, đếm được với quan sát thực tế tiêu bản máu.
- So sánh các thông số với giá trị tham chiếu của người khỏe mạnh. Cần lưu ý đến tuổi và giới của bệnh nhân.

4. KHẢO SÁT TÍNH CHẤT LÀN MÁU VỀ HỒNG CẦU, BẠCH CẦU, TIỂU CẦU

4.1. Khảo sát hồng cầu

- Số lượng: bình thường, tăng hay giảm mức độ tăng giảm, đặc điểm phân bố (bình thường, ngưng kết, chuỗi tiền).
- Hồng cầu nhược sắc hay bình sắc.
- Kích thước có đồng đều hay không.
- Hình dạng hồng cầu có bình thường không, có hồng cầu hình bia, hồng cầu hình liềm, hồng cầu hình giọt nước, có sự hiện diện của hồng cầu non hay không?
- Tỷ lệ phần trăm hồng cầu lưới bình thường, tăng hay giảm?

4.2. Khảo sát bạch cầu

- Số lượng bạch cầu: bình thường, tăng hoặc giảm.
- Hình thái bạch cầu có bình thường không (có sự hiện diện của bạch cầu đa nhân nhiều múi, hoặc có sự hiện diện của hạt độc trong tế bào chất)?
- Nhận xét từng loại bạch cầu quan sát trên tiêu bản máu, xác định được mức độ biệt hóa của từng loại tế bào, có sự xuất hiện của tế bào blast hay không?

4.3. Khảo sát tiểu cầu

- Hình dạng và kích thước có bình thường hay không, có tiểu cầu khổng lồ hay không?
- Độ tập trung của tiểu cầu có bình thường hay không, tăng hay giảm?
- Số lượng tiểu cầu có bình thường không?

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Nêu ý nghĩa xét nghiệm huyết đồ.
2. Các yếu tố cần thiết khi khảo sát hồng cầu.
3. Các yếu tố cần thiết khi khảo sát bạch cầu.
4. Các yếu tố cần thiết khi khảo sát tiểu cầu.
5. Trình bày tiến trình kỹ thuật khi làm xét nghiệm huyết đồ.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ, thuốc thử	Dụng cụ, thuốc thử phải đúng và đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Kiểm tra bệnh nhân	Đối chiếu tên trên mẫu máu và tên trên phiếu xét nghiệm	0,4	0,8	1
3	Đếm hồng cầu	Đúng tiến trình kỹ thuật	0,4	0,8	1
4	Đếm bạch cầu	Đúng tiến trình kỹ thuật	0,4	0,8	1
5	Đếm tiểu cầu	Đúng tiến trình kỹ thuật	0,4	0,8	1
6	Thực hiện công thức bạch cầu, khảo sát làn máu	Đúng vùng quy định, nhận định chính xác tế bào	0,4	0,8	1
7	Đo tốc độ máu lắng	Đúng tiến trình kỹ thuật	0,4	0,8	1
8	Định lượng huyết sắc tố.		0,4	0,8	1
9	Đếm hồng cầu lưới	Đúng tiến trình kỹ thuật	0,4	0,8	1
10	Tính chỉ số hồng cầu	Đúng tiến trình kỹ thuật	0,4	0,8	1

Bài 19

TỦY ĐỒ

MỤC TIÊU

1. *Chuẩn bị được đầy đủ dụng cụ, hóa chất để chọc tủy và làm tiêu bản tủy.*
2. *Trình bày được tiến trình kỹ thuật khảo sát tủy đồ.*
3. *Trình bày được công thức tủy đồ người bình thường và các biến đổi bệnh lý.*

Tủy đồ là xét nghiệm khảo sát số lượng và hình thái các tế bào tủy để thăm dò chức năng tạo máu và tìm các nguyên nhân gây rối loạn chức năng tạo máu ở tủy xương.

1. DỤNG CỤ, HÓA CHẤT

- Dụng cụ sát trùng: cồn iod 5%, bông
- Kim chọc tủy
- Bơm tiêm
- Ống nghiệm K_2 hoặc K_3 EDTA.
- Bộ dụng cụ làm tiêu bản tủy
- Thuốc nhuộm Giemsa.

2. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

2.1. Kỹ thuật

Có nhiều vị trí nhưng thường chọc tủy ở xương ức và gai chậu sau trên.

- Vị trí xương ức: bệnh nhân nằm ngửa, chọn giao điểm đường giữa xương ức nối và kẽ liên sườn 2 – 3 (ít sử dụng).
- Vị trí gai chậu sau trên: bệnh nhân nằm sấp thoải mái, kẻ nối hai mào chậu với nhau, kẻ tiếp một đường nối 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.

- Sát trùng vị trí chọc tủy bằng cồn iod 1% từ 2 – 3 lần, trải khăn vô trùng.
- Gây tê ngoài da và màng xương với novocain 1-3%, 1 - 2ml, chờ vài phút.
- Cầm kim chọc tủy tay phải, tay kia dùng ngón cái và ngón trỏ căng da và cố định vị trí chọc.
- Kim chọc thẳng góc với da, vừa xoay vừa ấn từ từ để điều chỉnh nông sâu của kim.
- Khi đầu kim nằm đúng tổ chức tủy thì rút nòng kim, lắp bơm tiêm và cố định chặt.
- Hút gọn và nhanh dịch tủy khoảng 0,5ml.
- Rút bơm tiêm, lắp nòng thông lại và rút kim.
- Bơm 0,3ml dịch tủy vào ống nghiệm có chống đông khô, lắc đều, đếm số lượng tế bào tủy.
- Bơm dịch tủy trên một lam kính để làm tiêu bản. Làm tiêu bản tủy gồm 6 tiêu bản tủy dàn và 2 tiêu bản tủy ép. Cố định tiêu bản. Nhuộm Giemsa và quan sát trên kính hiển vi.

2.2. Tai biến

- Tụ máu tại chỗ dưới da: dùng gạc vô trùng băng chặt tại vị trí vừa chọc tủy hoặc dùng thrombin cầm máu.
- Nhiễm trùng.
- Rút không được dịch tủy: do chọc tủy không đúng vị trí hoặc do tủy bị xơ hóa, cần chỉnh lại kim chọc cho đúng vị trí.

3. KẾT QUẢ

3.1. Cách đọc tiêu bản

- Dùng vật kính X10 đọc tổng quát tiêu bản để đánh giá tình trạng tủy ở tiêu bản dàn và tiêu bản tủy ép.
- Dùng vật kính dầu X100 và chọn nơi có các tế bào máu trải đều làm công thức tủy, số lượng ít nhất là 200 tế bào có nhân, thường từ 100 – 500 tế bào. Tìm các hình thể bất thường: ung thư di căn, ký sinh trùng.
- Tính tỷ lệ bạch cầu hạt /hồng cầu nhân. Tỷ lệ bạch cầu hạt /hồng cầu nhân ở người bình thường bằng 4.

3.2. Trả lời kết quả

3.2.1. Trả lời kết quả phải cụ thể, rõ ràng

- Số liệu rõ ràng

– Nhận xét về số lượng, hình thái các tế bào tủy và các biến đổi bất thường, mức độ giàu nghèo của tủy xương (tủy bình thường – tủy giàu – tủy rất giàu – tủy nghèo – tủy rất nghèo tế bào).

3.2.2. Kết luận

Phân tích số lượng và hình thái của các dòng tế bào bình thường, và các biến đổi bệnh lý nếu có.

Có thể kết luận chắc chắn hay chỉ loại trừ một hay nhiều khả năng. Đôi khi chưa chẩn đoán được chắc chắn.

3.2.3. Công thức tủy đồ người bình thường

Loại tế bào máu	Tỷ lệ %
Nguyên tiền hồng cầu	1,12
Nguyên hồng cầu ái kiềm	22,80
Nguyên hồng cầu đa sắc	25,24
Nguyên hồng cầu ái toan	41,26
Nguyên tủy bào	0,40
Tiền tủy bào	1,40
Tủy bào	13,44
Hậu tủy bào	9,74
Bạch cầu đa nhân	54,58
Nguyên bào lympho	0,08
Tiền tân bào	0,12
Tân bào	17,05
Nguyên bào mono	0,004
Đơn bào	2,50
Tiền tương bào Tương bào	0,65
Nguyên huyết bào	0,075

4. TỦY ĐỒ TRONG MỘT SỐ BỆNH LÝ

4.1. Bệnh Leukemia dòng hạt

– Tủy đồ rất giàu tế bào, có hiện tượng tăng sản mạnh dòng bạch cầu hạt, lấn át các dòng khác.

– Bệnh Leukemia kinh dòng hạt có đầy đủ các giai đoạn trưởng thành của dòng bạch cầu hạt đặc biệt là giai đoạn trung gian và trưởng thành chiếm đa số. Nguyên tủy bào và tiền tủy bào < 10%.

– Bệnh Leukemia cấp dòng hạt đa số là tế bào blast (nguyên tủy bào), tiền tủy bào, rất ít hoặc không có tế bào trung gian. Dòng tiểu cầu bị ức chế.

- Tủy đồ có giá trị chẩn đoán tốt trong thể ẩn mà công thức máu ngoại vi còn bình thường.
- Trường hợp bệnh kinh niên, nếu tỷ lệ nguyên tủy bào tăng có nghĩa là bệnh chuyển sang cấp tính. Tiên lượng rất xấu.

4.2. Bệnh Leukemia dòng lympho

- Tủy đồ rất giàu tế bào, có hiện tượng tăng sản mạnh dòng lympho, chiếm tới 70 – 90% tế bào, lấn át các dòng khác.
- Đa số là tân bào nếu là bệnh Leukemia kinh dòng lympho mạn tính, hoặc nguyên bào lympho nếu là bệnh Leukemia cấp dòng lympho.
- Trường hợp bệnh kinh niên, nếu tỷ lệ nguyên bào lympho tăng có nghĩa là bệnh chuyển sang cấp tính, tiên lượng rất xấu.

4.3. Bệnh đa hồng cầu nguyên phát

- Tủy đồ giàu tế bào, tăng sinh mạnh dòng hồng cầu.
- Hình dạng hồng cầu bình thường.

4.4. Bệnh thiếu máu Biermer

- Xuất hiện dòng hồng cầu khổng lồ và tăng sinh rất mạnh, có đủ các loại tế bào ở các giai đoạn và có nhiều hình gián phân.
- Tế bào không có những thay đổi bất thường.

4.5. Bệnh thiếu máu tan máu

- Có phản ứng tăng sinh dòng hồng cầu.
- Tỷ số bạch cầu hạt /hồng cầu nhân = 1 hoặc 0,5, rất nhiều nguyên hồng cầu ái toan và hồng cầu lưới.

4.6. Bệnh suy tủy

- Tủy đồ rất nghèo tế bào.
- Tất cả các dòng tế bào máu đều giảm nhiều, dòng lympho tăng tỷ lệ tương đối.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày tiến trình kỹ thuật lấy tủy và khảo sát tủy đồ.

2. Các vị trí chọc tủy.

3. Mô tả tủy đồ trong bệnh Leukemia cấp và kinh, bệnh thiếu máu tan máu, bệnh suy tủy.

Bài 20

XÉT NGHIỆM TẾ BÀO TRONG DỊCH NÃO TỦY

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo kỹ thuật đếm tế bào trong dịch não tuỷ.*
2. *Trình bày được nguyên tắc của xét nghiệm tế bào trong dịch não tủy.*

1. NGUYÊN TẮC

Bình thường dịch não tủy trong suốt, có rất ít tế bào. Trong một số bệnh lý như viêm màng não mủ do lao, virus giang mai, xuất huyết não, chấn thương sọ não, số lượng và thành phần tế bào trong dịch não tủy tăng cao.

Xét nghiệm tế bào trong dịch não tủy có giá trị giúp chẩn đoán bệnh.

2. DỤNG CỤ HÓA CHẤT

- Kính hiển vi quang học
- Buồng đếm
- Dung dịch phá vỡ hồng cầu gồm:
  + Acid acetic: 5ml
  + Nước cất vừa đủ: 100ml.
- Thuốc nhuộm Giemsa.
- Dầu soi kính.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

Lắc bệnh phẩm dịch não tủy cho vào 2 ống nghiệm, mỗi ống 1 – 2ml.

3.1. Đếm số lượng bạch cầu

- Nhỏ vào ống thứ nhất 2 – 3 giọt dung dịch phá vỡ hồng cầu, lắc đều.
- Lấy 1 giọt cho vào buồng đếm.

- Để lắng 5 phút.
- Đếm số lượng bạch cầu trên kính hiển vi.

Với buồng đếm Neubauer:

- Đếm số lượng bạch cầu ở khu vực dùng để đếm bạch cầu.
- Nhân số lượng bạch cầu đếm được với 10 và chia cho 4. Ta tính được số bạch cầu trong $1mm^3$.

Kết quả:

- Bình thường dịch não tủy rất ít tế bào, không quá 1 tế bào /$1mm^3$.
- Tăng ít : 3 – 10 bạch cầu /$1mm^3$.
- Tăng cao: trên 100 bạch cầu /$1mm^3$.

3.2. Phân loại bạch cầu

Khi có trên 10 bạch cầu /$1mm^3$:

- Ly tâm ống nghiệm thứ hai. Đổ nước trong ở trên, lấy cặn làm tiêu bản giọt dày, đường kính 2cm.
- Nhuộm Giemsa.
- Để khô. Đọc kết quả bằng vật kính dầu.
- Đếm 100 tế bào để phân loại bạch cầu.

4. KẾT QUẢ

- Tỷ lệ bạch cầu hạt trung tính tăng cao (thường trên 75%) trong viêm màng não mủ do phế cầu, tụ cầu, não mô cầu.
- Tỷ lệ lymphocyt tăng cao (thường trên 75%) trong viêm màng não do lao, siêu vi, giang mai.
- Hồng cầu tăng cao trong xuất huyết não, chấn thương sọ não.
- Ngoài ra còn có thể gặp những tế bào của các bệnh máu ác tính, một số tế bào biểu mô, nấm hay các tinh thể.

5. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Sau khi chọc, không gửi nước não tủy đi xét nghiệm ngay.
- Nhầm bệnh phẩm.
- Không lắc đều nước não tủy trước khi đếm số lượng bạch cầu.
- Tiêu bản quá dày hay quá mỏng.
- Nhuộm Giemsa quá đậm hay quá nhạt.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Nguyên tắc xét nghiệm tìm tế bào trong dịch não tủy.
2. Trình bày các bước kỹ thuật khi đếm tế bào trong dịch não tủy.
3. Cho biết trị số bình thường của tế bào trong dịch não tủy.
4. Trình bày nguyên nhân sai lầm khi đếm tế bào trong dịch não tủy.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ hóa chất	Đúng và đầy đủ	0,8	1,6	2
2	Kiểm tra bệnh nhân	Đối chiếu tên bệnh nhân và tên trên phiếu thử cẩn thận	0,8	1,6	2
3	Đếm số lượng bạch cầu	Đếm đúng, đếm đủ	0,8	1,6	2
4	Phân loại bạch cầu	Nhận định đúng, phân loại chính xác.	0,8	1,6	2
5	Tính kết quả	Đúng quy định	0,8	1,6	2

Bài 21

XÉT NGHIỆM TẾ BÀO TRONG CẶN LẮNG NƯỚC TIỂU

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật xét nghiệm tế bào trong cặn lắng nước tiểu thành thạo.*
2. *Đọc kết quả cặn lắng nước tiểu đúng, chính xác.*

1. NGUYÊN TẮC

Tổng phân tích nước tiểu là một xét nghiệm thường quy giúp chẩn đoán bệnh lý thận, nội tiết, gan, mật,.. Xét nghiệm tổng phân tích nước tiểu đầy đủ gồm: khảo sát các thành phần hóa học nước tiểu và đọc cặn lắng nước tiểu.

Cặn lắng nước tiểu bình thường chỉ có một số tế bào biểu mô tinh thể khi có sự xuất hiện nhiều hồng cầu, bạch cầu, các loại trụ là có biểu hiện bệnh lý.

2. DỤNG CỤ VÀ THUỐC THỬ

2.1. Dụng cụ

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

2.2. Bệnh phẩm

Nước tiểu giữa dòng (nước tiểu mới lấy ở phần giữa khi tiểu), được đựng trong lọ sạch, vô trùng. Nước tiểu thường được lấy vào buổi sáng.

Lưu ý: vệ sinh âm hộ và hậu môn sạch sẽ trước khi lấy bệnh phẩm.

2.3. Hoá chất: thuốc nhuộm Sternheimer -Malbin

- Dung dịch A:
  + Crystal violet: 3 g
  + Ethanol 95%: 20 ml
  + Amonium oxalate: 0,8 ml
  + Nước cất (cho đủ): 80 ml

- Dung dịch B:
  + Safranin: 0,25 g
  + Ethanol 95%: 10 ml
  + Nước cất (cho đủ): 100 ml
- Dung dịch C (Sternheimer-Malbin)
  + Dung dịch A: 3 ml
  + Dung dịch B: 97 ml

3. KỸ THUẬT

- Trộn đều mẫu thử trong lọ đựng nước tiểu trước khi xét nghiệm.
- Cho 10-15 ml nước tiểu đã trộn đều vào ống ly tâm sạch.
- Ly tâm ngay với tốc độ 3.000 vòng /phút trong thời gian tối thiểu là 5 phút (thực tế có thể ly tâm lâu hơn để có nhiều cặn lắng).
- Gạn bỏ phần nước nổi bằng cách dốc ngược ống (chỉ đổ một lần, tránh đổ đi đổ lại).
- Trộn đều cặn lắng với nước tiểu còn lại bằng cách lắc nhẹ hoặc búng trên thành ống ly tâm.
- Cho 1 giọt thuốc nhuộm Sternheimer -Malbin (dung dịch C) vào cặn lắng, trộn đều thuốc nhuộm và cặn lắng.
- Nhỏ 1 giọt cặn lắng đã nhuộm lên một lam kính, sạch. Đậy lá kính lên trên.
- Dùng vật kính X10 quan sát toàn bộ cặn lắng, cần điều chỉnh ánh sáng thích hợp để nhìn rõ các trụ.
- Chuyển qua vật kính X40 để nhận diện. Kiểm tra khoảng 20 vi trường, số vi trường kiểm tra không được dưới 10 vi trường.
- Lưu ý: có thể soi trực tiếp cặn lắng nước tiểu sau khi ly tâm mà không cần nhuộm.

4. KẾT QUẢ

4.1. Thành phần tế bào

4.1.1. Hồng cầu

- Hình dạng hồng cầu biến đổi theo độ đậm đặc và phản ứng của nước tiểu: hình răng cưa trong nước tiểu đậm đặc, phồng lên trong nước tiểu loãng, nhỏ hoặc hòa tan trong nước tiểu kiềm.
- < 5 hồng cầu / 1 vi trường: ít
- 5 - 10 hồng cầu /1 vi trường: (+)
- 10 - 20 hồng cầu /1 vi trường: (++)
- > 20 hồng cầu /1 vi trường: (+++)
- Bình thường trong 1-2µl nước tiểu có thể có 1 hồng cầu.
- Số lượng hồng cầu phải thật nhiều và thường xuyên mới có thể kết luận là tiểu ra máu.

- Hồng cầu thường gặp trong các bệnh viêm thận cấp tính, sỏi niệu, u thận, nhiễm độc, nhiễm khuẩn ở thận, sỏi thận...

4.1.2. Bạch cầu

- < 10 bạch cầu / 1 vi trường: ít
- 10 - 20 bạch cầu / 1 vi trường: (+)
- > 20 bạch cầu / 1 vi trường: (++)
- > 50 bạch cầu / 1 vi trường: (+++)
- Nước tiểu bình thường: 10-15 bạch cầu /1μm nước tiểu.
- Bệnh lý viêm cầu thận cấp, viêm ống thận, sỏi niệu, nhiễm trùng tiểu.

4.1.3. Tế bào thượng bì

Là những tế bào già cỗi bong ra. Ít có giá trị chẩn đoán nếu số lượng có ít.

- Tế bào biểu mô thận: nhân màu tía sậm, bào tương ít (chỉ thấy 1 vành nhỏ). Kích thước khoảng bằng bạch cầu nhỏ.
- Tế bào biểu mô bàng quang: kích thước lớn hơn tế bào vi niệu quản, nhân bắt màu xanh, bào tương lớn.
- Tế bào biểu mô niệu đạo: nhân nhỏ màu cam hay cam tía, bào tương rộng bắt màu xanh hay tím. Ngoại vi tế bào không đều.

4.2. Trụ niệu

Cấu tạo bởi các chất nhày, tế bào máu, tế bào bị thương tổn khi qua ống thận cô đọng lại và mang khuôn của ống thận.

4.2.1. Trụ thấu quang còn gọi là trụ trong

- Hình dài, bờ nhẵn, trong suốt.
- Trụ tan trong nước, do đó sẽ hiếm thấy trụ thấu quang trong nước tiểu loãng.

4.2.2. Trụ hạt: thường gặp trong viêm thận cấp.

- Hạt thô: hạt lớn ăn màu tía sậm trong chủ thể thấu quang hồng nhạt.
- Hạt mịn: các hạt hơi ăn màu tía trong chủ thể thấu quang hồng nhạt.

4.2.3. Trụ hồng cầu còn gọi là trụ máu

- Do hồng cầu kết tụ, bờ lởm chởm không đều.
- Trụ hồng cầu biểu hiện tình trạng chảy máu trong thận, trong viêm thận cấp tính, trong đợt tiến triển của viêm thận mạn tính.

4.2.4. Trụ bạch cầu

- Gồm những bạch cầu đa dạng trong một chủ thể thấu quang hồng nhạt.
- Biểu hiện tình trạng viêm nhiễm khuẩn, gặp trong viêm cầu thận.

4.2.5. Trụ tế bào thượng bì và tế bào vi niệu quản

Các tế bào thượng bì có nhân màu tía nằm trong chủ thể thấu quang màu hồng nhạt.

4.2.6. Trụ mỡ

- Các hạt mỡ hiện rõ trên thân trụ nằm trong chủ thể hồng nhạt.
- Trụ mỡ hình thành do các hạt mỡ trong ống thận khi bệnh nhân tiểu ra lipid đọng lại tạo thành. Gặp trong thận nhiễm mỡ.

4.2.7. Trụ sáp

Lớn hơn trụ thấu quang, vỏ rất cứng ăn màu đồng đều, màu tím nhạt, tím sậm hay vàng nhạt, có khuynh hướng nứt gãy hay gập lại. Hiếm gặp.

4.2.8. Sợi niêm dịch

Hơi giống trụ thấu quang, giống dây băng. Đầu thon mảnh, bị vỡ hay tự cuốn lại.

4.3. Cặn tinh thể

Sự hiện diện của tinh thể trong nước tiểu chỉ có giá trị chẩn đoán khi nó xuất hiện nhiều và liên tục.

4.3.1. Các tinh thể trong nước tiểu acid

- Urat vô thể:
  + Amorphous urat thường là hột màu đỏ gạch, bị hòa tan bởi sức nóng và trong NaOH đậm đặc.
  + Chỉ có tính chất bệnh lý khi xuất hiện nhiều ngay sau khi tiểu, gặp trong trường hợp sốt cao, suy tim, hoặc khi có sỏi urat.
- Uric acid:
  + Màu vàng nâu đến không màu.
  + Đa hình: hình cánh hoa, lăng trụ, hình đĩa, hình thoi.
  + Thường thấy rất nhiều acid uric trong các bệnh nặng của thận do phản ứng quá toan của nước tiểu, thận không tạo được nước tiểu trung tính.
- Sodium urat:

  Không màu đến vàng nhạt. Hình lăng trụ mỏng. Tan trong HCl đậm đặc.
- Calcium sulfat:

  Hiếm gặp. Hình kim dài, hình lăng trụ không màu. Tan trong HCl đậm đặc.
- Cholesterol:

  Hiếm gặp. Hình kính cửa sổ bị bể hay hình đĩa không màu. Tan trong ether.
- Tinh thể kháng sinh:

Hình bó lúa, hình cánh hoa hay hình kim không màu đến màu vàng. Đứng riêng rẽ từng nhóm.

4.3.2. Các tinh thể trong nước tiểu kiềm

– Calcium carbonat:

Hình hạt không màu, hình quả cầu hay quả tạ tan trong CH_3COOH 30% và cho bọt hơi.

– Amonium urat:

Hình quả cầu có gai, hình quả tạ hay bó kim. Màu vàng đục. Tác dụng với HCl sẽ tạo thành acid uric.

– Calcium phosphat:

+ Hình hạt hay hình đĩa không màu, không đều nhau.

+ Tan trong CH_3COOH 30% và HCl đậm đặc.

+ Nước tiểu đục màu sữa. Gặp ở người có độ acid cao trong dịch vị (mất nhiều chất điện giải) và ở những người bị suy nhược thần kinh.

– Phosphat vô thể: là những hạt không màu, tan trong CH_3COOH 30%.

4.3.3. Các tinh thể không phụ thuộc vào pH nước tiểu (có trong cả 3 loại nước tiểu acid, trung tính, kiềm)

– Cystin:

+ Rất chiết quang.

+ Hình đĩa lục giác không màu, đầu rõ và dài hiện ra riêng rẽ hay thành chùm.

+ Tan trong NaOH và HCl đậm đặc.

– Leucin:

+ Rất chiết quang.

+ Màu vàng hay nâu, giống quả cầu hoặc có những vòng đồng tâm.

+ Tan trong NaOH đậm đặc. Hiếm gặp.

– Tyrosin: hình kim nhỏ không màu, tan trong HCl. Hiếm gặp.

* Cystin, leucin, tyrosin thường gặp trong trường hợp suy dinh dưỡng, bệnh gan cấp tính, nôn nhiều vì thai nghén...

– Calcium oxalat

+ Đa dạng: hình bao thư không màu, hình tám góc, hình quả tạ thường rất nhỏ. Tan trong HCl.

+ Nước tiểu thường hơi đục, cặn lắng màu trắng.

+ Nguyên nhân có thể do: dùng thức ăn có nhiều oxalat, đái tháo đường, xơ gan, rối loạn thần kinh, sạn, sỏi thận.

– Hyppuric acid: hình lăng trụ hay đĩa mỏng, không màu đến màu vàng. Tan trong CH_3COOH 30% và ether.

– Triple phosphat: hình nắp quan tài, hình lăng trụ, hình lông chim hay hình lá cây. Tan trong HCl đậm đặc và CH_3COOH 30%.

4.4. Ký sinh trùng

- Trichomonas: di động, hình trái lê với một nhóm chiên mao ở đằng trước và chỉ một sợi chiên mao ở đằng sau.
- Trứng giun kim (Enterobius vermicularis): một mặt lồi, một mặt lép. Vỏ mỏng, láng, trong suốt.
- Trứng sán máng (Schistosoma haematolium): chỉ tìm thấy trong nước tiểu còn mới. Trứng hình trái xoan với một gai ở một đầu.

4.5. Vi trùng: thường nhỏ hơn các cơ cấu khác, có thể có bất kỳ hình dạng nào và có thể di động hay bất động.

4.6. Nhiễm chất: là những chất ngoại nhiễm vào nước tiểu sau khi lấy mẫu. Nhiễm chất thông thường không cần phải ghi kết quả.

- Sợi: do y phục, sợi thường dài và to hơn trụ, có thể trải ra trên nhiều quang trường.
- Hạt mỡ: do dụng cụ không sạch hoặc do ống sonde bôi dầu. Tuy nhiên cần lưu ý phân biệt hạt mỡ với bệnh tiểu ra dưỡng chấp.
- Hạt tinh bột: do bột thoa găng tay nhiễm vào. Hạt tinh bột có những làn đồng tâm yếu và nhuộm xanh với dung dịch Iod loãng.
- Tinh trùng: đầu hình bầu dục và có đuôi dài. Hiện diện trong những mẫu thử lấy sau những sự phát xuất ban đêm và kết quả của sự nhiễm vào âm hộ. Tinh trùng được cho kết quả theo sự hiện diện.

5. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Nước tiểu để quá lâu: cần thực hiện xét nghiệm trong vòng 1 giờ sau khi lấy vì để lâu các trụ và tế bào bị hỏng. Nếu chưa thực hiện được ngay phải giữ nước tiểu ở tủ lạnh hay cho thêm thuốc bảo quản, khử trùng vào nước tiểu (như formalin).
- Thuốc nhuộm không bền: thuốc nhuộm Sterheimer -Malbin (dung dịch C trực dụng) chỉ bền được 2 tháng nhưng phải lọc mỗi 2 tuần lễ. Dung dịch A và dung dịch B khi lưu trữ riêng biệt có thể bền vô hạn định.
- Nhận định sai hình dạng các cặn lắng trong nước tiểu.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Nước tiểu để quá lâu (> 1 giờ) xét nghiệm dễ sai kết quả, anh chị hãy cho biết những sai sót thường gặp.

2. Cách ghi kết quả cặn lắng nước tiểu.

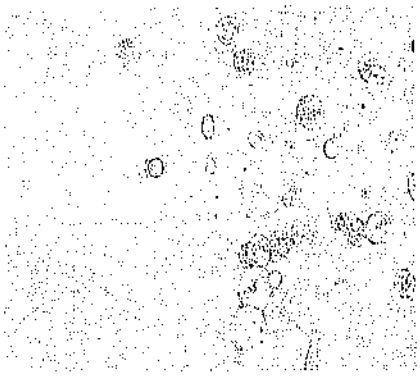
3. Nêu ý nghĩa sự xuất hiện của hồng cầu, bạch cầu trong cặn lắng nước tiểu.

4. Nêu ý nghĩa sự xuất hiện của các loại trụ niệu trong cặn lắng nước tiểu.

5. Các loại tinh thể thường gặp trong nước tiểu có pH acid.

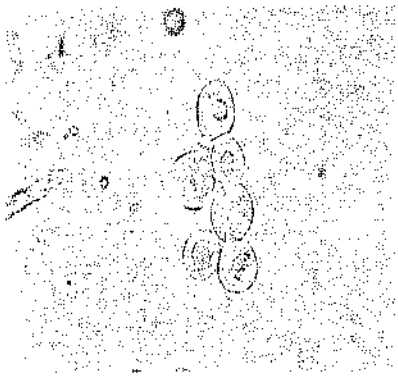
BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ	Dụng cụ đủ, sạch, đúng	0,4	0,8	1
2	Chuẩn bị hóa chất	Hóa chất đúng, đủ	0,4	0,8	1
3	Kiểm tra bệnh nhân	Đối chiếu tên trên phiếu và trên mẫu bệnh phẩm kỹ lưỡng	0,4	0,8	1
4	Lấy nước tiểu vào ống nghiệm	Thao tác đúng kỹ thuật	0,4	0,8	1
5	Ly tâm	Đúng vận tốc và thời gian	0,4	0,8	1
6	Lấy cặn lắng	Không để sót lại quá nhiều nước tiểu	0,4	0,8	1
7	Nhuộm	Đúng thuốc nhuộm, đúng tỉ lệ	0,4	0,8	1
8	Khảo sát và nhận định cặn lắng	Đúng, chính xác	0,4	1,6	2
9	Ghi kết quả	Đúng, chính xác	0,4	0,8	1

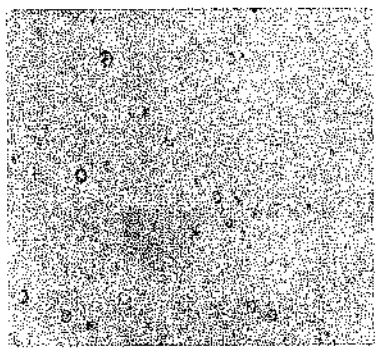


Hình ảnh tế bào bì, tế bào hồng cầu, tế bào bạch cầu

Hình ảnh nấm

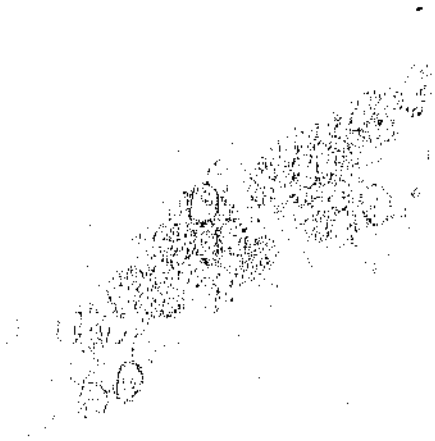


Hình ảnh tế bào biểu mô thận



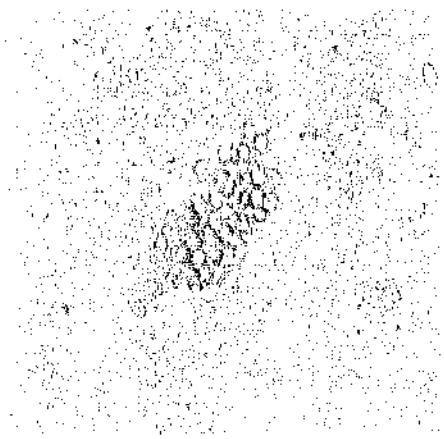
Hình ảnh tế bào hồng cầu

Hình 21.1. Hình ảnh các tế bào và nấm trong cặn lắng nước tiểu

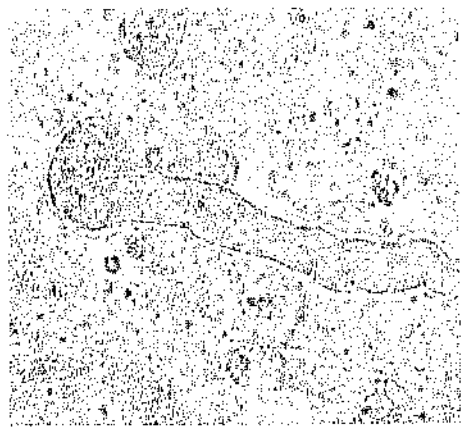


Hình ảnh trụ tế bào

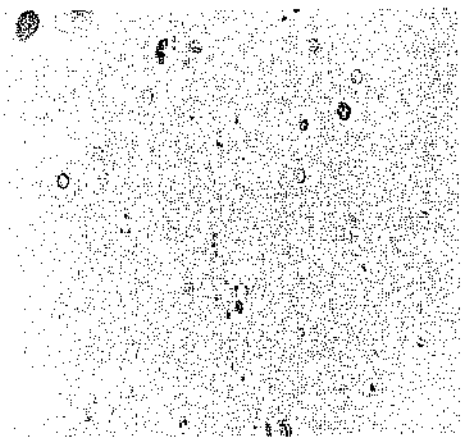
Hình ảnh trụ bạch cầu



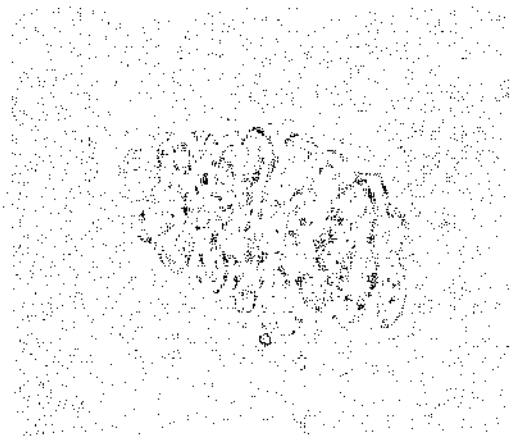
Hình ảnh trụ hồng cầu



Hình ảnh trụ sáp

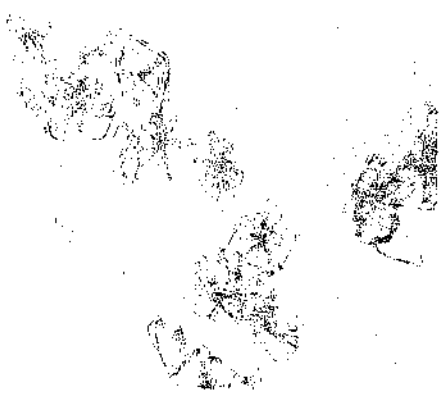


Hình ảnh trụ trong và tế bào bạch cầu

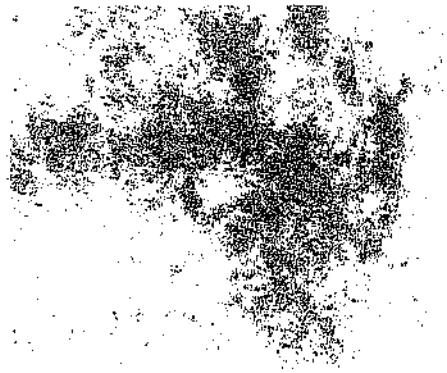


Hình ảnh trụ tế bào bì

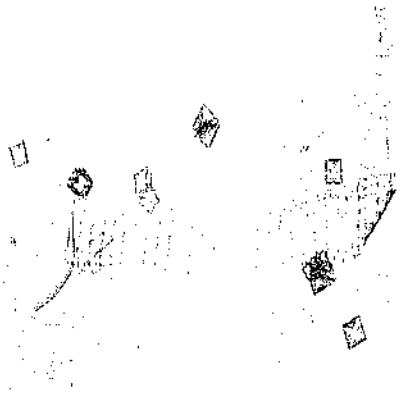
Hình 21.2. Hình ảnh các trụ trong cặn lắng nước tiểu



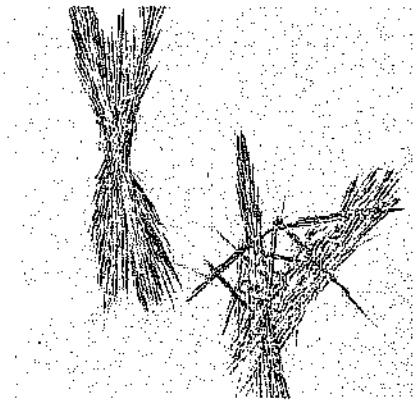
Uric acid



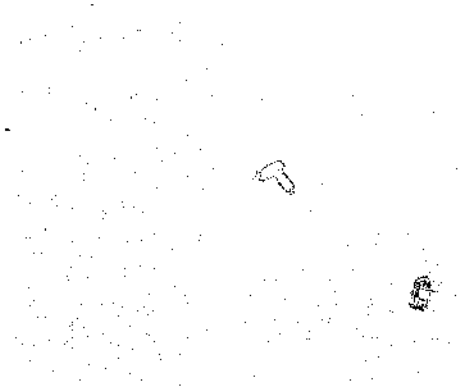
Amorphous urat



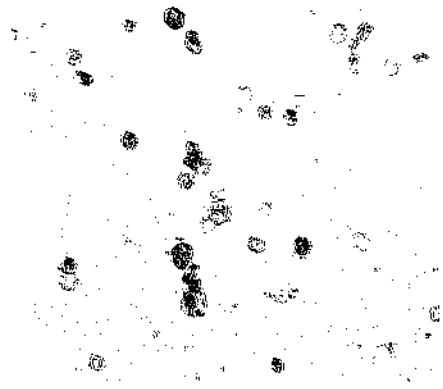
Calcium oxalat



Tinh thể tyrosin

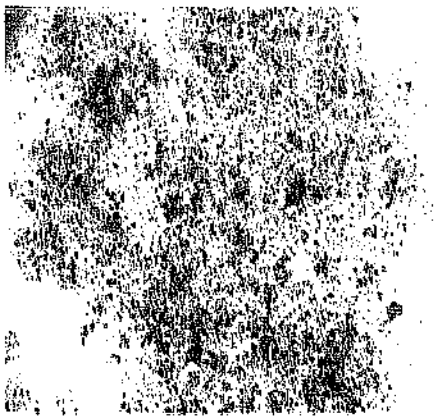


Hippuric acid



Tinh thể cystin

Hình 21.3. Hình ảnh các tinh thể trong cặn lắng nước tiểu

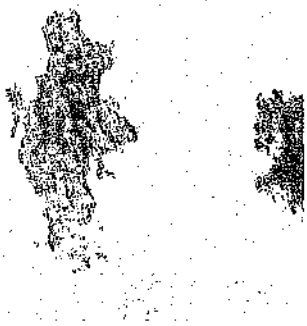


Amorphous phosphat

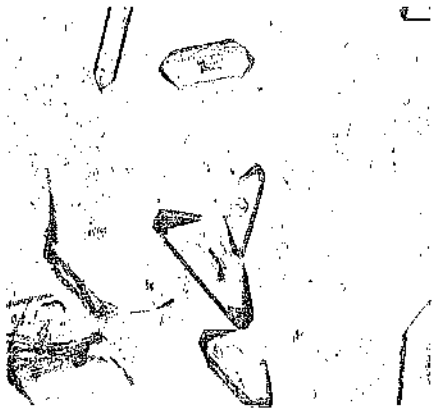
Amonium urat

Calcium phosphat

Triple phosphat & Amorphous phosphat



Calcium phosphat



Triple phosphat

Hình 21.4. Hình ảnh các tinh thể trong cặn lắng nước tiểu

Bài 22

TINH DỊCH ĐỒ

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật tinh dịch đồ thành thạo, chính xác.*
2. *Trình bày được mục đích của tinh dịch đồ.*

1. MỤC ĐÍCH

- Tìm nguyên nhân gây hiếm muộn.
- Khảo sát vi khuẩn lậu sau điều trị.
- Tìm tinh dịch trên quần áo hay cơ quan sinh dục người nữ trong trường hợp nghi ngờ bị hiếp dâm.
- Công nhận hay bác bỏ mối quan hệ cha con.

2. DỤNG CỤ VÀ THUỐC THỬ

2.1. Dụng cụ

- Ống ly tâm có chia độ, giấy đo pH, pipette Pasteur
- Ống hút bạch cầu và dây hút, huyết cầu kế, lame

2.2. Thuốc thử

- NaCl 0,85%, thuốc nhuộm Wright hay Giemsa.
- Dung dịch $NaHCO_3$ 5%
  + $NaHCO_3$: 5g
  + Formol: 1ml
  + ED cho đủ: 100 ml

3. LẤY MẪU TINH DỊCH

3.1. Lấy và gửi mẫu

Cách thức lấy và gửi mẫu phải được hướng dẫn rõ ràng.

- Tinh dịch được lấy sau khi giao hợp ít nhất 48 giờ và không lâu quá 7 ngày, để giảm thiểu những thay đổi trên kết quả phân tích, số ngày giao hợp nên bằng nhau cho hai lần lấy mẫu, tên người bệnh, ngày giờ lấy mẫu, có thu thập hết tinh dịch.
- Một đánh giá đầu tiên phải dựa trên hai mẫu tinh dịch, khoảng cách hai lần lấy không dưới 7 ngày và không quá 3 tuần. Nếu kết quả hai lần này khác biệt đáng kể, ta cần có thêm mẫu bởi vì kết quả phân tích tinh dịch người có thể thay đổi nhiều.
- Tốt nhất là mẫu tinh dịch nên được lấy trong phòng riêng nằm cạnh phòng xét nghiệm, nếu không thể được thì có thể lấy ở nhà và mang đến phòng xét nghiệm không lâu quá 1 tiếng đồng hồ.
- Khi thấy độ di động của tinh trùng thấp một cách bất thường (< 25%) có di động nhanh và tiến tới, khoảng cách cho lần lấy sau phải ngắn hơn vì độ di động giảm theo thời gian.
- Tinh dịch được lấy bằng cách thủ dâm và cho xuất thẳng vào một lọ thủy tinh hay lọ nhựa có miệng rộng và được giữ ấm ở $20^0 - 40^0$C. Nếu cần xét nghiệm vi trùng trong mẫu, người đàn ông phải tiểu trước, sau đó rửa tay và dương vật, cho xuất tinh vào lọ đã được tiệt trùng.
- Nếu việc thủ dâm không thực hiện được thì dùng cách giao hợp và phải dùng bao cao su đặc biệt cho lấy tinh, bao cao su thường không được dùng vì sẽ làm chết tinh trùng. Cách lấy tinh trùng bằng cách giao hợp nửa chừng rồi cho xuất tinh vào lọ không được chấp nhận vì có thể phần đầu tinh xuất sẽ bị mất (rơi trong âm đạo), phần này lại chứa nhiều tinh trùng. Hơn nữa, những tế bào, vi trùng cũng như pH của âm đạo sẽ ảnh hưởng đến kết quả phân tích.
- Tinh dịch phải được lấy đủ cho đến khi sự xuất tinh hoàn tất.
- Mẫu được giữ không dưới 20°C và không quá 40°C trong khi mang tới phòng xét nghiệm.
- Lọ đựng mẫu có ghi tên người bệnh và ngày giờ lấy mẫu.

3.2. An toàn trong thao tác

Kỹ thuật viên xét nghiệm nên biết rằng mẫu tinh dịch có thể chứa những tác nhân gây bệnh như HIV, viêm gan siêu vi, Herpes Simplex, ... vì thế nên thao tác hết sức cẩn thận. Nếu muốn cấy vi trùng, phân tích sinh học, các dụng cụ phải được tiệt trùng.

4. KHẢO SÁT TINH DỊCH

4.1. Ly giải

Một mẫu tinh dịch bình thường ly giải trong vòng 60 phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, thường thì 15 phút sau khi xuất tinh, trong vài trường hợp, sự ly giải không xảy ra trong 60 phút, điều này phải được ghi nhận. Mẫu tinh bình thường có thể chứa những hạt dạng keo, nó không hòa tan và cũng không có ý nghĩa về mặt lâm sàng. Trong tinh dịch có thể có những sợi nhày làm cản trở sự phân tích. Mẫu phải được trộn đều, tránh lắc mạnh. Trong thời gian ly giải, ta nhẹ nhàng lắc đều, sẽ làm giảm những sai số khi phân tích mật độ

tinh trùng. Nếu như độ di động được thực hiện ở 37°C, thì khi lắc cũng như khi chờ ly giải cũng nên để ở nhiệt độ này.

Trong trường hợp mẫu tinh không ly giải, ta nên dùng máy lắc hay ly giải bằng men (Bromelin 1g/l). Ta có thể tạo ly giải bằng cách trộn tinh dịch với môi trường cấy với cùng thể tích. Sau đó dùng pipette hút lên xuống nhiều lần... tất cả những thủ thuật này đều có ảnh hưởng đến việc phân tích sinh hóa, độ di động và tình trạng tinh trùng, do đó phải ghi nhận khi thực hiện.

4.2. Hình dáng bên ngoài

Mẫu tinh phải được khảo sát ngay khi ly giải hay 1 giờ sau xuất tinh. Đầu tiên quan sát ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, một mẫu tinh dịch bình thường phải đồng nhất, màu xám đục nhẹ nếu tinh trùng ít, màu nâu đỏ khi có máu và màu vàng khi có bệnh vàng da hay bệnh nhân đã uống vài loại vitamin.

4.3. Thể tích

Thể tích tinh được đo bằng ống đo có vạch với đáy hình nón, ống tiêm bằng nhựa không được dùng vì có ảnh hưởng đến độ di động.

4.4. Độ nhày

Độ nhày (còn gọi là độ quánh) của mẫu phải được ghi nhận, nó có thể được ước lượng bằng cách hút nhẹ tinh dịch vào một pipette 5ml, sau đó để cho nhỏ tự do và ghi nhận độ dài của sợi. Một tinh dịch bình thường để nhỏ từng giọt rời. Trường hợp độ nhày bất thường, giọt kéo thành sợi dài trên 2 cm. Cũng có thể dùng một que thủy tinh, quậy nhẹ trong tinh dịch sau đó kéo nhẹ que lên, quan sát độ dài của sợi tinh dịch từ đầu que thủy tinh. Độ dài cũng không được quá 2cm. Độ nhày cao sẽ ảnh hưởng đến kết quả độ di động, mật độ tinh trùng và kháng thể bám trên tinh trùng.

4.5. Độ pH

Độ pH được đo cùng thời điểm sau xuất tinh 1 giờ. Một giọt tinh dịch được phết đều trên giấy đo pH (loại giấy đo được trong khoảng 6,1 - 10,0 hay 6,4 - 8,0). Sau 30 giây, nơi bị thấm sẽ hiện màu đều. So sánh màu này với màu mẫu để đọc độ pH. Nếu pH dưới 7,0 ở một mẫu tinh không có tinh trùng, có nghĩa là có thể có một tắc nghẽn ở đường phóng tinh hay không có ống dẫn tinh bẩm sinh hai bên.

4.6. Di động

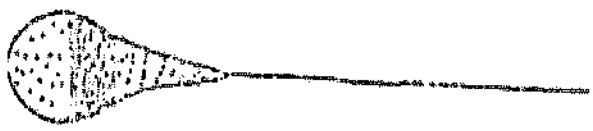
Cho một giọt tinh dịch lên lam, đậy 1 lá kính lên trên. Quan sát trên kính hiển vi với vật kính 10X để thấy ảnh rồi chuyển qua vật kính 40X để đánh giá độ di động.

4.7. Số lượng

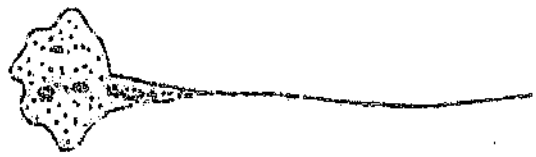
Dùng pipette bạch cầu hút tinh dịch lên đến vạch 0,5. Hút $NaHCO_3$ 5% đến vạch 11. Lắc đều, cho vào buồng đếm. Đếm như đếm bạch cầu.

4.8. Quan sát hình dạng tinh trùng

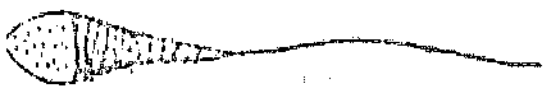
Kéo làn mỏng tinh dịch thật chậm, để khô, nhuộm Wright (kỹ thuật làm như làn máu). Sau đó đọc kết quả bách phân tinh trùng, nhận diện tinh trùng bình thường và bất thường



Tinh trùng bình thường nằm ngửa hay úp

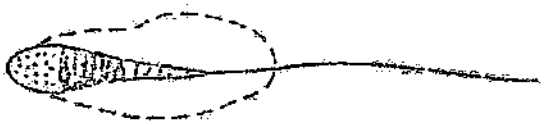


Tinh trùng bất thường đầu bị thoái hoá

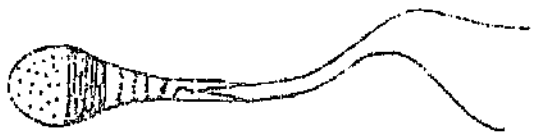


Tinh trùng bình thường nằm nghiêng

Tinh trùng bình thường ốm dài mảnh mai



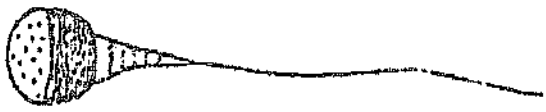
Tinh trùng bình thường loại trẻ có màng



Tinh trùng bất thường có hai đuôi

Tinh trùng bất thường đầu có ngấn

Tinh trùng bất thường đầu có hình kim ghim



Tinh trùng bất thường đầu khổng lồ

Tinh trùng bất thường có hai đầu

Hình 22.1. Một số hình ảnh bình thường và bất thường của tinh trùng

5. CÁCH GHI KẾT QUẢ TINH DỊCH ĐỒ

- pH: (Bình thường: 7.2 – 8)
- Ly giải: Phút (Bình thường: ≤ 60 phút)
- Thể tích: ml (Bình thường: ≥ 2 ml)
- Di động: % (Bình thường: ≥ 50 %)
  - A - Tiến tới nhanh: % (Bình thường: ≥ 25 %)
  - B - Tiến tới chậm: %
  - C - Không tiến tới: %
  - D - Không di động %
- Số lượng tinh trùng: x 10^6/ml (Bình thường: ≥ 20 x 10^6/ml)
- Bạch cầu: x 10^6/ml (Bình thường: < 1 x 10^6/ml)
- Hồng cầu: x 10^6/ml (Bình thường: < 1 x 10^6/ml)
- Hình dạng bình thường: % (Bình thường: ≥ 30 %)
- Thời gian kiêng giao hợp: Ngày (Bình thường: 3 – 5 ngày)
- Tinh dịch lấy trước khi xét nghiệm: Phút (Bình thường: < 60 phút)

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày tóm tắt cách hướng dẫn bệnh nhân lấy mẫu, gửi mẫu xét nghiệm tinh dịch.

2. Nêu nguyên nhân sai lầm khi khảo sát tinh dịch.

3. Cách ghi kết quả khảo sát tinh dịch.

4. Cách quan sát sự ly giải của tinh trùng.

5. Nêu các chỉ số bình thường của tinh dịch đồ.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Lấy và gửi mẫu	Hướng dẫn bệnh nhận rõ ràng thời gian trước khi lấy mẫu, cách lấy, bảo quản và thời gian sau khi lấy tinh dịch mang đến phòng xét nghiệm.	0,4	0,8	1
2	Chuẩn bị dụng cụ và thuốc thử	Dụng cụ và thuốc thử phải đầy đủ	0,4	0,8	1
3	Khảo sát độ ly giải	Quan sát đúng quy trình	0,4	0,8	1
4	Khảo sát thể tích	Đo đúng thể tích	0,4	0,8	1
5	Khảo sát độ di động	Đánh giá chính xác độ di động của tinh trùng	0,4	0,8	1
6	Đếm số lượng tinh trùng	Đúng tiến trình kỹ thuật	0,8	1,6	2
7	Khảo sát hình dạng tinh trùng	Nhận định đúng chính xác	0,4	0,8	1
8	Đo pH	Đo kỹ chính xác	0,4	0,8	1
9	Ghi kết quả tinh dịch đồ	Ghi đúng đơn vị	0,4	0,8	1

CHƯƠNG III

KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM ĐÔNG - CẦM MÁU

Bài 23

DẤU HIỆU DÂY THẮT

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật dấu hiệu dây thắt thành thạo.*
2. *Trình bày được nguyên tắc xét nghiệm dấu hiệu dây thắt.*

1. NGUYÊN TẮC

Đánh giá sức bền mao mạch bằng cách tạo một áp lực không thay đổi với một thời gian nhất định, những mao mạch nhỏ yếu sẽ bị vỡ ra làm cho máu tràn ra mô dưới da tạo nên những nốt xuất huyết nhỏ. Nếu vùng bị tổn thương rộng lớn sẽ tạo ra những vết bầm.

2. DỤNG CỤ

- Máy đo huyết áp hay dây garo.
- Đồng hồ.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

- Kiểm tra vùng cánh tay bệnh nhân, đánh dấu các nốt ruồi son hay nốt xuất huyết cũ, nốt muỗi chích nếu có.
- Nếu dùng máy đo huyết áp: gắn máy đo huyết áp trên khuỷu tay bệnh nhân, đo huyết áp tối đa và tối thiểu của bệnh nhân sau đó giữ ở huyết áp trung bình trong 5 phút.
- Nếu dùng dây garo: dùng dây thắt cột cánh tay ở vị trí cách khuỷu tay 5cm với một áp suất vừa phải để máu động mạch vẫn lưu thông đều và máu tĩnh mạch bị nghẽn một phần trong 5 phút.
- Sau 5 phút tháo nhanh máy đo huyết áp hay dây garo ra.
- Đọc kết quả bằng cách đếm các nốt xuất huyết mới. Quan sát kích thước và số lượng các nốt xuất huyết xuất hiện ở cánh tay trong và ngoài.

4. KẾT QUẢ

- Bình thường: không có vết xuất huyết mới. Trường hợp bệnh nhẹ: các điểm xuất huyết có thể nhỏ li ti, thưa và chỉ có ở nếp khuỷu tay. Trường hợp bệnh nặng: các nốt xuất huyết có thể nổi rất to, rõ, nhiều và lan rộng xuống cả cánh tay ngoài, cườm tay hay mu bàn tay.
- Cách đánh giá kết quả:
  + Có trên 5 điểm xuất huyết. +
  + Có nhiều điểm ở cánh tay. ++
  + Có rất nhiều điểm ở cánh tay trong và ngoài, luôn cả mu bàn tay. +++
  + Điểm xuất huyết nhiều và dính chùm ở cánh tay, mu bàn tay tạo nên những mảng ứ huyết lớn ++++

5. BIỆN LUẬN

- Dấu hiệu dây thắt dương tính có ý nghĩa là thành mạch kém bền vững, thường gặp trong bệnh thiếu vitamin C giảm tiểu cầu, viêm mao mạch, v.v...
- Việc thực hiện nghiệm pháp này lần thứ nhất phải cách lần thứ hai từ 7 đến 15 ngày vì sau thời gian này các điểm xuất huyết cũ mới biến mất.

6. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Tạo áp lực quá cao hoặc quá thấp.
- Không đảm bảo thời gian.
- Nhầm với nốt xuất huyết cũ.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc xét nghiệm dấu hiệu dây thắt.

2. Trình bày tiến trình kỹ thuật cách tiến hành xét nghiệm dấu hiệu dây thắt bằng phương pháp dùng dây garo.

3. Trình bày cách nhận định kết quả xét nghiệm.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ	Dụng cụ phải đầy đủ	0,6	1,2	1,5
2	Kiểm tra bệnh nhân	Đối chiếu tên tuổi bệnh nhân cẩn thận với phiếu xét nghiệm	0,6	1,2	1,5
3	Kiểm tra vùng cánh tay	Kiểm tra kỹ, ghi nhận các vết xuất huyết cũ, nốt ruồi son, vết đỏ do muỗi cắn.	0,6	1,2	1,5
4	Gắn máy đo huyết áp hay cột dây garo	Đúng vị trí (5cm cách khuỷu tay với áp suất vừa phải)	0,6	1,2	1,5
5	Thời gian cột dây garo hay gắn huyết áp kế	Đúng thời gian	0,6	1,2	1,5
6	Đọc kết quả	Nhận định đúng vết xuất huyết, không được nhầm lẫn với nốt ruồi son, vết đỏ do muỗi cắn, vết xuất huyết cũ.	1	2	2,5

Bài 24

THỜI GIAN MÁU CHẢY

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật thời gian máu chảy thành thạo.*
2. *Chuẩn bị dụng cụ đầy đủ*
3. *Trình bày được nguyên tắc của xét nghiệm thời gian máu chảy.*

1. NGUYÊN TẮC

Đo thời gian từ lúc tạo một vết thương tiêu chuẩn ở vùng giữa dái tai đến khi máu ngừng chảy.

Thời gian máu chảy tùy thuộc vào sự bền vững của thành mao quản, số lượng và chức năng của tiểu cầu.

2. DỤNG CỤ

- Kim chích
- Cồn sát trùng
- Giấy thấm
- Đồng hồ bấm giây

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

Phương pháp DUKE

- Sát trùng vùng dái tai bệnh nhân bằng gòn tẩm cồn, để khô tự nhiên.
- Dùng kim chích chọc vào vùng giữa dái tai tạo một vết thương rộng 2mm, sâu 2mm. Vết thương phải đủ sâu để máu chảy ra tự do và tuyệt đối không được nặn bóp.
- Khởi động đồng hồ bấm giây.
- Cứ 30 giây một lần dùng giấy thấm các giọt máu chảy ra từ vết thương bằng giấy thấm. Cẩn thận không để giấy chạm vào da dái tai.
- Khi máu ngừng chảy, bấm đồng hồ ngừng lại.

4. KẾT QUẢ

- Bình thường: 2 – 4 phút
- Thời gian máu chảy kéo dài trên 5 phút, cần kiểm tra lại ở tai đối diện.

5. BIỆN LUẬN

- Thời gian máu chảy kéo dài trong:
  + Bệnh thành mạch kém bền vững.
  + Bệnh giảm tiểu cầu hoặc rối loạn chức năng tiểu cầu.
  + Bệnh Von Willebrand.
- Kết quả thời gian chảy máu kéo dài sau một lần làm xét nghiệm chưa đủ chính xác để kết luận bệnh. Do đó cần thực hiện kiểm tra lần hai ở tai đối diện.

6. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Vết thương không đúng tiêu chuẩn.
  + Vết đâm quá cạn: rút ngắn thời gian máu chảy.
  + Vết đâm quá sâu: kéo dài thời gian máu chảy.
- Trường hợp dái tai lạnh (do lo sợ, thời tiết lạnh) nên chà xát dái tai cho ấm trước khi thực hiện xét nghiệm.
- Trong trường hợp chưa đến 30 giây máu đã nhỏ thành giọt lớn, hãy để máu nhỏ xuống gòn thấm nước, sau đó khi đúng 30 giây tiếp theo dùng giấy thấm giọt máu.
- Sau 10 phút vẫn còn chảy máu, ngừng không thực hiện trắc nghiệm nữa. Làm ngưng chảy máu bằng cách dùng gòn ép chặt vết thương trong 5 phút hay dùng bột thrombin cầm máu.
- Vì dái tai trẻ em quá mỏng không thích hợp cho việc tạo vết thương như thế, nên phải chích ở cạnh bên ngón chân cái hoặc ở gót chân.
- Động tác thấm máu từ vết chích quá mạnh gây tróc đinh tiểu cầu vừa thành lập.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc của xét nghiệm thời gian máu chảy.
2. Cho biết tiến trình kỹ thuật thực hiện thời gian máu chảy.
3. Cho biết trị số bình thường của thời gian máu chảy và các biến đổi bệnh lý.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ	Dụng cụ phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Kiểm tra tên bệnh nhân	Đúng bệnh nhân	0,4	0,8	1
3	Chọn vị trí chọc	Đúng vị trí, tuỳ đối tượng	0,4	0,8	1
4	Sát trùng	Kỹ lưỡng	0,8	1,6	2
5	Tạo vết thương	Đúng tiêu chuẩn, đủ sâu để máu chảy ra tự nhiên	0,8	1,6	2
6	Thấm máu đúng quy định	30 giây thấm 1 lần	0,8	1,6	2
7	Bấm đồng hồ dừng	Đúng khi máu ngừng chảy	0,4	0,8	1

Bài 25

THỜI GIAN MÁU ĐÔNG

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện kỹ thuật thời gian máu đông thành thạo.*
2. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ.*
3. *Trình bày được nguyên tắc của thời gian máu đông.*

1. PHƯƠNG PHÁP MILIAN (Phương pháp trên kính)

1.1. Nguyên tắc

Là thời gian thăm dò tốc độ của sự xuất hiện sợi huyết trong giọt máu.

1.2. Dụng cụ

- Kim chích, cồn 70^0, gòn vô trùng.
- Lam, hộp Petri, đồng hồ bấm giây.

1.3. Tiến trình kỹ thuật

- Đánh số lam thứ 1 và lam thứ 2.
- Sát trùng đầu ngón tay áp út của bệnh nhân, để khô tự nhiên.
- Dùng lancet chích vào đầu ngón tay. Lau bỏ giọt máu đầu, nhỏ vào hai tấm lam, mỗi tấm 1 giọt.
- Bấm đồng hồ.
- Đậy nắp hộp Petri trên hai tấm lam.
- Chờ khoảng 3 phút, sau đó quan sát lam thứ 1: cứ 30 giây quan sát sự sinh sợi huyết cho đến khi thấy sợi huyết được hình thành.
- Sau đó quan sát lam thứ 2, cứ 30 giây quan sát một lần. Bấm đồng hồ dừng lại khi sợi huyết được hình thành ở lam thứ hai.

1.4. Kết quả

- Trị số bình thường: 5 phút đến 10 phút.

– Kéo dài trên 10 phút là bất thường.

2. PHƯƠNG PHÁP LEE - WHITE (Phương pháp trong ống)

2.1. Nguyên tắc

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

2.2. Chuẩn bị

- Dụng cụ lấy máu tĩnh mạch
- Hai ống nghiệm sạch, khô
- Đồng hồ bấm giây
- Bình cách thuỷ 37^0C
- Nước muối 0,85%

2.3. Tiến trình kỹ thuật

- Chuẩn bị hai ống nghiệm: đánh số 1 và 2 trên hai ống nghiệm. Ghi tên, tuổi bệnh nhân, khoa phòng.
- Cho máu vào ống nghiệm, mỗi ống 2ml máu. Khởi động đồng hồ bấm giây ngay sau khi cho máu tiếp xúc vào thành ống nghiệm thứ nhất.
- Đặt hai ống vào bình cách thủy 37^0C, trong 3 phút.
- Sau 3 phút nghiêng nhẹ ống thứ nhất một góc 45^0.

  Cứ 30 giây nghiêng 1 lần cho đến khi máu đông hoàn toàn. Kiểm tra bằng cách dốc ngược ống nghiệm, khối máu đông không chảy xuống được.
- Sau đó, quan sát đến ống thứ hai:
  + Cũng cứ 30 giây nghiêng ống 1 lần cho đến khi máu đông hẳn.
  + Bấm đồng hồ dừng lại và ghi kết quả thời gian đông ở ống thứ hai.

2.4. Kết quả

- Bình thường: 8 – 10 phút.
- Trên 12 phút: bất thường.

Thời gian máu đông kéo dài khi có sự rối loạn đường đông máu nội sinh như bệnh Hemophilia, điều trị heparin... Phương pháp thực hiện trong ống chính xác hơn phương pháp trên kính.

Thời gian máu đông là xét nghiệm đơn giản, độ chính xác bị hạn chế dù đã thực hiện đúng tiến trình kỹ thuật.

2.5. Nguyên nhân sai lầm

- Ống nghiệm không sạch.

- Nhiệt độ bình cách thủy không đúng.
- Kỹ thuật lấy máu sai: chọc hút nhiều lần, kim quá to...
- Lượng máu lấy quá nhiều hay quá ít.
- Kỹ thuật đọc độ đông không đảm bảo.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc và mục đích của thời gian máu đông.

2. Phân tích ưu điểm và nhược điểm của phương pháp Milian và phương pháp Lee - White.

3. Liệt kê các bước tiến hành xét nghiệm thời gian máu đông theo phương pháp Milian.

4. Liệt kê các bước tiến hành xét nghiệm thời gian máu đông theo phương pháp Lee - White.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ	Dụng cụ phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Kiểm tra tên bệnh nhân	Hỏi tên bệnh nhân cẩn thận để đối chiếu với phiếu chỉ định xét nghiệm	0,4	0,8	1
3	Cho máu vào ống nghiệm	Đúng liều lượng	0,4	0,8	1
4	Ủ trong bình cách thuỷ	Đúng 3 phút, đúng nhiệt độ 37^{0}C	0,4	0,8	1
5	Quan sát kết quả ống thứ nhất	Đúng 30 giây, nghiêng ống thứ nhất một lần	0,5	1	1,5
6	Quan sát kết quả ống thứ hai	Sau khi ống thứ nhất đông 30 giây nghiêng 1 lần.	0,5	1	1,5
7	Bấm đồng hồ dừng	Đúng thời điểm khi máu ở ống thứ hai đông	1	1,6	2
8	Ghi kết quả	Đúng đơn vị quy định	0,4	0,8	1

Bài 26

CO CỤC MÁU

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo xét nghiệm co cục máu.*
2. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ.*
3. *Trình bày được nguyên tắc xét nghiệm co cục máu.*

1. NGUYÊN TẮC

Quá trình đông máu là quá trình hình thành sợi huyết, sau đó sợi huyết co lại, qua hình dạng cục máu co ta có thể kiểm tra sơ bộ vai trò của tiểu cầu, số lượng và chất lượng của sợi huyết.

2. DỤNG CỤ

- Bơm kim tiêm nhựa, bông, cồn sát trùng.
- Bình cách thủy 37^0C
- Hai ống nghiệm thủy tinh sạch kích thước 75 x 9,5mm

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

- Lấy máu tĩnh mạch cho vào ống nghiệm, mỗi ống 2ml máu.
- Đặt hai ống nghiệm vào bình cách thủy 37^0C.
- Sau 4 giờ đọc kết quả.

4. KẾT QUẢ

4.1. Cục máu co hoàn toàn

Tạo cục máu tách biệt rõ ràng và nổi lên trên. Phần trên cục máu dính vào thành ống. Phần huyết thanh còn lại chiếm khoảng 50 đến 65% thể tích máu ban đầu.

Có ít cặn lắng hồng cầu lắng xuống đáy ống nghiệm, lớp này không được cao quá 5mm.

4.2. Cục máu co không hoàn toàn

Khối máu hầu như bám dính hoàn toàn vào thành ống, không co hoặc co rất ít. Có thể có một ít huyết thanh được tiết ra.

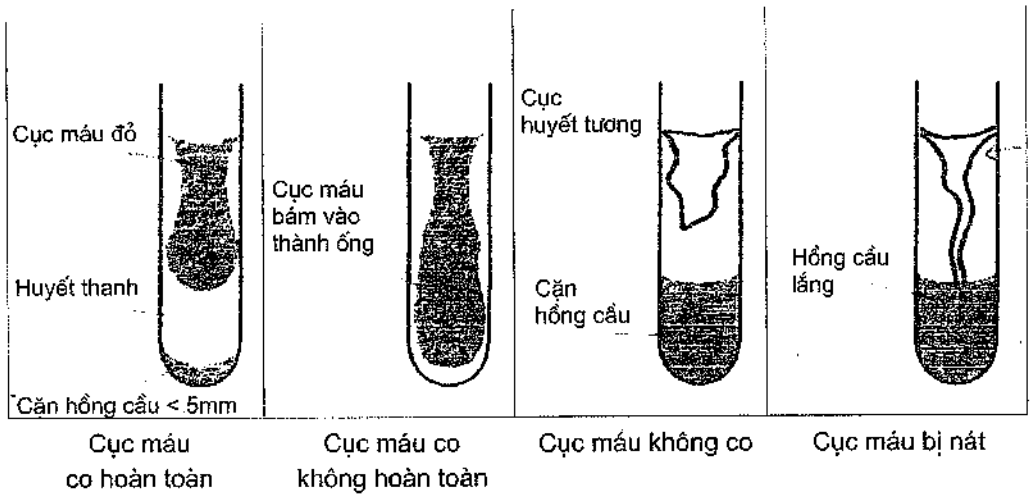
Phần huyết thanh còn lại ít dưới 40% thể tích máu ban đầu hoặc còn hồng cầu tự do.

4.3. Cục máu không co

Huyết tương vàng không tạo riêng phần huyết thanh ở trên và cặn hồng cầu lắng xuống đáy.

4.4. Cục máu bị nát

Hầu hết hồng cầu tự do trong huyết thanh. Máu nghèo sợi fibrin hoặc tăng tiểu cầu.



Hình 26.1. Các hình thái co cục máu

5. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Ống nghiệm không sạch, kích thước không đúng.
- Nhiệt độ bình cách thủy không đúng 37^{0}C.
- Lượng máu lấy không đúng, quá nhiều hay quá ít.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc thực hiện xét nghiệm co cục máu.
2. Liệt kê các bước tiến hành xét nghiệm co cục máu.
3. Mô tả cục máu co rất ít hoặc không co.
4. Mô tả cục máu co bình thường.

BẢNG KIỂM

Co cục máu

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ	Dụng cụ phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Kiểm tra tên bệnh nhân	Hỏi tên bệnh nhân để đối chiếu cẩn thận với phiếu yêu cầu xét nghiệm	0,4	0,8	1
3	Lấy máu	Lấy máu nhanh tránh tiêu huyết	0,8	1,6	2
4	Cho máu vào ống nghiệm	Nhanh gọn, đúng thể tích yêu cầu	0,8	1,6	2
5	Ủ ống nghiệm vào bình cách thuỷ	Đúng nhiệt độ 37^0C, đúng thời gian quy định	0,8	1,6	2
6	Đọc kết quả	Nhận định chính xác các hình thái co cục máu	0,8	1,6	2

Bài 27

THỜI GIAN PROTHROMBIN
(Thời gian Quick)

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo xét nghiệm thời gian prothrombin.*
2. *Chuẩn bị dụng cụ thuốc thử đầy đủ.*
3. *Trình bày được nguyên tắc, trị số bình thường và các biến đổi bệnh lý của thời gian prothrombin.*

1. NGUYÊN TẮC

Huyết tương được chống đông bằng natricitrat 3,8% sẽ khởi động quá trình đông máu theo đường ngoại sinh sau khi được hồi phục calci với sự hiện diện của thromboplastin.

2. DỤNG CỤ VÀ THUỐC THỬ

Thực hiện xét nghiệm trên máy SR ART4 đông máu bán tự động hay máy đông máu tự động.

2.1. Thuốc thử

- Neoplastin
- Nước cất

2.2. Mẫu thử

- 2ml máu chứng của người bình thường và 2ml máu bệnh nhân chống đông bằng natricitrat 3,8% theo tỷ lệ 1/10.
- Ly tâm 2.000v/phút trong 10 phút. Tách huyết tương làm thí nghiệm.

  Xét nghiệm phải được thực hiện trong vòng 4 giờ sau khi lấy máu.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

3.1. Kỹ thuật cổ điển

- Phân phối vào ống nghiệm 0,1ml huyết tương bệnh nhân
- Ủ 37°C trong 5 phút.
- Cho vào 0,2ml thromboplastin calci. Khởi động đồng hồ.
- Trộn đều trong bình cách thủy.
- Sau 9 giây đảo nhẹ và quan sát.
- Bấm đồng hồ dừng ngay khi xuất hiện màng đông.
- Ghi kết quả.

3.2. Trên máy đông máu bán tự động

- Phân bổ 50µl plasma bệnh nhân vào mỗi cóng đo.
- Nhấn đồng hồ ủ ở cột tương ứng: khi đồng hồ ủ hoạt động, xuất hiện chữ i Incubation bên phải đồng hồ, báo hiệu đang trong thời gian ủ; ký tự + báo hiệu đã vượt quá thời gian ủ.
- Chuẩn bị pipette cáp: hút đầy thuốc thử Neoplastin, bấm thử pipette cáp để loại bỏ bọt khí, chỉnh ở **nút số 2** với loại Finntip 2,5ml (1 đơn vị là 50µl).
- Khi còn 10 giây trước khi hết thời gian ủ máy sẽ báo, chuyển cóng đo từ vị trí ủ sang vị trí đo mẫu, ngắt đồng hồ ủ bằng cách nhấn phím đồng hồ ủ thêm một lần nữa và nhấn phím kích hoạt pipette.
- Trên màn hình xuất hiện mũi tên ▸ sẵn sàng đo mẫu ở vị trí số 01: dùng pipette cáp tựa đầu Finntip vào một cạnh của cóng đo, bấm pipette cáp một lần dứt khoát.

4. KẾT QUẢ

Tùy theo loại thuốc thử sử dụng.

- Trị số bình thường từ 11 đến 13 giây khi sử dụng thromboplastin có hoạt tính đầy đủ. Kéo dài hơn huyết tương chứng 2 giây là bệnh lý.
- Kết quả có thể biểu thị bằng thời gian (giây) hoặc bằng phần trăm.
- Ngày nay, để tránh những sai sót kết quả do các loại thromboplastin khác nhau, Ủy ban chuẩn hóa 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). Từ đó tính ra chỉ số hiệu chỉnh quốc tế INR.

Cách tính INR (International Normalized Ratio):

$$INR = \left(\frac{PT_{bệnh}}{PT_{chứng}} \right)^{ISI}$$

5. BIỆN LUẬN

Thời gian Quick khảo sát con đường đông máu ngoại sinh gồm các yếu tố đông máu VII, X, V, II và I.

Thời gian Quick kéo dài trong các trường hợp rối loạn đường đông máu ngoại sinh như:

- Thiếu hụt các yếu tố: VII, X, V, II, I.
- Dùng thuốc chống đông dicumaron.
- Điều trị thuốc chống đông vitamin K.

6. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Sai tỷ lệ chống đông, có hiện tượng đông dây ở mẫu bệnh phẩm.
- Tiến hành kỹ thuật sau 4 giờ kể từ khi lấy máu với mẫu máu được bảo quản ở nhiệt độ phòng.
- Do chất lượng thrombplastin không đảm bảo hoặc sử dụng thromboplastin đã bảo quản lâu sau khi pha chế.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc của thời gian prothrombin.
2. Trình bày tiến trình kỹ thuật của xét nghiệm thời gian prothrombin.
3. Cho biết trị số bình thường của thời gian prothrombin.
4. Biện luận các biến đổi bệnh lý của thời gian prothrombin.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ.	Dụng cụ phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Kiểm tra tên bệnh nhân.	Đối chiếu tên trên phiếu thử và tên trên mẫu máu cẩn thận	0,4	0,8	1
3	Ly tâm máu trước khi lấy huyết tương.	Lấy huyết tương không lẫn máu.	0,8	1,6	2
4	Cho huyết tương vào ống nghiệm.	Đúng thể tích và thời gian theo yêu cầu loại xét nghiệm.	0,8	1,6	2
5	Ủ ở 37°C	Đúng thời gian	0,4	0,8	1
6	Cho thêm thromboplastin calci	Động tác nhanh gọn, liều lượng đủ	0,8	1,6	2
7	Đọc kết quả	Đúng, chính xác	0,4	0,8	1

Bài 28

THỜI GIAN THROMBOPLASTIN TỪNG PHẦN HOẠT HÓA
(APTT = Activated Partial Thromboplastin time)

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo xét nghiệm thời gian thromboplastin từng phần hoạt hóa.*
2. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ hóa chất.*
3. *Trình bày được nguyên tắc, trị số bình thường và các biến đổi bệnh lý của thời gian APTT.*

1. NGUYÊN TẮC

Thời gian phục hồi calci của huyết tương citrat hóa khi ủ với một lượng thừa kaolin và cephalin. Kaolin có tác dụng hoạt hóa yếu tố tiếp xúc. Cephalin thay thế yếu tố 3 tiểu cầu.

2. DỤNG CỤ VÀ HÓA CHẤT

2.1. Dụng cụ

- Máy đông máu bán tự động hay tự động.
- Dụng cụ lấy máu tĩnh mạch.
- Micro pipette
- Bình cách thủy 37^0C

2.2. Thuốc thử

- Dung dịch chống đông natricitrat 3,8%
- CK Prest.
- $CaCl_2$ 0,025M
- Nước cất

2.3. Mẫu thử

- 2ml máu của người bình thường và 2ml máu bệnh nhân chống đông bằng natricitrat 3,8% theo tỉ lệ 1/10.
- Ly tâm chích lấy huyết tương và thực hiện xét nghiệm trước 4 giờ sau khi lấy máu.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

3.1. Kỹ thuật cổ điển

- Phân phối 0,1ml huyết tương nghèo tiểu cầu chứng và huyết tương của bệnh nhân vào ống nghiệm.
- Ủ ở bình cách thủy 37^0C.
- Thêm vào mỗi ống 0,1ml thuốc thử cephalin - kaolin, trộn đều ủ ở bình cách thủy 37^0C thời gian 3 phút.
- Lắc trộn đều mỗi 15 giây 1 lần.
- Cho thêm 0,1ml $CaCl_2$ 0,025M
- Khởi động đồng hồ - theo dõi đến khi có ống đông xuất hiện - bấm đồng hồ dừng.

3.2. Trên máy bán tự động

Từ màn hình chính, chọn chương trình đo mẫu test mode (số 1), ấn enter.

- Trên màn hình xuất hiện danh mục các loại xét nghiệm, chọn xét nghiệm APTT.
- Trên màn hình xuất hiện dòng chữ Patient Identification: I... chọn số thứ tự của bệnh nhân và nhấn enter.
- Phân bổ 50µl plasma bệnh nhân vào mỗi cóng đo.
- Nhấn đồng hồ ủ ở cột tương ứng: khi đồng hồ ủ hoạt động, xuất hiện chữ i Incubation bên phải đồng hồ, báo hiệu đang trong thời gian ủ, ký tự + báo hiệu đã vượt quá thực hiệng ủ.
- Chuẩn bị pipette cáp: hút đầy thuốc thử $CaCl_2$, bấm thử pipette cáp để loại bỏ bọt khí, chỉnh ở **nút số 2** với loại Finntip 1,25ml (1 đơn vị là 25µl).
- Khi còn 10 giây trước khi hết thời gian ủ, máy sẽ báo, chuyển cóng đo từ vị trí ủ sang vị trí đo mẫu, ngắt đồng hồ ủ bằng cách nhấn phím đồng hồ ủ thêm một lần nữa và nhấn phím kích hoạt pipette.
- Trên màn hình xuất hiện mũi tên ▶ sẵn sàng đo mẫu ở vị trí số 01: dùng pipette cáp tựa đầu Finntip vào một cạnh của cóng đo, bấm pipette cáp một lần dứt khoát.

4. KẾT QUẢ

Tùy theo loại thuốc thử sử dụng, trị số bình thường của APTT thay đổi từ 30 đến 35 giây so với huyết tương chứng.

Kéo dài hơn huyết tương chứng 08 giây là thời gian thromboplastin từng phần hoạt hóa kéo dài.

5. BIỆN LUẬN

- Thời gian APTT khảo sát đường đông máu nội sinh gồm các yếu tố đông máu XII, XI, IX, VIII, X, V, II, I và các yếu tố đụng chạm.
- APTT kéo dài do có sự rối loạn con đường đông máu nội sinh do:
  + Thiếu hụt các yếu tố của giai đoạn đụng chạm: XII, XI, prekallicrein, kininogen.
  + Giảm tiểu cầu nặng.
  + Thiếu hụt các yếu tố thuộc đường đông máu nội sinh: IX, VIII, X, V, II, I.
  + Có chất kháng đông lưu hành hoặc đang điều trị bằng heparin.

6. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Thời gian ủ không đủ
- Không trộn đều thuốc thử cephalin - kaolin trước khi sử dụng.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc thời gian APTT.
2. Liệt kê các bước tiến hành xét nghiệm APTT.
3. Mục tiêu của xét nghiệm thời gian APTT.
4. Cho biết trị số bình thường của thời gian APTT.
5. Biện luận các biến đổi bệnh lý của thời gian APTT.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ.	Dụng cụ phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Kiểm tra tên bệnh nhân.	Đối chiếu tên trên phiếu thử và tên trên mẫu máu cẩn thận	0,4	0,8	1
3	Ly tâm máu trước khi lấy huyết tương.	Lấy huyết tương không lẫn máu.	0,4	0,8	1
4	Cho huyết tương vào ống nghiệm	Đúng thể tích quy định	0,6	1,2	1,5
5	Ủ mẫu thử	Đúng nhiệt độ 37^{0}C	0,4	0,8	1
6	Thêm cephalin - kaolin	Đúng thể tích quy định	0,6	1,2	1,5
7	Nhỏ $CaCl_2$	Nhanh, gọn và đúng thể tích	0,6	1,2	1,5
8	Bấm đồng hồ dừng	Ngay khi màng đông xuất hiện	0,6	1,2	1,5

Bài 29

THỜI GIAN VON-KAULLA

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo kỹ thuật xét nghiệm Von-Kaulla*
2. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ, thuốc thử*
3. *Trình bày được nguyên tắc kỹ thuật Von-Kaulla*

1. NGUYÊN TẮC

Khi huyết tương được acid hóa và pha loãng sẽ làm tủa fibrinogen và các yếu tố hoạt hoá, loại bỏ các chất ức chế tiêu sợi huyết. Theo dõi thời gian tan sau khi tủa này được làm đông sẽ phát hiện được tình trạng hoạt hoá quá trình tiêu sợi huyết.

2. DỤNG CỤ, HÓA CHẤT, THUỐC THỬ

- Bình cách thủy 37^{0}C.
- Đồng hồ bấm giây.
- Đệm Michaelis pH 7,35
- $CaCl_2$ M/10.
- Acid acetic 2%

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

- Lấy máu và tách huyết tương: máu tĩnh mạch chống đông bằng citratnatri 3,8% với tỷ lệ 1 thể tích chất chống đông trộn với 9 thể tích máu. Ly tâm mạnh (2.500vòng/phút x 15phút), tách lấy huyết tương nghèo tiểu cầu.
- Phân phối 0,3 ml huyết tương nghèo tiểu cầu vào ống nghiệm tan máu.
- Cho thêm vào 3ml nước cất.
- Cho vào 1 đến 2 giọt acid acetic 2% sao cho pH đạt 5,2.

- Ly tâm 2.500vòng/phút x 20 phút.
- Gạn bỏ nước trong, giữ lại phần tủa. Dùng giấy thấm, thấm nhẹ nhàng hết nước còn bám lại trên thành ống.
- Cho vào 0,3 ml dung dịch đệm Michaelis pH 7,35 đã pha loãng 1/4 với dung dịch NaCl 0,9%, dùng que thủy tinh đánh tan tủa.
- Cho thêm vào 1 giọt $CaCl_2$ M/10, trộn đều và đặt ống nghiệm vào bình cách thuỷ 37^0C, chờ đông.
- Sau khi đông, cứ 15 phút theo dõi tình trạng tan cục đông một lần cho đến khi tan hoàn toàn.

4. KẾT QUẢ

Đánh giá kết quả dựa vào thời gian tan hoàn toàn sau khi đông:

Trên 60 phút: bình thường

45 - 60 phút: tiêu sợi huyết tiềm tàng

30 - 45 phút: tiêu sợi huyết bán cấp

15 - 30 phút: tiêu sợi huyết cấp

Trước 15 phút: tiêu sợi huyết tối cấp

Nghiệm pháp Von - Kaulla dương tính chứng tỏ một tình trạng bệnh lý tăng hoạt hóa quá trình tiêu sợi huyết, thường gặp trong đông máu rải rác trong lòng mạch (DIC), tiêu sợi huyết, điều trị thuốc tan huyết khối...

5. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Không tạo được cục đông do: lượng acid acetic cho vào không đảm bảo độ pH đạt 5,2; ly tâm không đạt tốc độ, không đủ thời gian quy định nên không thu đủ tủa; chất lượng $CaCl_2$ không đảm bảo...
- Cục đông bị tan do động tác, thời gian kiểm tra theo dõi tình trạng tan cục đông không đúng.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc của nghiệm pháp Von-Kaulla
2. Liệt kê các bước tiến hành kỹ thuật
3. Cách đánh giá kết quả
4. Liệt kê các nguyên nhân sai lầm

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ, thuốc thử	Dụng cụ, thuốc thử phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Kiểm tra tên bệnh nhân	Đối chiếu tên bệnh nhân trên phiếu thử và tên trên mẫu máu cẩn thận	0,4	0,8	1
3	Ly tâm máu	Đúng tốc độ. Tách huyết tương nghèo tiểu cầu	0,8	1,6	2
4	Cho huyết tương vào ống nghiệm	Đúng thể tích 0,3ml huyết tương	0,8	1,6	2
5	Cho acid acetic và đệm Michaelis vào ống nghiệm huyết tương	Đúng thể tích và đúng quy trình	0,8	1,6	2
6	Đọc kết quả	Đánh giá kết quả đúng quy định	0,8	1,6	2

Bài 30

NGHIỆM PHÁP RƯỢU
(NGHIỆM PHÁP L'ETHANOL)

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo kỹ thuật nghiệm pháp rượu*
2. *Trình bày được nguyên tắc của nghiệm pháp rượu*
3. *Trình bày cách đánh giá kết quả và liệt kê các nguyên nhân sai lầm*

1. NGUYÊN TẮC

Khi thrombin tác động lên fibrinogen tạo thành các monomer fibrin, hầu hết các monomer fibrin trùng hợp để tạo fibrin, trong những trường hợp lượng monomer fibrin quá nhiều sẽ hình thành phức hệ hoà tan với fibrinogen và FDP (sản phẩm thoái giáng fibrinogen và fibrin). Những phức hệ này có thể được phát hiện in vitro bởi ethanol ở điều kiện 10^0C.

2. DỤNG CỤ, HÓA CHẤT, THUỐC THỬ

- Cồn tuyệt đối (99°)
- Nước cất
- Tủ lạnh

3. TIẾN TRÌNH 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 với 9 thể tích máu. Ly tâm nhẹ, tách lấy huyết tương giàu tiểu cầu.
- Phân phối 0,45 ml huyết tương giàu tiểu cầu vào ống nghiệm
- Cho thêm 0,15ml cồn tuyệt đối (cồn 99 độ) đã pha loãng 1/2 với nước cất, trộn đều.
- Đặt vào tủ lạnh ở điều kiện 4^0C trong 10 phút.

4. KẾT QUẢ

- .Có sự hình thành gel là dương tính.

– Trường hợp tạo tủa: nghi ngờ.

Nghiệm pháp rượu dương tính thể hiện một tình trạng hoạt hóa hệ thống đông máu, thường gặp trong hội chứng đông máu rải rác trong lòng mạch.

5. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

– Dụng cụ lấy máu không đúng quy cách: lấy máu vào ống thủy tinh.

– Mẫu máu xét nghiệm bị đông, hoặc ly tâm quá mạnh khi thu huyết tương, do vậy không đảm bảo huyết tương giàu tiểu cầu.

– Chất lượng của cồn.

– Nhiệt độ tủ lạnh không đúng.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc của nghiệm pháp rượu.
2. Liệt kê các bước tiến hành kỹ thuật.
3. Liệt kê nguyên nhân sai lầm.
4. Cách đánh giá kết quả.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ, thuốc thử	Dụng cụ, thuốc thử phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Kiểm tra tên bệnh nhân	Đối chiếu tên bệnh nhân trên phiếu thử và tên trên mẫu máu cẩn thận	0,4	0,8	1
3	Ly tâm máu	Đúng tốc độ. Tách huyết tương giàu tiểu cầu	0,8	1,6	2
4	Cho huyết tương vào ống nghiệm	Đúng thể tích 0,45ml huyết tương	0,8	1,6	2
5	Cho cồn tuyệt đối vào ống nghiệm huyết tương	Đúng thể tích và đúng quy trình	0,4	0,8	1
6	Ủ trong tủ lạnh	Đúng nhiệt độ (4^0C) và thời gian 10 phút.	0,4	0,8	1
7	Đọc kết quả	Đọc kết quả đúng quy định	0,8	1,6	2

Bài 31

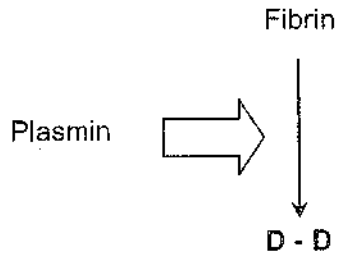
ĐỊNH LƯỢNG D-DIMER

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo xét nghiệm định lượng D - Dimer*
2. *Trình bày được nguyên tắc của xét nghiệm định lượng D - Dimer*
3. *Biện luận được các biến đổi bệnh lý của nồng độ D - Dimer*

1. NGUYÊN TẮC

Khi plasmin tác dụng lên fibrin sẽ giải phóng các D-Dimer. Sử dụng kháng thể kháng kháng nguyên D-Dimer để đánh giá nồng độ D-Dimer, qua đó phản ánh tình trạng tiêu fibrin.



2. DỤNG CỤ, HÓA CHẤT, THUỐC THỬ

Bộ kit làm xét nghiệm D-Dimer, bao gồm:

- Latex reagent: hỗn dịch Latex gắn kháng thể kháng kháng nguyên D-Dimer.
- D-Dimer để hiệu chuẩn.
- Dung dịch đệm để pha loãng.
- Chứng âm.
- Chứng dương.
- Tấm card chuyên dụng để thực hiện phản ứng (trường hợp tiến hành bằng tay bán định lượng).
- Hoặc máy đông máu tự động có chương trình làm xét nghiệm định lượng D-Dimer.

3. TIẾN TRÌNH 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 trộn với 9 thể tích máu. Ly tâm mạnh (2.500 vòng /phút x 15 phút), tách lấy huyết tương nghèo tiểu cầu.
- Tiến hành bằng tay:
  + Trong một vòng tròn trên tấm card làm xét nghiệm, cho 20µl mẫu huyết tương cần kiểm tra (không pha loãng).
  + Trong một vòng tròn khác trên tấm card làm xét nghiệm, cho 20µl chứng dương.
  + Trong một vòng tròn tiếp theo trên tấm card làm xét nghiệm, cho 20µl chứng âm.
  + Cho thêm vào mỗi vòng tròn trên đây 20µl Latex reagent (hỗn dịch Latex gắn kháng thể kháng kháng nguyên D-Dimer). Trộn đều; nghiêng và trộn trong vòng 2 đến 3 phút.
  + Kiểm tra ngưng kết xuất hiện ở các vòng tròn, so sánh với vòng tròn có chứng dương và chứng âm để đánh giá kết quả.
  + Trường hợp dương tính, tiếp tục bán định lượng bằng cách pha loãng huyết tương mẫu cần kiểm tra ở các nồng độ 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 và tiến hành kỹ thuật.

Tính kết quả:

Mẫu kiểm tra					Nồng độ (µg/ml)	
Để nguyên	Pha 1/2	Pha 1/4	Pha 1/8	Pha 1/16		
(-)					<0,05	
(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	≥ 0,5	< 1,0
(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	≥ 1,0	< 2,0
(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	≥ 2,0	< 4,0
(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	≥ 4,0	< 8,0
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	≥ 8,0	

- Tiến hành bằng máy đông máu tự động:

Tùy theo từng loại máy, từng serie máy, các bước thao tác có thể không hoàn toàn giống nhau. Tuy nhiên, thường tiến hành qua các bước sau:

- Mẫu huyết tương: máu chống đông bằng citrat natri, theo tỷ lệ 1 thể tích chống đông trộn với 9 thể tích máu; ly tâm mạnh, thu huyết tương nghèo tiểu cầu.
- Bật máy, chờ đủ nhiệt độ.
- Đặt các hóa chất, huyết tương vào đúng vị trí theo quy định của từng loại máy.
- Vào chương trình làm xét nghiệm định lượng D-Dimer.

4. KẾT QUẢ

Tùy theo phương pháp tiến hành, tùy theo loại máy, hóa chất, thuốc thử sử dụng, nồng độ D-Dimer bình thường trong huyết tương không giống nhau. Mỗi phòng xét nghiệm nên có chỉ số bình thường của riêng mình.

Nồng độ D-Dimer trong huyết tương tăng gặp trong các trường hợp tăng tình trạng tiêu fibrin, thường gặp trong các tình trạng bệnh lý: đông máu rải rác trong lòng mạch (DIC), tiêu sợi huyết tiên phát, huyết khối. Nồng độ D-Dimer cũng tăng ở những trường hợp có thai, sau can thiệp, phẫu thuật, chấn thương...

Nồng độ D-Dimer không tăng, có giá trị loại trừ những trường hợp đang nghi ngờ huyết khối (giá trị âm tính).

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc định lượng D-Dimer.
2. Liệt kê các bước tiến hành kỹ thuật.
3. Ý nghĩa của sự tăng, sự giảm nồng độ D-Dimer.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ, thuốc thử	Dụng cụ, thuốc thử phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Kiểm tra tên bệnh nhân	Đối chiếu tên bệnh nhân trên phiếu thử và tên trên mẫu máu cẩn thận	0,4	0,8	1
3	Ly tâm máu	Đúng tốc độ. Tách lấy huyết tương nghèo tiểu cầu	0,8	1,6	2
4	Cho huyết tương chứng âm, chứng dương trên tấm card xét nghiệm	Đúng thể tích quy định (20µl)	0,8	1,6	2
5	Đọc kết quả	Đọc kết quả đúng quy định, chính xác.	0,8	1,6	2
6	Trong trường hợp dương tính phải bán định lượng	Bán định lượng đúng các nồng độ bằng cách pha loãng huyết tương cần kiểm tra ở nồng độ 1/2, 1/4, 1/8 và 1/16.	0,8	1,6	2

Bài 32

ĐỊNH LƯỢNG CÁC YẾU TỐ ĐÔNG MÁU THAM GIA ĐƯỜNG ĐÔNG MÁU NỘI SINH

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo xét nghiệm định lượng các yếu tố đông máu tham gia đường đông máu nội sinh.*
2. *Trình bày được nguyên tắc của xét nghiệm định lượng các yếu tố đông máu tham gia đường đông máu nội sinh.*

1. NGUYÊN TẮC

Xét nghiệm APTT bị kéo dài khi thiếu hụt một trong các yếu tố tham gia đường đông máu nội sinh: VIIIC, IX, XI và XII. Thời gian của xét nghiệm này phụ thuộc nồng độ của yếu tố bị thiếu hụt khi các yếu tố khác ở tình trạng đầy đủ không còn ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm.

2. KỸ THUẬT

2.1. Định lượng yếu tố VIIIC

2.1.1. Dụng cụ hóa chất

- Huyết tương thử không có yếu tố VIIIC, thường nồng độ yếu tố VIIIC của huyết tương này < 1% và đảm bảo không có chất ức chế kháng VIIIC.
- Huyết tương chứng (normal plasma): mẫu huyết tương này có nồng độ yếu tố VIIIC biết rõ.
- Thuốc thử làm xét nghiệm APTT.
- Bình cách thủy 37^{0}C, pipette tự động nếu tiến hành bằng tay.
- Máy đông máu tự động hoặc bán tự động cài đặt chương trình định lượng yếu tố đông máu

2.1.2. Tiến trình kỹ thuật

- Lấy máu bệnh nhân tách huyết tương như xét nghiệm APTT.

– Pha loãng huyết tương:

+ Pha loãng huyết tương chứng theo tỷ lệ: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 (nếu tiến hành bằng tay).

+ Pha loãng huyết tương bệnh nhân theo tỷ lệ 1/10 (nếu tiến hành bằng tay).

– Tiến hành xét nghiệm:

+ Xây dựng đồ thị chuẩn:

Trong một dãy ống nghiệm: mỗi ống cho 0,1ml huyết tương chứng ở mỗi nồng độ pha loãng, cho thêm vào:

- 0,1ml huyết tương không có yếu tố VIII C
- 0,1ml hỗn dịch cephalin-kaolin

Ủ ở bình cách thuỷ 37^0C trong 3 phút. Trong thời gian này, cứ 15 giây trộn đều một lần.

Sau đó thêm 0,1ml $CaCl_2$ 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 VIIIC. Đồ thị sẽ là một đường thẳng nối liền 4 điểm của 4 nồng độ pha loãng của huyết tương chứng.

+ 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 VIIIC.

– Trường hợp sử dụng máy đông máu:

+ Vào chương trình định lượng yếu tố, có hai cách: hoặc vào chương trình single factor assay (trường hợp chỉ định lượng yếu tố VIIIC) hoặc chương trình intrinsic factor assay (trường hợp định lượng một số yếu tố đường đông máu nội sinh). Tiến hành hiệu chuẩn nếu chưa hiệu chuẩn hoặc có sự thay đổi bất kỳ nào về hoá chất, dung dịch pha loãng.

+ Chuẩn bị mẫu chứng, huyết tương không có yếu tố VIIIC theo chỉ dẫn có sẵn trong hộp hoá chất. Cần lưu ý đảm bảo thời gian đủ để hóa chất, sinh phẩm đạt độ hoạt hoá sau khi trả lại nước cất theo quy định.

+ Chuẩn bị mẫu huyết tương bệnh: tùy theo loại máy, serie máy, độ pha loãng thường không giống nhau. Tiến hành theo chỉ dẫn trên màn hình.

2.1.3. Nguyên nhân sai lầm

– Không đảm bảo độ chính xác khi pha loãng các nồng độ mẫu chứng và do đó đường chuẩn trên đồ thị không đi qua 3 điểm.

– Tiến hành kỹ thuật với mẫu bệnh và chứng sau khi pha loãng quá lâu: tốt nhất nên tiến hành ngay khi pha loãng hoặc không quá 30 phút sau khi pha.

2.2. Định lượng các yếu tố khác

Đối với các yếu tố tham gia đường đông máu nội sinh, các bước tiến hành tương tự định lượng yếu tố VIIIC, chỉ thay mẫu huyết tương không có yếu tố VIIIC bằng mẫu huyết tương không có yếu tố cần định lượng.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày các bước trong tiến trình kỹ thuật định lượng yếu tố VIIIC.
2. Các nguyên nhân sai lầm.
3. Nguyên tắc việc định lượng các yếu tố đông máu tham gia đường nội sinh.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ, thuốc thử	Dụng cụ, thuốc thử phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Kiểm tra tên bệnh nhân	Đối chiếu tên bệnh nhân trên phiếu thử và tên trên mẫu máu cẩn thận	0,4	0,8	1
3	Ly tâm máu	Đúng tốc độ	0,8	1,6	2
4	Xây dựng đồ thị chuẩn	Đúng quy trình	0,8	1,6	2
5	Cho huyết tương vào ống nghiệm	Đúng thể tích (0,1ml)	0,8	1,6	2
6	Đọc kết quả	Đúng quy định	0,8	1,6	2

Bài 33

XÁC ĐỊNH SỰ CÓ MẶT CỦA CÁC CHẤT KHÁNG ĐÔNG LƯU HÀNH ĐƯỜNG NỘI SINH

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo xét nghiệm xác định sự có mặt của các chất kháng đông lưu hành đường nội sinh.*
2. *Trình bày được nguyên tắc xét nghiệm xác định sự có mặt của các chất kháng đông lưu hành đường nội sinh.*
3. *Trình bày được công thức tính kết quả Rosner và biện luận kết quả .*

1. NGUYÊN TẮC

Nguyên lý phát hiện kháng đông lưu hành dựa vào khả năng bù của các yếu tố đông máu. Thông thường, các xét nghiệm đông máu vẫn trong giới hạn bình thường ngay cả khi nồng độ các yếu tố chỉ đạt 50%. Vì vậy, khi trộn huyết tương bệnh nhân với huyết tương bình thường, các kết quả xét nghiệm sẽ trở về bình thường nếu bệnh nhân thiếu hụt yếu tố đông máu. Kết quả xét nghiệm không về bình thường trong trường hợp có chất ức chế quá trình đông máu.

2. DỤNG CỤ, THUỐC THỬ, HÓA CHẤT

- Bình cách thủy 37^{0}C
- Đồng hồ bấm giây.
- Ống nghiệm tan máu kích thước 75 x 9,5mm.
- Huyết tương chứng.
- Hoá chất, thuốc thử kỹ thuật APTT

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

- Lấy máu tách huyết tương tương tự làm xét nghiệm APTT.
- Tiến hành xét nghiệm APTT 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.

4. KẾT QUẢ

$$\text{Chỉ số Rosner} = \frac{\text{APTT(bệnh + chứng)} - \text{APTT chứng}}{\text{APTT bệnh}} \times 100$$

– Khi chỉ số này < 12: kháng đông nội sinh âm tính.

– Khi chỉ số này > 12 và < 15: kháng đông nội sinh nghi ngờ.

– Khi chỉ số này > 15: kháng đông nội sinh dương tính.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Nguyên tắc xét nghiệm tìm chất kháng đông lưu hành đường nội sinh.
2. Biện luận kết quả.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ, thuốc thử	Dụng cụ, thuốc thử phải đầy đủ	0,8	1,6	2
2	Kiểm tra tên bệnh nhân	Đối chiếu tên bệnh nhân trên phiếu thử và tên trên mẫu máu cẩn thận	0,8	1,6	2
3	Ly tâm máu	Đúng tốc độ, tách huyết tương không lẫn máu	0,8	1,6	2
4	Cho huyết tương chứng, huyết tương bệnh, huyết tương hỗn hợp chứng bệnh vào ống nghiệm	Đúng thể tích	0,8	1,6	2
5	Tính kết quả	Chính xác	0,8	1,6	2

Bài 34

ĐỊNH LƯỢNG CÁC YẾU TỐ CHỐNG ĐÔNG SINH LÝ ANTITHROMBIN III, PROTEIN C, PROTEIN S

MỤC TIÊU

1. *Chuẩn bị được đầy đủ dụng cụ, thuốc thử, để định lượng các yếu tố chống đông sinh lý.*
2. *Trình bày được nguyên tắc xét nghiệm và trị số bình thường của antithrombin III, protein C, protein S.*
3. *Trình bày được cách bảo quản mẫu thử, thuốc thử và tiến trình kỹ thuật định lượng antithrombin III, protein C, protein S.*

1. ĐỊNH LƯỢNG ANTITHROMBIN III

1.1. Nguyên tắc

Bộ kit STA – Stachrom AT III dùng để định lượng mức độ hoạt động của antithrombin III (AT III) trong huyết tương bằng phương pháp tổng hợp so màu.

Đầu tiên huyết tương bệnh nhân được ủ với thrombin dư thừa trong sự hiện diện của heparin.

Thrombin dư thừa được xác định bởi phản ứng tổng hợp màu CBS 61.50 (pNA sinh ra đo ở mức sóng 450 nm). Số lượng thrombin được trung hòa trong bước phản ứng đầu là cân bằng số lượng với AT III hiện diện trong huyết tương thực nghiệm.

Kỹ thuật thử nghiệm này không ảnh hưởng bởi liều điều trị heparin đối với bệnh nhân.

1.2. Thuốc thử

- Thuốc thử 1: khoảng 12 NIH units of bovine thrombin /ml, đông khô.
- Thuốc thử 2: Chromogenic substrate CBS 61,50, EtM-Spro-Arg-Pna.AcOH, khoảng 1,4μM/m, đông khô.
- Thuốc thử 3: 3ml heparin hòa tan.

Chuẩn bị:

- Thuốc thử 1: lấy lọ thuốc thử 3, lắc kỹ và đổ vào lọ thuốc thử 1.

Trộn đều và để yên 60 phút /nhiệt độ phòng.

Thuốc thử sau khi pha bền 14 ngày ở 20^0C

45 ngày ở 2 – 8^0C

Thuốc thử 2: cho 3ml nước cất vào lọ thuốc thử 2.

Trộn đều và để yên 60 phút ở nhiệt độ phòng.

Thuốc thử sau khi pha bền 14 ngày ở 20^0C

45 ngày ở 2 – 8^0C

1.3. Mẫu thử

- Mẫu máu được chống đông với trisodium citrate 0,109M theo tỷ lệ 9:1
- Ly tâm mẫu máu ở 2.500 vòng /15 phút.
- Huyết tương bền trong: 8 giờ ở 20^0C

  2 ngày ở 2 – 8^0C

  1 tháng ở –20^0C
- Mẫu thử được pha loãng 1/30 với NaCl 0,15M.

1.4. Quy trình kỹ thuật

Cho vào ống nghiệm ủ ở nhiệt độ 37^0C	
– Mẫu thử	200ml
– Ủ	2 – 4 phút
– Thuốc thử 1	200ml
– Trộn và ủ ở 37^0C chính xác	60 giây
– Thuốc thử 2	200ml
– Trộn và ủ ở 37^0C chính xác	60 giây
– Acetic acid	200ml
– Trộn đều	
Màu sẽ bền trong nhiều giờ.	
Đo ở bước sóng 405nm.	

1.5. Trị số bình thường

- Trị số bình thường của antithrombin III từ 80% đến 120%.

- Phụ nữ ở thời kỳ mãn kinh có trị số AT III thấp hơn so với nam. Phụ nữ mang thai vào tuần thứ 13 có sự giảm AT III.
- Sự giảm ATIII sẽ đưa đến tình trạng tăng đông máu, hậu quả dẫn đến huyết khối và tắc mạnh.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc định lượng AT III.
2. Trình bày tiến trình kỹ thuật định lượng AT III.
3. Cho biết trị số bình thường của ATIII và biến đổi bệnh lý.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị thuốc thử	Đúng và đầy đủ	0,8	1,6	2
2	Kiểm tra bệnh nhân	Đối chiếu tên bệnh nhân trên phiếu yêu cầu xét nghiệm và mẫu máu cẩn thận	0,8	1,6	2
3	Ly tâm máu, tách huyết tương	Tách huyết tương không lẫn máu	0,8	1,6	2
4	Cho mẫu thử và thuốc thử vào ống nghiệm	Đúng thể tích: 200ml huyết tương, 200ml thuốc thử 1 và thuốc thử 2	0,8	1,6	2
5	Ủ mẫu thử	Đúng nhiệt độ: 37^0C Đúng thời gian: 60 giây	0,8	1,6	2

2. ĐỊNH LƯỢNG PROTEIN C

2.1. Nguyên tắc

Bộ kit STA – Staclot Protein C dùng để định lượng protein C dựa vào sự kéo dài thời gian hoạt hóa một phần thromboplastin.

Protein C được kích hoạt do sự hiện diện chất hoạt hóa chuyên biệt được trích từ Agkistrodon c. contotrix venom. Protein C hoạt hóa sẽ ức chế yếu tố V và yếu tố VIII làm kéo dài thời gian APTT của một hệ thống tất cả các yếu tố hiện diện trong mẫu thử nghiệm, ngoại trừ protein C.

2.2. Thuốc thử

- Thuốc thử 1: Liophilized human plasma, không có protein C.
- Thuốc thử 2: Highly purified extract of Agkistrodon c. contitrix venom capable of activating protein C specifically, dạng đông khô.

Chuẩn bị:

- Cho 1 ml nước cất vào mỗi lọ thuốc thử 1, thuốc thử 2.
- Để yên thuốc thử ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, trộn đều trước khi dùng.
- Thuốc thử sau khi pha bền 8 giờ ở nhiệt độ 20^0C.

2.3. Mẫu thử

- Mẫu máu được chống đông với trisodium citrat 0,109M.
- Ly tâm mẫu máu ở 2.500 vòng / 15 phút.
- Huyết tương bền trong: 8 giờ ở 20^0C.
  2 ngày ở 2 – 8^0C.
  1 tháng ở –20^0C.

Chuẩn bị: Huyết tương được pha loãng 1/10 với dung dịch đệm Owren - Koller.

2.4. Quy trình kỹ thuật

Cho vào ống nghiệm ủ ở nhiệt độ 37^0C:

Mẫu thử	0,1 ml
Thuốc thử 1	0,1 ml
Thuốc thử 2	0,1 ml
Trộn và ủ ở 37^0C trong	180 giây
Thêm $CaCl_2$ 0, 025 M đã làm ấm ở 37^0C	0,1 ml

Trộn đều. Ghi nhận thời gian đông

2.5. Trị số bình thường

- Trị số bình thường của protein C từ 70% đến 130%.
- Trẻ sơ sinh: protein C thấp.
- Protein C không phụ thuộc theo tuổi và giới tính.
- Sự giảm protein C sẽ dẫn đến tình trạng tăng đông máu. Hậu quả là huyết khối và tắc mạch.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc định lượng protein C.
2. Trình bày tiến trình kỹ thuật định lượng protein C.
3. Trị số bình thường của protein C và các thay đổi bệnh lý.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị thuốc thử	Đúng và đầy đủ	0,8	1,6	2
2	Kiểm tra bệnh nhân	Đối chiếu tên bệnh nhân trên mẫu máu và phiếu yêu cầu xét nghiệm	0,8	1,6	2
3	Ly tâm máu, tách huyết tương	Tách huyết tương không lẫn máu	0,8	1,6	2
4	Cho mẫu thử, thuốc thử vào ống nghiệm	Đúng thể tích: mẫu thử là 1ml huyết tương, thuốc thử 0,1ml.	0,8	1,6	2
5	Ủ mẫu thử	Đúng thời gian quy định là 180 giây; Đúng nhiệt độ là 37^0C.	0,8	1,6	2

3. ĐỊNH LƯỢNG PROTEIN S

3.1. Nguyên tắc

Bộ kit STA – Staclot Protein S dùng để định lượng protein S dựa vào nguyên tắc của sự ức chế yếu tố V hoạt hóa.

Nguyên tắc của thử nghiệm dựa vào hoạt động đồng yếu tố của protein S làm tăng hoạt động kháng đông của protein hoạt hóa. Sự gia tăng này được phản ánh bằng sự kéo dài thời gian đông của một hệ thống giàu yếu tố V hoạt hóa, là một chất nền sinh học cho protein C hoạt hóa.

3.2. Thuốc thử

- Thuốc thử 1: Liophilized human plasma, không có protein S.
- Thuốc thử 2: Human actived protein C, dạng đông khô.
- Thuốc thử 3: Bovine factor Va, dạng đông khô.

Chuẩn bị:

- Cho 1 ml nước cất vào mỗi lọ thuốc thử 1, thuốc thử 2 và thuốc thử 3.
- Để yên thuốc thử ở nhiệt độ phòng trong 60 phút, trộn đều trước khi dùng.

– Thuốc thử sau khi pha bền 8 giờ ở nhiệt độ 20^{0}C.

3.3. Mẫu thử

– Mẫu máu được chống đông với trisodium citrat 0,109M.

– Ly tâm mẫu máu ở 2.500 vòng / 15 phút.

– Huyết tương bền trong: 8 giờ ở 20^{0}C.
2 ngày ở 2 – 8^{0}C
1 tháng ở –20^{0}C

Chuẩn bị: Mẫu thử được pha loãng 1M/10 với dung dịch đệm Owren - Koller.

3.4. Quy trình kỹ thuật

Cho vào ống nghiệm ủ ở nhiệt độ 37^{0}C:

Mẫu thử	0,1 ml
Thuốc thử 1	0,1 ml
Thuốc thử 2	0,1 ml
Thuốc thử 3	0,1 ml
Trộn và ủ ở 37^{0}C trong 120 giây1	
Thêm $CaCl_2$ 0,025 M đã làm ấm ở 37^{0}C	0,1 ml

Trộn đều. Ghi nhận thời gian đông

3.5. Trị số bình thường

– Trị số bình thường của protein S từ 65% đến 140%.

– Sự giảm protein S sẽ dẫn đến tình trạng tăng đông máu hậu quả là huyết khối và tắc mạch.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc định lượng protein S.
2. Trình bày tiến trình kỹ thuật định lượng protein S.
3. Cho biết trị số bình thường của protein S và các biến đổi bệnh lý.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị thuốc thử	Đúng và đầy đủ	0,8	1,6	2
2	Kiểm tra bệnh nhân	Đối chiếu tên bệnh nhân trên mẫu máu và phiếu yêu cầu xét nghiệm	0,8	1,6	2
3	Ly tâm máu, tách huyết tương	Tách huyết tương cẩn thận không để lẫn máu	0,8	1,6	2
4	Cho mẫu thử, thuốc thử vào ống nghiệm	Đúng thể tích: mẫu thử 0,1ml; thuốc thử 0,1ml.	0,8	1,6	2
5	Ủ mẫu thử	Đúng thời gian là 120 giây và đúng nhiệt độ 37^0C.	0,8	1,6	2

CHƯƠNG IV

TRUYỀN MÁU

Bài 35

TUYỂN CHỌN NGƯỜI HIẾN MÁU

MỤC TIÊU

1. *Trình bày được các nguyên tắc để tuyển chọn người cho máu.*
2. *Trình bày được các điều kiện và tiêu chuẩn sức khỏe để tuyển chọn người hiến máu.*
3. *Trình bày được những đối tượng nào không được hiến máu.*
4. *Trình bày được khoảng cách giữa các lần hiến máu và chế phẩm.*

1. CÁC NGUYÊN TẮC ĐỂ TUYỂN CHỌN NGƯỜI HIẾN MÁU

- Người hiến máu là người khỏe mạnh, không thuộc những đối tượng có hành vi nguy cơ cao và tình nguyện cho máu.
- Phải đảm bảo sức khoẻ cho người hiến máu, không gây bất kỳ ảnh hưởng xấu tới sức khỏe hoặc bị lây nhiễm bệnh trong quá trình cho máu.
- Thu gom được các đơn vị máu có chất lượng để đảm bảo có được hiệu quả điều trị tốt, không làm lây truyền các bệnh nhiễm trùng qua đường truyền máu từ người cho sang người nhận.
- Có phần mềm và sổ lưu kết quả khám, xét nghiệm để quản lý người cho máu.

2. NHỮNG ĐIỀU KIỆN VÀ TIÊU CHUẨN SỨC KHỎE ĐỂ TUYỂN CHỌN NGƯỜI HIẾN MÁU

Những người hiến máu cần có đủ các điều kiện và tiêu chuẩn sức khỏe sau:

2.1. Người hiến máu phải có giấy chứng minh nhân dân, hộ chiếu, giấy chứng minh của quân đội, công an.

2.2. Người hiến máu phải trả lời bảng hỏi tình trạng sức khỏe và cam kết tự nguyện hiến máu.

2.3. Tuổi

- Nam: Từ 18 – 60 tuổi;
- Nữ: Từ 18 – 55 tuổi.

2.4. Trọng lượng cơ thể và thể tích máu lấy mỗi lượt đối với cả hai giới

- Hiến máu toàn phần
  + Người hiến máu phải có trọng lượng cơ thể ít nhất là 45kg.
  + Thể tích máu mỗi lượt hiến máu không quá 09ml/kg cân nặng và không được quá 450 ml máu toàn phần.
- Hiến các thành phần máu bằng gạn tách: người hiến máu phải có trọng lượng cơ thể ít nhất là 50kg và hiến mỗi lượt không quá 500ml tổng các loại thành phần (huyết tương, tiểu cầu, bạch cầu, hồng cầu, tế bào gốc).

2.5. Tiêu chuẩn sức khỏe

2.5.1. Tiền sử

Người hiến máu không có tiền sử mắc các bệnh mạn tính của các cơ quan hô hấp, tuần hoàn, tiết niệu, tiêu hóa, tâm thần kinh; không mắc các bệnh lây truyền qua đường máu, quan hệ tình dục.

2.5.2. Khám lâm sàng

Người hiến máu có tình trạng khỏe mạnh, tỉnh táo, tiếp xúc tốt, không có các biểu hiện bất thường bệnh lý cấp tính và mạn tính.

- Huyết áp:
  + Huyết áp tối đa: 100 – 140 mm Hg;
  + Huyết áp tối thiểu: 60-90 mm Hg.
- Tần số tim đều: 60-90 lần/phút;
- Không có các biểu hiện sau:
  + Sút cân nhanh (Trên 10% trọng lượng cơ thể trong 6 tháng)
  + Hoa mắt, chóng mặt;
  + Vã mồ hôi trộm;
  + Hạch to;

+ Sốt;

+ Phù;

+ Ho, khó thở;

+ Tiêu chảy;

+ Xuất huyết các loại;

+ Xuất hiện các tổn thương bất thường trên da.

2.5.3. Một số chỉ số sinh học và xét nghiệm trước khi hiến máu

- Nồng độ huyết sắc tố.
  + Phải đạt ít nhất 120 g/l đối với cả hai giới;
  + Người hiến 450ml máu toàn phần phải có nồng độ huyết sắc tố ít nhất là 125g/l.
- Nồng độ protein trong máu: người hiến huyết tương bằng gạn tách phải có nồng độ protein huyết thanh trong giới hạn sinh lý bình thường và phải xét nghiệm lại ít nhất bốn tháng một lần;
- Số lượng tiểu cầu: người hiến tiểu cầu, bạch cầu hạt, bạch cầu đơn nhân, tế bào gốc bằng gạn tách phải có số lượng tiểu cầu ít nhất là 200 x 10^{9}G/l;
- Xét nghiệm sàng lọc nhanh HBsAg cho kết quả âm tính đối với người hiến máu lần đầu tại những khu vực có tỷ lệ người khỏe mạnh mang virus viêm gan B cao.
- Có kết quả sàng lọc kháng thể HIV, kháng thể HCV, HBsAg, giang mai, sốt rét âm tính.
- Xét nghiệm đường, protein niệu âm tính

3. NHỮNG NGƯỜI KHÔNG ĐƯỢC HIẾN MÁU

3.1. Những đối tượng sau đây không được hiến máu

- Người nghiện chích ma túy, nghiện rượu.
- Người tàn tật.
- Người đã và đang sử dụng thuốc etretinat.

3.2. Không được hiến máu trong 12 tháng

- Người được phẫu thuật.
- Những người mắc bệnh sốt rét và đang điều trị bệnh sốt rét.

- Người tiêm vaccin phòng và điều trị bệnh dại.
- Phụ nữ đang trong thời gian mang thai hoặc nuôi con nhỏ dưới 12 tháng tuổi.
- Người được truyền máu và sản phẩm máu, được miễn dịch bằng các chế phẩm điều chế từ máu.
- Người đến từ các vùng, quốc gia có dịch bệnh có thể lây truyền qua đường truyền máu.

3.3. Không được hiến máu trong 06 tháng

- Xăm trổ trên da, bấm dái tai, bấm mũi, rốn hoặc các vị trí khác của cơ thể.
- Phơi nhiễm với máu và các dịch cơ thể từ người có nguy cơ hoặc đã nhiễm các bệnh truyền qua đường máu.
- Đã có quan hệ tình dục không an toàn với người tiêm chích ma túy, với người mắc các bệnh lây truyền qua đường tình dục và đường máu, với người có quan hệ tình dục đồng giới.

3.4. Không được hiến máu trong 03 tháng đối với những người tiêm vaccin phòng các bệnh.

3.5. Không được hiến máu trong 07 ngày đối với những người sử dụng aspirin hoặc trong thành phần thuốc có aspirin, riêng đối với hiến máu bằng gạn tách tiểu cầu thì những trường hợp này phải tạm hoãn trong 10 ngày kể từ khi ngừng thuốc.

3.6. Các trường hợp khác

- Người có vùng da dự định lấy máu tĩnh mạch bị tổn thương, xây xát, nhiễm trùng: không được hiến máu khi chưa điều trị khỏi các tổn thương đó;
- Người sử dụng các thuốc hoặc trong phần thuốc có hoạt chất nguy cơ gây đột biến di truyền, gồm:
  + Finasterid, tretinoin...: không được hiến máu ít nhất trong 1 tháng sau khi ngừng sử dụng thuốc.
  + Acitretin: không được hiến máu ít nhất trong 3 năm sau khi sử dụng thuốc.

4. KHOẢNG CÁCH GIỮA CÁC LẦN HIẾN MÁU

4.1. Hiến máu toàn phần: khoảng cách ít nhất giữa các lần hiến máu là 12 tuần. Trong 1 năm, mỗi người hiến không quá 04 đơn vị máu toàn phần.

4.2. Hiến các thành phần máu và huyết tương

- Hiến huyết tương: khoảng cách giữa các lần lấy huyết tương ít nhất là 02 tuần.

- Hiến tiểu cầu: khoảng cách ít nhất giữa các lần hiến tiểu cầu là 04 tuần;
- Hiến bạch cầu hạt trung tính và tế bào gốc từ máu ngoại vi: tối đa không quá 3 lần trong tuần;
- Người cho máu có thể hiến nhiều loại thành phần máu khác nhau, tuy nhiên mỗi người không được hiến quá 24 lần trong 1 năm.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày các điều kiện và tiêu chuẩn để tuyển chọn người hiến máu.
2. Trình bày nguyên tắc để tuyển chọn người hiến máu.
3. Những đối tượng không được hiến máu.

Bài 36

KỸ THUẬT THU GOM MÁU

MỤC TIÊU

1. *Trình bày được các yêu cầu trước khi lấy máu*
2. *Trình bày được các bước lấy máu vào túi dẻo*
3. *Trình bày được các yêu cầu về lấy mẫu xét nghiệm*
4. *Trình bày được các yêu cầu bảo quản máu sau khi máu được*

1. CÁC YÊU CẦU TRƯỚC KHI LẤY MÁU

- Trước khi lấy máu phải hướng dẫn, giải thích, giúp cho người hiến máu hiểu rõ và trả lời chính xác bảng câu hỏi để đánh giá tình trạng sức khỏe người hiến máu.
- Phải khám tuyển lâm sàng và kiểm tra các xét nghiệm trước khi lấy máu đã được quy chế truyền máu quy định.
- Hỏi thăm và chăm sóc sức khỏe cho người cho máu trước khi lấy máu.
- Bộc lộ cánh tay sẽ dự định lấy máu.
- Chọn vị trí chọc tĩnh mạch để lấy máu.
- Kiểm tra lại độ toàn vẹn của túi máu, kim, dung dịch chống đông và các nội dung đã ghi trên nhãn túi máu.

2. CÁC BƯỚC LẤY MÁU VÀO TÚI DẺO

- Kiểm tra sự phù hợp các thông tin của người hiến máu với các nội dung đã được ghi trên nhãn túi máu.
- Cột dây garo phần trên vị trí tĩnh mạch định lấy máu.
- Tiến hành sát trùng vùng da định lấy máu bằng cồn Iod hoặc cồn 70^{0}C.
- Tiến hành lấy máu, động tác lấy máu cần tiến hành chính xác, nhanh chóng và dứt khoát.
- Mở panh kẹp dây lấy máu để máu chảy vào túi lấy máu.
- Cố định kim lấy máu bằng băng dính sau khi thấy máu chảy tốt vào túi.
- Trong quá trình lấy máu cần theo dõi:

+ Tình trạng sức khỏe của người hiến máu: theo dõi các biểu hiện trên nét mặt, sắc da của người hiến máu, trò chuyện với người hiến máu.... Nếu thấy người hiến máu có những biểu hiện bất thường cần dừng ngay việc lấy máu và mời bác sĩ đến khám và xử lý kịp thời.

+ Trộn đều chất chống đông và máu (có thể trộn bằng máy hoặc bằng tay nếu không có máy lắc).

+ Theo dõi thể tích máu được lấy: có thể theo dõi bằng máy lắc.

– Khi máu đã được lấy đủ với số lượng quy định, thực hiện tiếp các việc sau:

+ Thắt chặt nút thắt lỏng được làm từ trước.

+ Kẹp dây lấy máu sát với nút thắt về phía kim lấy máu.

+ Kéo panh kẹp về phía kim, cách nút thắt khoảng 2-3 cm. Nếu phần dây giữa nút thắt và panh kẹp không có máu là được.

+ Dùng kéo cắt dây lấy máu ở đoạn giữa nút thắt và panh kẹp để tách rời túi máu khỏi người cho máu.

+ Lấy máu vào ống nghiệm để làm xét nghiệm: mở nhẹ panh kẹp lấy một lượng máu vừa đủ vào ống nghiệm, sau đó kẹp lại, tháo dây garo, đặt bông vô trùng vào vị trí chọc ven, rút kim ra từ từ, cho nốt dây còn lại vào ống nghiệm, đậy nắp kim và bỏ đoạn dây và kim vào hộp chứa chất thải theo quy định, đậy nắp ống máu, ghi họ và tên, tuổi, mã số người cho máu lên nhãn của ống máu.

+ Cố định bông cầm máu bằng băng dính tại vị trí chọc ven, nhắc người hiến máu không gập tay.

– Nhân viên lấy máu cần cám ơn người hiến máu và hỏi người hiến máu có dễ chịu không. Tiếp tục để người cho máu nằm tại chỗ trong vòng từ 5-10 phút, đưa phiếu hiến máu cho người cho máu, hướng dẫn người hiến máu ăn nhẹ và nhận quà tặng cho người hiến máu.

– Hoàn thiện túi máu: dùng kìm vuốt phần máu trong dây về túi máu một đến hai lần để máu được trộn đều với chất chống đông.

+ Thắt từng đoạn ngắn trên dây túi máu bằng khóa nhôm hoặc máy hàn dây.

+ Ghi số lượng máu được lấy trên nhãn túi máu, hoàn chỉnh nốt các thông tin theo quy định.

3. BẢO QUẢN TÚI MÁU SAU KHI LẤY

– Đơn vị máu toàn phần sau khi lấy không được sử dụng để điều chế các chế phẩm máu phải được bảo quản ngay ở nhiệt độ từ 2-6^{0}C.

– Đơn vị máu toàn phần dùng để điều chế khối tiểu cầu, khối bạch cầu phải được bảo quản ở điều kiện nhiệt độ từ 20 -24^{0}C.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày các bước lấy máu vào túi dẻo.
2. Trình bày cách bảo quản túi máu sau khi lấy máu.

Bài 37

KỸ THUẬT SÀNG LỌC CÁC BỆNH TRUYỀN QUA ĐƯỜNG TRUYỀN MÁU

MỤC TIÊU

1. *Trình bày được các kỹ thuật sàng lọc HIV, HBV, HCV, giang mai, sốt rét.*
2. *Trình bày được nguyên lý và các bước tiến hành các kỹ thuật sàng lọc HIV, HBV, HCV, giang mai, sốt rét.*

1. CÁC KỸ THUẬT SÀNG LỌC HIV, HBV, HCV CHO NGƯỜI HIẾN MÁU

1.1. Hiện nay có ba loại thử nghiệm hay được sử dụng trong sàng lọc cho người hiến máu là:

- Thử nghiệm miễn dịch gắn men (ELISA: Enzyme – Linked Immuno-Sorbent –Assay).
- Thử nghiệm ngưng kết hạt.
- Thử nghiệm nhanh.

1.2. Khi lựa chọn sử dụng một trong các thử nghiệm trên cần lưu ý một số điểm sau

- Tính chất của xét nghiệm: cấp cứu hay thường quy.
- Sự phức tạp của các thử nghiệm (thử nghiệm yêu cầu phải có máy móc hiện đại, cán bộ có trình độ chuyên môn cao...).
- Độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm.
- Sự tiện lợi, giá cả.
- Khả năng thích hợp của từng phòng xét nghiệm.

1.3. Nguyên lý của thử nghiệm: cả 3 thử nghiệm trên đều dựa trên một nguyên lý sinh học và bao gồm hai bước cơ bản sau:

- Sự có mặt của kháng nguyên hay kháng thể đặc hiệu trong mẫu máu cần xét nghiệm sẽ kết hợp với kháng thể hoặc kháng nguyên tương ứng đã được gắn trên pha rắn để tạo thành phức hợp kháng nguyên – kháng thể.

– Nhận biết phức hợp kháng nguyên - kháng thể nhờ hệ thống chỉ thị màu.

1.4. Mẫu xét nghiệm

Hiện nay hầu hết các thử nghiệm đều dùng huyết thanh hoặc huyết tương, tuy nhiên việc sử dụng huyết thanh hoặc huyết tương cần phải tuân thủ theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

1.5. Dụng cụ và thuốc thử

1.5.1. Dụng cụ

- Máy ly tâm để tách huyết thanh hoặc huyết tương.
- Tủ lạnh để bảo quản sinh phẩm và thuốc thử.
- Hệ thống ELISA tự động hoặc bán tự động.
- Pipette tự động.
- Tủ sấy dụng cụ.
- Bình cách thủy.
- Đầu côn.
- ống nghiệm tan máu.
- Giá để gắn giếng nhựa làm phản ứng.
- Buồng tối để ủ giai đoạn hiện màu

1.5.2. Thuốc thử

- Các giếng nhựa đã được gắn sẵn kháng nguyên HIV1, HIV2, anti HBs, kháng nguyên HCV...
- Dung dịch hòa loãng mẫu.
- Dung dịch cộng hợp
- Dung dịch cơ chất.
- Dung dịch acid để dừng phản ứng.
- Dung dịch rửa.
- Chứng âm.
- Chứng dương.
- Chứng ngưỡng.
- Nước cất

2. THỬ NGHIỆM ELISA

- Đây là loại thử nghiệm phức tạp nhất trong ba loại thử nghiệm, tuy nhiên nếu nắm vững nguyên lý cuả thử nghiệm này thì sẽ dễ dàng hiểu được nguyên lý của thử nghiệm nhanh và ngưng kết.

– Thử nghiệm ELISA có thể làm trên hệ thống máy tự động hoặc bán tự động. Thử nghiệm ELISA cũng có nhiều loại như thử nghiệm ELISA loại bánh kẹp hoặc cạnh tranh... Thử nghiệm ELISA bánh kẹp là loại thử nghiệm hiện nay đang được hầu hết các hãng sản xuất quốc tế áp dụng để phát hiện kháng thể HIV, kháng thể HCV hoặc HBsAg. Thử nghiệm loại này có tính đặc hiệu cao nên tỷ lệ phản ứng dương tính giả giảm đi.

2.1. Thử nghiệm ELISA bánh kẹp để phát hiện kháng thể HIV

2.1.1. Nguyên lý của phản ứng

Kháng nguyên HIV (Thường là các peptid tổng hợp được cố định trên pha rắn, thêm huyết thanh cần xét nghiệm vào giếng đã được gắn sẵn kháng nguyên trên và ủ trong một thời gian nhất định, cuối giai đoạn ủ, rửa để loại bỏ huyết thanh, thêm cộng hợp rồi ủ tiếp (cộng hợp thường là kháng nguyên tổng hợp gắn enzym, cộng hợp sẽ được gắn với phức hợp kháng nguyên – kháng thể. Một phức hợp "kẹp": Kháng nguyên – kháng thể – kháng nguyên được tạo thành. Rửa để loại bỏ cộng hợp, sau đó thêm chất hiện màu và ủ trong buồng tối.

2.1.2. Các bước của thử nghiệm

Bước 1: Kiểm tra máy rửa, máy ủ, máy đọc và các máy móc khác có liên quan đến thử nghiệm. Mang sinh phẩm và thuốc thử về nhiệt độ phòng thí nghiệm (22 độ C). Pha dung dịch rửa, ly tâm mẫu máu để tách huyết thanh.

Bước 2: Lập sơ đồ xét nghiệm: vị trí nhỏ chứng, mẫu thử.

Bước 3: Lấy các giếng nhựa đã được gắn bản kháng nguyên ra khỏi túi giấy bạc bảo vệ, đặt các giếng trên vào phiến nhựa.

Bước 4: Nhỏ dung dịch hòa loãng mẫu vào tất cả các giếng.

Bước 5: Nhỏ chứng âm, chứng dương, chứng ngưỡng, các mẫu huyết thanh cần xét nghiệm vào các giếng theo đúng sơ đồ đã lập ở trên. Ủ ở nhiệt độ thích hợp trong thời gian nhất định mà được nhà sản xuất quy định.

Bước 6: Vào cuối giai đoạn ủ, rửa tất cả các giếng để loại bỏ huyết thanh và kháng thể không tham gia phản ứng. Có thể rửa các giếng trên bằng máy tự động hoặc bán tự động. Lần rửa cuối cùng cần làm khô đáy giếng.

Bước 7: Thêm dung dịch cộng hợp vào tất cả các giếng rồi ủ ở nhiệt độ thích hợp trong thời gian nhất định mà được nhà sản xuất quy định. Trong giai đoạn này cộng hợp có bản chất là một kháng nguyên gắn enzym sẽ gắn với các kháng thể mà đã được kết hợp với kháng nguyên gắn bản trên các giếng nhựa.

Bước 8: Cuối giai đoạn ủ, rửa giếng để loại bỏ cộng hợp thừa không gắn và chuẩn bị cho các bước tiếp theo.

Bước 9: Thêm ngay dung dịch cơ chất vào tất cả các giếng và ủ ở nhiệt độ thích hợp (thường từ 18 – 25^{0}C). Dung dịch cơ chất chứa một chất hóa học được gọi là chất hiện màu. Khi thêm dung dịch cơ chất vào các giếng có chứa

các thành phần gắn cộng hợp, enzym sẽ hoạt hóa cơ chất và do vậy sẽ hình thành chất màu trong giếng.

Bước 10: Cuối giai đoạn ủ, thêm dung dịch acid hòa 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 của dung dịch trong giếng và đánh giá kết quả thử nghiệm. Trong các giếng chứa mẫu có kháng thể HIV, do cộng hợp được gắn với kháng thể, enzym hoạt hóa cơ chất để tạo thành sản phẩm màu.

2.2. Thử nghiệm ELISA bánh kẹp để phát hiện HBsAg

2.2.1. Nguyên lý của phản ứng

Như thử nghiệm ELISA bánh kẹp để phát hiện kháng thể HIV.

2.2.2. Các bước của thử nghiệm

Bước 1: Kiểm tra máy rửa, máy ủ, máy đọc và các máy móc khác có liên quan đến thử nghiệm. Mang sinh phẩm và thuốc thử về nhiệt độ phòng thí nghiệm (22^{0}C). Pha dung dịch rửa, ly tâm mẫu máu để tách huyết thanh.

Bước 2: Lập sơ đồ xét nghiệm: vị trí nhỏ chứng, mẫu thử.

Bước 3: Lấy các giếng nhựa đã được gắn bản kháng thể HBs ra khỏi túi giấy bạc bảo vệ, đặt các giếng trên vào phiến nhựa.

Bước 4: Mẫu xét nghiệm (được để nguyên hoặc hòa loãng tùy thuộc vào từng nhà sản xuất), chứng dương, chứng âm được nhỏ vào các giếng theo đúng sơ đồ đã lập ở trên. Ủ ở nhiệt độ thích hợp trong thời gian nhất định được nhà sản xuất quy định. Trong thời gian ủ kháng nguyên đặc hiệu nếu có sẽ gắn với kháng thể.

Bước 5: Vào cuối giai đoạn ủ, rửa tất cả các giếng để loại bỏ huyết thanh và kháng nguyên không tham gia phản ứng. Có thể rửa các giếng trên bằng máy tự động hoặc bán tự động. Lần rửa cuối cùng cần làm khô đáy giếng.

Bước 6: Thêm dung dịch cộng hợp vào tất cả các giếng rồi ủ ở nhiệt độ thích hợp trong thời gian nhất định được nhà sản xuất quy định. Trong giai đoạn này cộng hợp có bản chất là một kháng thể gắn enzym sẽ gắn với các kháng nguyên mà đã được kết hợp với kháng thể HBs đã được gắn bản trên các giếng nhựa.

Bước 7: Cuối giai đoạn ủ, rửa giếng để loại bỏ cộng hợp thừa không gắn và chuẩn bị cho các bước tiếp theo.

Bước 8: Thêm ngay dung dịch cơ chất vào tất cả các giếng và ủ ở nhiệt độ thích hợp (thường từ 18 – 25^{0}C). Dung dịch cơ chất chứa một chất hóa học được gọi là chất hiện màu. Khi thêm dung dịch cơ chất vào các giếng có chứa các thành phần gắn cộng hợp, enzym sẽ hoạt hóa cơ chất và do vậy sẽ hình thành chất màu trong giếng.

Bước 9: Cuối giai đoạn ủ, thêm dung dịch acid hòa loãng vào tất cả các giếng để dừng phản ứng. Acid có tác dụng bất hoạt enzym và cố định màu.

Bước 10: Đọc mật độ quang của dung dịch trong giếng và đánh giá kết quả thử nghiệm. Trong các giếng chứa mẫu có kháng nguyên HBsAg, do cộng hợp được gắn với nguyên, enzym hoạt hóa cơ chất để tạo thành sản phẩm màu.

3. 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 một bước sóng nhất định chiếu qua đáy giếng và đo mức độ hấp thụ ánh sáng của dung dịch. Máy đọc mật độ quang là một máy quang phổ kế có thể đo được một hoặc nhiều bước sóng cùng một lúc.

Dựa vào các giá trị OD mà có thể đánh giá được kết quả mẫu thử là âm tính hoặc dương tính.

Để đánh giá kết quả cần dựa vào giá trị trung bình của chứng âm và chứng dương và giá trị ngưỡng.

Ví dụ kết quả thu được từ thử nghiệm ELISA kiểu bánh kẹp.

Vị trí nhỏ chứng và mẫu thử	Giá trị OD
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 với kết quả âm tính và dương tính.

C: Tỷ số giá trị OD mẫu / giá trị ngưỡng

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày kỹ thuật sàng lọc HIV, HBV, HCV cho người hiến máu.

2. Cách đánh giá kết quả thử nghiệm ELISA.

Bài 38

KỸ THUẬT ĐỊNH NHÓM MÁU ABO

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo kỹ thuật định nhóm máu ABO.*
2. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ, thuốc thử.*
3. *Trình bày được nguyên tắc định nhóm máu ABO trực tiếp và gián tiếp.*

1. ĐẠI CƯƠNG

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 gây phản ứng ngưng kết đặc hiệu.

2. DỤNG CỤ - THUỐC THỬ

2.1. Dụng cụ

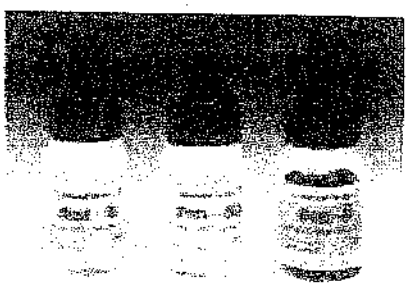
- Lam kính phân ô hoặc phiến đá 12 x 12cm
- Viết chì sáp, bút lông.
- Que thủy tinh.
- Ống nghiệm thủy tinh 10 x 75mm.
- Máy ly tâm.
- Pipette Pasteur
- Gòn không thấm.
- Bình cách thủy 37^0C

2.2. Thuốc thử

2.2.1. Huyết thanh mẫu

Huyết thanh mẫu được sản xuất theo phương pháp kháng thể đơn dòng gồm ba loại sau:

- Huyết thanh mẫu chống A (Anti A).
- Huyết thanh mẫu chống B (Anti B).
- Huyết thanh mẫu chống AB (Anti AB).



2.2.2. Hồng cầu mẫu: gồm các loại sau:

- Hồng cầu mẫu A 5%
- Hồng cầu mẫu B 5%
- Hồng cầu mẫu O 5%

2.2.3. Mẫu thử

Máu có chống đông hoặc máu đông không bị tiêu huyết hay nhiễm trùng.

3. PHƯƠNG PHÁP

3.1. Định nhóm máu trực tiếp (kỹ thuật Beth. Wincent)

3.1.1. Nguyên tắc

Dùng huyết thanh mẫu chứa *kháng thể đặc hiệu* đã biết để định loại *kháng nguyên nhóm máu* của hồng cầu dựa vào phản ứng ngưng kết.

3.1.2. Tiến trình kỹ thuật

3.1.2.1. Kỹ thuật trên kính

- Trên tấm lam hoặc phiến đá ghi mã số hoặc tên bệnh nhân bằng bút chì sáp. Sau đó chia 3 ô bằng nhau và đánh dấu A, B, AB.
- Cho vào mỗi ô 2 giọt huyết thanh mẫu tương ứng, đầu ống hút thuốc thử cách lame kính từ 1,5 – 2,5 cm.
- Cho tiếp vào mỗi ô 1 giọt máu bệnh nhân.
- Dùng que thuỷ tinh trộn đều máu và huyết thanh mẫu ở mỗi ô. Mỗi que chỉ được trộn một loại thuốc thử để tránh lẫn thuốc thử từ ô này sang ô khác.
- Lắc nghiêng tròn tấm lam trong 1 đến 3 phút.
- Đọc kết quả sau 3 phút.

3.1.2.2. Kỹ thuật trong ống

- Cho vào một ống nghiệm khô sạch 2 giọt máu bệnh nhân, rửa hồng cầu 3 lần với nước muối 0,9%. Sau đó pha thành huyền dịch hồng cầu 5%.
- Lấy 3 ống nghiệm ghi mã số hoặc tên bệnh nhân và đánh dấu A, B, AB.
- Cho vào mỗi ống nghiệm 2 giọt huyết thanh kháng tương ứng.
- Dùng ống hút nhỏ vào mỗi ống 1 giọt huyền dịch hồng cầu bệnh nhân 5%.
- Lắc đều các ống nghiệm.

- Ly tâm khoảng 3800 vòng/phút trong 15 – 20 giây.
- Đọc kết quả bằng mắt thường hay kính hiển vi.

3.1.3. Đọc kết quả

3.1.3.1. Trên kính

- Ngưng kết: thấy những cụm hồng cầu đứng tách rời nhau rõ rệt trên nền dung dịch trong.
- Không ngưng kết: hỗn dịch vẫn đỏ đều.

3.1.3.2. Trong ống

- Ngưng kết: khi lắc khối hồng cầu ngưng kết sẽ tách khỏi đáy ống nghiệm và có thể tách thành nhiều khối nhỏ, dung dịch có màu thuốc thử.
- Không ngưng kết: sau khi lắc hồng cầu trở lại dạng hỗn dịch đỏ và đục.

3.1.4. Nhận định kết quả

Anti.A	Anti.B	Anti.AB	Kết quả nhóm máu
+	-	+	A
-	+	+	B
+	+	+	AB
-	-	-	O

3.2. Phân loại máu hệ ABO gián tiếp (Kỹ thuật Simonin)

3.2.1. Nguyên tắc

Dùng hồng cầu mẫu chứa kháng nguyên đặc hiệu đã biết để định loại kháng thể trong huyết thanh dựa vào phản ứng ngưng kết.

3.2.2. Tiến trình kỹ thuật

3.2.2.1. Kỹ thuật trên kính

- Hút huyết thanh hay huyết tương bệnh nhân cho vào ống nghiệm sạch.
- Diệt bổ thể ở 63^{0}C trong 3 phút để tránh phản ứng tiêu huyết xảy ra.
- Trên tấm lam kính hay phiến đá ghi mã số hoặc tên bệnh nhân.
- Dùng bút chì sáp chia đều 3 ô và đánh dấu HCM A, HCM B, HCM O.
- Nhỏ vào mỗi ô 2 giọt huyết thanh hay huyết tương bệnh nhân.
- Nhỏ tiếp vào mỗi ô 1 giọt hồng cầu mẫu A,B,O 5% tương ứng.
- Dùng que trộn đều máu và huyết thanh.
- Lắc nghiêng tròn tấm lam kính hay phiến đá.
- Đọc kết quả ngưng kết sau 3 phút.

3.2.2.2. Kỹ thuật trong ống

- Lấy 3 ống nghiệm khô sạch, dùng bút chì sáp ghi mã số hoặc tên bệnh nhân và đánh dấu HCM A, HCM B, HCM O.
- Nhỏ vào mỗi ống 2 giọt huyết thanh hay huyết tương bệnh nhân đã diệt bổ thể.
- Nhỏ tiếp vào mỗi ống 1 giọt hồng cầu mẫu A, B, O 5% tương ứng.
- Lắc nhẹ và quay ly tâm khoảng 3800 vòng/phút trong 15 - 20 giây.
- Lắc mạnh 3 ống để đọc kết quả.

3.2.3. Đọc kết quả

- Ngưng kết: tùy vào lượng kháng thể mà ngưng kết mạnh hay yếu, có thể quan sát bằng mắt thường hoặc nhỏ một giọt dung dịch lên lam kính và quan sát ở vật kính X10.
- Không ngưng kết: sau khi lắc hồng cầu trở lại dạng hỗn dịch đỏ.

3.2.4. Nhận định kết quả

Phân loại trực tiếp			Phân loại gián tiếp			Kết quả nhóm máu
Anti.A	Anti.B	Anti.AB	HC.A	HC.B	HC.O	
+	-	+	-	+	-	A
-	+	+	+	-	-	B
+	+	+	-	-	-	AB
-	-	-	+	+	-	O

3.3. Phương pháp định nhóm máu ABO trong cột gelcard

Đây là kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, cho kết quả ngưng kết rõ ràng, thời gian ủ ngắn, kỹ thuật chuẩn, dễ dàng lưu giữ kết quả và sử dụng.

3.3.1. Nguyên tắc

Trong một cột gel có buồng phản ứng, có chứa huyết thanh chuẩn để định nhóm, có các viên bi thủy tinh làm màng ngăn đám ngưng kết. Nếu có phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể sẽ tạo thành các đám ngưng kết và hồng cầu tự do không còn lọt qua kẽ các viên bi để đi xuống đáy cột gel (dương tính), nếu không có phản ứng các hồng cầu sẽ lọt qua được và đi xuống đáy cột gel (phản ứng âm tính).

3.3.2. Dụng cụ và thuốc thử

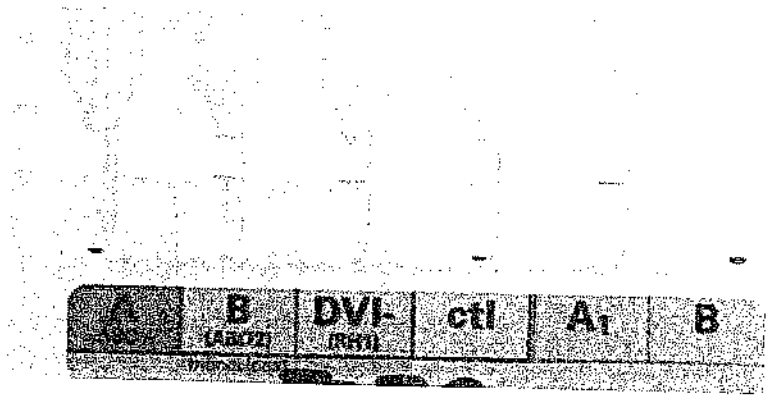
- Máy ly tâm chuyên dụng
- Máy ủ
- Máy đọc kết quả
- Giá đựng gelcard

- Pipettman
- Gelcard: có sẵn các kháng huyết thanh chuẩn (Anti A, B, AB)
- Dung dịch để pha hồng cầu

Chuẩn bị: pha hồng cầu bệnh nhân thành huyền dịch 0,8% trong dung dịch pha hồng cầu.

3.3.3. Tiến trình kỹ thuật

- Ghi họ tên bệnh nhân cần định nhóm máu 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.
- Sau khi ly tâm đưa gel vào máy đọc kết quả để đọc.
- Kết quả có thể đọc bằng mắt thường dễ dàng.
- Nhận định kết quả:
  + Phản ứng dương: hồng cầu ngưng kết nằm trên cột gel.
  + Phản ứng âm: hồng cầu lắng toàn bộ xuống đáy cột gel.



Hình 38.1. Định nhóm máu bằng phương pháp gelcard.

4. BIỆN LUẬN

4.1. Kết quả nhóm máu có giá trị khi kết quả phân loại trực tiếp và gián tiếp có kết quả phù hợp.

4.2. Những kết quả khó đọc nên đọc trên kính hiển vi

- Có nhiều đám hồng cầu lớn trên nền sáng rõ: ngưng kết.
- Có nhiều đám hồng cầu nhỏ và nhiều HC riêng lẻ: ngưng kết yếu.
- Tất cả các hồng cầu đều đứng riêng lẻ: không ngưng kết.

4.3. Huyết thanh kháng bảo quản tốt nhất ở 4°C. Không nên để thuốc thử đông đặc và tan nhiều lần. Trước khi sử dụng thuốc thử phải được đưa về nhiệt độ phòng thí nghiệm.

4.4. Trường hợp máu cuống rốn (trẻ sơ sinh)

Kháng thể tự nhiên kháng A và kháng B chưa phát triển đầy đủ để có thể phát hiện được. Do đó, việc xác định nhóm máu chủ yếu dựa vào kết quả phân loại trực tiếp.

4.5. Trường hợp ở những bệnh nhân bị suy giảm hoặc thiếu hụt miễn dịch

Các kháng thể tự nhiên cũng có thể rất yếu hoặc không phát hiện được. Do đó việc gọi tên nhóm máu phải dựa vào kết quả phân loại trực tiếp.

4.6. Trường hợp có kháng thể bất thường trong huyết thanh mẫu máu

Ví dụ người nhóm A_2 hoặc A_2B có thể có kháng thể bất thường kháng A_1. Kháng A_1 này phản ứng với hồng cầu A_1 ở phần phân loại gián tiếp, nên trong trường hợp này phần trực tiếp cho nhóm A, phần gián tiếp cho nhóm O. Để xác định trương hợp này cần thêm huyết thanh mẫu kháng A_1, kháng H. Kết quả phân loại như sau:

Phân loại trực tiếp			Phân loại gián tiếp			Kết quả nhóm máu
Anti.A	Anti.B	Anti.AB	HC. A_1	HC.B	HC.O	
+	-	+	+	+	-	A_2

4.7. Trường hợp mẫu máu có kháng thể lạnh tự sinh

Đặc điểm của kháng thể lạnh tự sinh là có thể làm ngưng kết hồng cầu của chính bản thân bất luận thuộc nhóm nào. Nhiệt độ hoạt động mạnh (2^0C – 10^0C) và hoạt động yếu hơn ở nhiệt độ phòng thí nghiệm nhưng không hoạt động ở 37^0C. Nếu chỉ phân loại trực tiếp sẽ lầm lẫn với trường hợp nhóm máu AB. Để giải quyết khó khăn này ta đưa nhiệt độ phản ứng về 37^0C. Tất cả các chất tham gia phản ứng đều phải ủ ở 37^0C trong 60 phút sau đó lấy ra và đọc kết quả.

5. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

5.1. Sai lầm do huyết thanh

Do huyết thanh mẫu có chuẩn độ kháng thể yếu, mất hoạt tính hay nhiễm trùng.

5.2. Sai lầm do hồng cầu

- Hồng cầu bị biến chất.
- Do máu bị nhiễm trùng hoặc bạch cầu quá nhiều.

5.3. Sai lầm về thủ tục giấy tờ

- Do nhầm tên, viết nhầm.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Nguyên tắc phân loại máu hệ ABO trực tiếp và gián tiếp.
2. Liệt kê những dụng cụ và hoá chất cần thiết để phân loại nhóm máu hệ ABO.
3. Những khó khăn có thể gặp trong phân loại máu hệ ABO.
4. Những nguyên nhân sai lầm trong việc xác định nhóm máu.
5. Biện luận kết quả khi phân loại trực tiếp là máu AB.

BẢNG KIỂM

Kỹ thuật phân loại máu ABO trực tiếp trên kính

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ và hoá chất để phân loại máu trực tiếp trên kính	Dụng cụ và hoá chất phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Ghi tên bệnh nhân và ghi ký hiệu các loại thuốc thử A, B và AB trên lam kính	Ghi rõ tên hoặc mã số bệnh nhân, đối chiếu với tên trên phiếu xét nghiệm. Ghi rõ ký hiệu các thuốc thử.	0,4	0,8	1
3	Nhỏ thuốc thử huyết thanh mẫu vào các ô	Nhỏ thuốc thử vào ô ký hiệu đúng quy định, đầu ống nhỏ giọt cách lam kính từ 2-4cm	0,4	1,6	2
4	Nhỏ vào mỗi ô một giọt máu bệnh nhân	Nhỏ mẫu máu đúng quy định, đầu ống hút cách lam kính 2-4cm	0,4	1,6	2
5	Dùng que trộn đều máu và thuốc thử thành vòng tròn	Mỗi que chỉ trộn một loại thuốc thử, đường kính vòng tròn máu và thuốc thử khoảng 1,5cm	0,4	0,8	1
6	Lắc nghiêng tròn lam kính từ 1-3 phút	Giọt dung dịch xoay tròn trong mỗi ô, không được lẫn từ ô này sang ô khác	0,4	0,8	1
7	Đọc kết quả sau ba phút	Đọc đúng kết quả sau ba phút	0,4	0,8	1
8	Ghi đúng kết quả	Kiểm tra đúng tên tuổi bệnh nhân và ghi đúng kết quả nhóm máu	0,4	0,8	1

Bài 39

KỸ THUẬT ĐỊNH NHÓM MÁU RHESUS

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo kỹ thuật định nhóm máu Rhesus.*
2. *Trình bày được nguyên tắc phân loại Rhesus.*

1. NGUYÊN TẮC

Cho huyết thanh chống D tác dụng với hồng cầu bệnh nhân muốn phân loại. Hồng cầu mang kháng nguyên D sẽ bị ngưng kết bởi huyết thanh kháng D.

1.1. Dụng cụ và thuốc thử

1.1.1. Dụng cụ

- Lam kính hoặc kính phân ô.
- Que trộn, viết chì sáp.
- Viewbox.

1.1.2. Thuốc thử

Hiện nay có nhiều loại thuốc thử có nguồn gốc và bản chất khác nhau:

- Huyết thanh chống D (anti D): bản chất là IgM kháng D: được sản xuất bằng phương pháp "kháng thể đơn dòng". Với loại thuốc thử này có thể tiến hành xác định kháng nguyên D ở nhiệt độ phòng thí nghiệm và môi trường nước muối sinh lý.
- Huyết thanh chống D (anti D): bản chất là IgG kháng D: loại này thường được dùng để phát hiện phenotyp D^U và tiến hành phân loại ở 37^0C.
- Huyết thanh chống D (anti D): bản chất là IgG và IgM kháng D: có thể tiến hành ở nhiệt độ phòng thí nghiệm hoặc ủ thêm ở nhiệt độ 37^0C trong 15 phút. Vì có thành phần IgG nên có khả năng phát hiện phenotyp D^U.

1.1.3. Mẫu máu xét nghiệm

Máu còn mới không bị tiêu huyết, không bị nhiễm trùng. Có thể dùng máu đông hay máu có chất chống đông để phân loại.

2. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

- Trên tấm lam kính khô sạch ghi mã số hoặc tên bệnh nhân và ghi ký hiệu là D.
- Nhỏ lên lam kính một giọt huyết thanh chống D.
- Cho tiếp vào lam kính một giọt máu bệnh nhân muốn phân loại Rhesus.
- Dùng que sạch trộn thật đều máu và thuốc thử thành một vòng tròn.
- Lắc nhẹ sau 3 phút đọc kết quả.

3. KẾT QUẢ

- Ngưng kết: Rh dương
- Không ngưng kết: không nên kết luận vội vàng Rh âm mà ta phải kiểm tra lại thuốc thử và kỹ thuật xem có đúng không. Nếu đúng phải tìm kháng nguyên D^U bằng kỹ thuật kháng globulin gián tiếp. Kháng nguyên D^U là một dạng yếu của kháng nguyên D. Nếu trắc nghiệm tìm kháng nguyên D^U:
  + Âm tính: bệnh nhân là Rh âm.
  + Dương tính: bệnh nhân là Rh dương.

4. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Phản ứng âm giả khi huyết thanh chống D mất hiệu lực.
- Phản ứng dương giả khi dụng cụ thủy tinh bẩn.
- Sai lầm do thủ tục giấy tờ, viết sai.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc định nhóm máu Rhesus.
2. Trình bày những dụng cụ và hoá chất cần thiết để định nhóm máu Rhesus.
3. Trình bày kỹ thuật định nhóm máu Rhesus.
4. Trình bày cách đọc kết quả nhóm máu Rhesus.
5. Nêu những nguyên nhân sai lầm trong định nhóm máu Rhesus.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ và hoá chất	Dụng cụ và hoá chất phải đầy đủ	0,4	0,8	1
2	Kiểm tra tên bệnh nhân	Ghi rõ tên bệnh nhân hoặc mã số, đối chiếu với tên trên phiếu xét nghiệm. Ghi rõ ký hiệu loại thuốc thử	0,4	0,8	1
3	Nhỏ vào lam kính một giọt thuốc thử IgM chống D	Nhỏ đúng liều lượng thuốc thử vào ô ký hiệu, đầu ống nhỏ giọt cách lam kính từ 2-4cm	0,8	1,6	2
4	Nhỏ vào mỗi ô một giọt máu bệnh nhân	Nhỏ đúng thể tích mẫu máu, đầu ống hút cách lam kính 2-4cm	0,4	0,8	1
5	Dùng que trộn đều máu và thuốc thử thành vòng tròn	Đường kính vòng tròn máu và thuốc thử khoảng 1,5cm	0,8	1,6	2
6	Lắc nghiêng tròn lam kính từ 1-3 phút	Giọt dung dịch xoay tròn trong trên lam kính	0,4	0,8	1
7	Đọc kết quả	Đọc đúng kết quả sau 3 phút	0,8	1,6	2

Bài 40

XÉT NGHIỆM COOMBS

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo xét nghiệm Coombs.*
2. *Trình bày được nguyên tắc làm xét nghiệm Coombs.*
3. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ, hóa chất.*

1. NGUYÊN TẮC

- Ở một số bệnh nhân, trên bề mặt hồng cầu có gắn một loại kháng thể bất thường, kháng thể thiếu (đơn hoá trị) thuộc typ IgG vào kháng nguyên tương ứng nhưng không gây ngưng kết hồng cầu, ta dùng kháng thể kháng globulin người làm cầu nối để hồng cầu ngưng kết lại với nhau. Đó là nghiệm pháp Coombs trực tiếp (H.40.1) cũng thuộc kháng thể thiếu typ IgG.
- Hoặc trong huyết thanh bệnh nhân có kháng thể miễn dịch chống hồng cầu nhưng không gắn lên kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu, ta phải làm nghiệm pháp Coombs gián tiếp bằng cách mượn hồng cầu O của người bình thường gây cảm nhiễm (gắn kháng thể có chứa trong huyết thanh đó lên) rồi tiếp tục làm như Coombs trực tiếp (H.40.2).

2. CHUẨN BỊ

2.1. Dụng cụ

- Phiến kính.
- Ống nghiệm nhỏ.
- Pipette Pasteur.
- Máy ly tâm.
- Bình cách thủy 37^{0}C.

2.2. Hóa chất

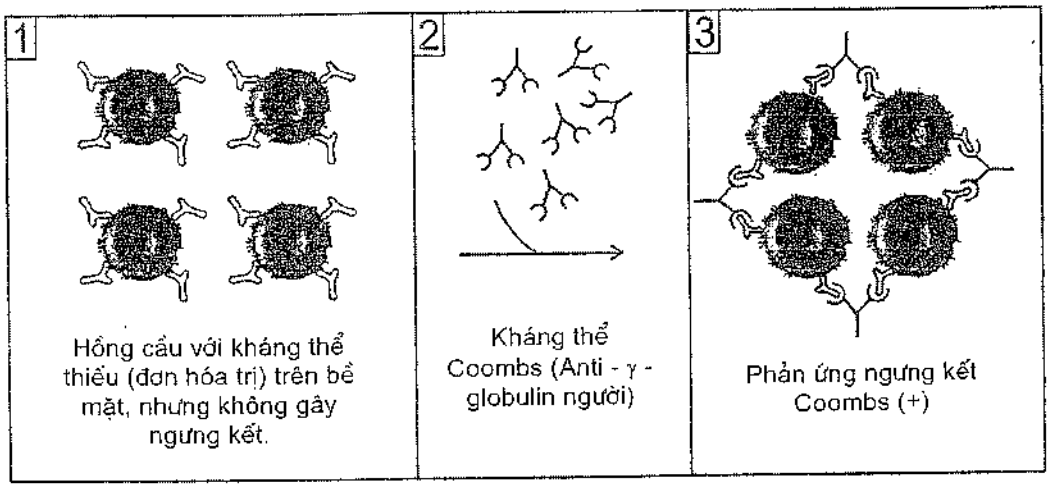
- Huyết thanh kháng globulin người đa giá.
- Huyết thanh kháng D loại thiếu.

- Hồng cầu O, Rh (+): chống đông bằng natricitrat.
- NaCl 0,9%.
- Mẫu máu xét nghiệm.
- Máu bệnh nhân chống đông và không chống đông

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

3.1. Nghiệm pháp Coombs trực tiếp

- Lấy 2 giọt hồng cầu (trong ống máu có chống đông) của bệnh nhân: cho vào ống nghiệm thứ nhất.
- Thêm NaCl 0,9% rửa 3 lần.
- Pha thành huyền dịch hồng cầu 5%.
- Cho vào ống nghiệm thứ hai:
  + 1 giọt hồng cầu bệnh nhân pha 5%.
  + 1 giọt huyết thanh kháng globulin người.
- Lắc đều.
- Ly tâm 1000 vòng / 1 phút trong 1 phút.
- Dùng pipette Pasteur lấy 1 giọt hỗn dịch nhỏ lên một lam kính.
- Đọc kết quả trên kính hiển vi.

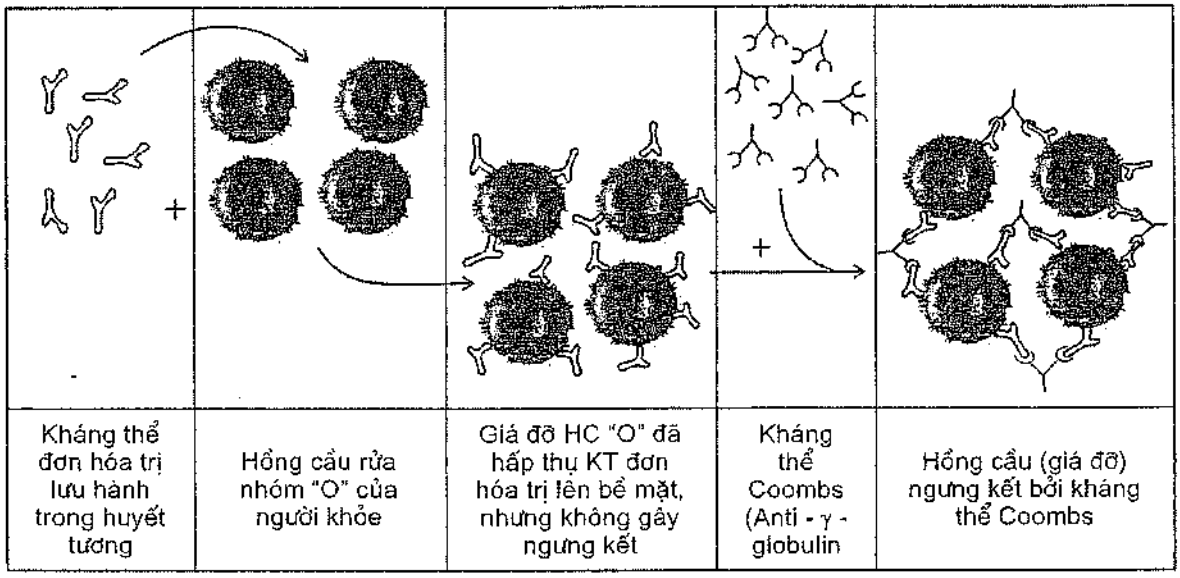


Hình 40.1. Sơ đồ cơ chế của phản ứng Coombs trực tiếp: kháng thể thiếu gắn đặc hiệu với kháng nguyên trên bề mặt HC (1), kháng thể Coombs (anti- γ-globulin người) (2), tạo ngưng kết hồng cầu (3).

3.2. Nghiệm pháp Coobms gián tiếp

- Lấy 2 giọt hồng cầu O, Rh (+) (cho vào ống nghiệm thứ nhất.
- Rửa 3 lần bằng nước muối 0,9%.

- Pha loãng thành huyền dịch hồng cầu 5%.
- Trong ống ống nghiệm thứ hai cho:
  + 2 giọt huyết thanh bệnh nhân.
  + 1 giọt hồng cầu O, Rh (+) , 5%.
- Lắc đều.
- Ủ trong bình cách thủy 37^{0}C: trong 45 phút.
- Lấy ra lắc đều.
- Rửa 3 lần bằng nước muối 0,9%.
- Sau lần rửa thứ 3 gạn bỏ phần nước ở trên chỉ để lại 1 giọt cặn hồng cầu O Rh (+) đã được cảm nhiễm với huyết thanh bệnh nhân.
- Cho thêm 1 giọt huyết thanh kháng globulin người đa giá.
- Lắc đều.
- Ly tâm 1, 000 vòng / 1 phút trong 1 phút.
- Dùng pipette Pasteur lấy 1 giọt cặn cho lên 1 lam kính.
- Đọc kết quả trên kính hiển vi.



Hình 40.2. Sơ đồ tóm tắt cơ chế của phản ứng Coombs gián tiếp

4. NHẬN XÉT KẾT QUẢ

4.1. Bình thường

- Coombs trực tiếp âm tính
- Coombs gián tiếp cũng âm tính.

4.2. Bệnh lý

- Coombs trực tiếp dương khi trên bề mặt hồng cầu bệnh nhân có kháng thể miễn dịch gắn vào kháng nguyên nhưng không gây ngưng kết hồng cầu.
- Coombs gián tiếp khi trong huyết thanh bệnh nhân có kháng thể miễn dịch tự do chưa gắn lên hồng cầu.
- Cả Coombs trực tiếp dương và Coombs gián tiếp dương khi trong máu bệnh nhân có cả kháng thể miễn dịch tự do trong huyết thanh và kháng thể miễn dịch đã gắn lên kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu bệnh nhân.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Nêu nguyên tắc nghiệm pháp Coombs trực tiếp và Coombs gián tiếp.

2. Bản chất huyết thanh Coombs.

3. Trình bày tiến trình kỹ thuật của xét nghiệm Coombs trực tiếp và Coombs gián tiếp.

BẢNG KIỂM

Xét nghiệm Coombs trực tiếp

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ hóa chất để làm nghiệm pháp Coombs trực tiếp.	Dụng cụ và hóa chất phải đầy đủ	0,8	1,6	2
2	Rửa hồng cầu bệnh nhân.	Rửa đủ 3 lần bằng nước muối sinh lý.	0,8	1,6	2
3	Pha huyền trọc hồng cầu.	Pha đúng huyền trọc hồng cầu 5%.	0,8	1,6	2
4	Cho hồng cầu và thuốc thử vào ống nghiệm.	Cho đúng thể tích: - Một giọt huyền trọc hồng cầu bệnh nhân 5%. - Một giọt huyết thanh Coombs.	0,8	1,6	2
5	Quay ly tâm và đọc kết quả.	Quay ly tâm đúng tốc độ 3.800 vòng /phút và đúng 30 giây.	0,8	1,6	2

Xét nghiệm Coombs gián tiếp

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ hóa chất để làm nghiệm pháp Coombs gián tiếp.	Dụng cụ và hóa chất phải đầy đủ	0,8	1,6	2
2	Chọn hồng cầu mẫu	Chọn ít nhất 3 mẫu hồng cầu O, rửa 3 lần, pha thành huyền dịch hồng cầu 5%.	0,8	1,6	2
3	Cho huyền trọc dịch hồng cầu O 5% và huyết thanh bệnh nhân vào ống nghiệm	Cho đúng thể tích: - Một giọt huyền trọc hồng cầu O 5% - Một giọt huyết thanh bệnh nhân.	0,8	1,6	2
4	Ủ 37^{0}C.	Ủ đúng thời gian quy định.	0,8	1,6	2
5	Quay ly tâm 3800 vòng /phút trong 30 giây lấy ra đọc kết quả.	Quay ly tâm đúng tốc độ và thời gian.	0,8	1,6	2

Bài 41

PHẢN ỨNG HÒA HỢP
(Phát máu an toàn)

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo phản ứng phù hợp.*
2. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ thuốc thử.*
3. *Trình bày được nguyên tắc của chứng phản ứng hòa hợp và giải thích được ý nghĩa của từng giai đoạn trong chứng phản ứng hòa hợp.*

1. NGUYÊN TẮC

Mục đích của phản ứng hòa hợp là để kiểm tra sự hòa hợp nhóm máu giữa người cho và người nhận máu, để bảo đảm an toàn truyền máu có nghĩa là kháng thể trong huyết thanh bệnh nhân không làm ngưng kết kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu của người cho và ngược lại kháng thể trong huyết thanh của người cho cũng không làm ngưng kết kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu của bệnh nhân, phát hiện kháng thể bất thường ngoài hệ ABO.

2. DỤNG CỤ – THUỐC THỬ

2.1. Dụng cụ

- Bình cách thủy 37^{0}C
- Máy ly tâm
- Ống nghiệm 10 x 75mm
- Pipette Pasteur
- Bút chì sáp

2.2. Thuốc thử

- Huyết thanh Coombs, NaCl 0,9%.
- Huyết thanh mẫu chống A, chống B, chống AB.
- Hồng cầu mẫu A, hồng cầu mẫu B.

2.3. Mẫu thử: máu đông còn mới không bị tiêu huyết hay nhiễm trùng.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

3.1. Định nhóm máu của bệnh nhân và người cho bằng hai phương pháp huyết thanh mẫu và hồng cầu mẫu.

3.2. Điều chế huyền dịch hồng cầu 5% của bệnh nhân và người cho.

3.3. Chuẩn bị 2 ống M, m như sau:

	Ống chính (Major)	Ống phụ (Minor)
Huyết thanh bệnh nhân	2 giọt	
Huyền dịch hồng cầu bệnh nhân 5%		2 giọt
Huyết thanh người cho		2 giọt
Huyền dịch hồng cầu người cho.5%	2 giọt	

3.3.1. Giai đoạn 1

Đặt 02 ống M, m ở nhiệt độ phòng thí nghiệm từ 15 đến 30 phút. Quay ly tâm 1000 vòng /phút trong 1 phút rồi đọc kết quả ngưng kết.

- Nếu M có ngưng kết: trả lời ngay chứng nghiệm không phù hợp. Máu không truyền được.
- Nếu M không ngưng kết thì làm tiếp sang giai đoạn 2.

3.3.2. Giai đoạn 2

Đặt 2 ống M, m vào bình cách thủy 37^{0}C từ 30 đến 50 phút, lấy ra, đem quay ly tâm 1000 vòng /1 phút và đọc kết quả ngưng kết. Nếu M không ngưng kết thì tiến hành sang giai đoạn 3.

3.3.3. Giai đoạn 3

- Rửa hai lần 2 ống M, m bằng NaCl 0,85%.
- Gạt bỏ phần nước trong ở trên chỉ để lại cặn hồng cầu.
- Cho vào mỗi ống 2 giọt huyết thanh Coombs.
- Lắc đều, quay ly tâm 1000 vòng /1 phút trong 1 phút và đọc kết quả.

4. KẾT QUẢ

- Nếu cả ống M, m không có hiện tượng ngưng kết thì máu người cho và người nhận phù hợp.
- Trường hợp cả ống M và m đều ngưng kết hay ống M ngưng kết khi truyền khối hồng cầu, ống m ngưng kết khi truyền huyết tương đều không truyền được.

5. BIỆN LUẬN

- Trường hợp truyền máu toàn phần phải làm đầy đủ cả ống chính (ống M) và ống phụ (ống m).
- Truyền khối hồng cầu chỉ cần làm ống chính (ống M).
- Truyền huyết tương hay khối tiểu cầu chỉ cần làm chéo ống phụ (ống m).
- Giai đoạn 1: sử dụng nhiệt độ phòng thí nghiệm và môi trường nước muối để phát hiện kháng thể tự nhiên. Những kháng thể này thuộc hệ thống ABO, Lewis...
- Giai đoạn 2: sử dụng môi trường albumin, nhiệt độ 37^0C nhằm phát hiện các kháng thể miễn dịch, bản chất của chúng thường là những IgG hoạt động tốt ở nhiệt độ nóng và môi trường albumin. Những kháng thể này thuộc hệ thống Rhesus, Kidd, Kell, Duffy...
- Giai đoạn 3: sử dụng huyết thanh Coombs, huyết thanh Coombs sẽ làm cầu nối giữa các hồng cầu đã bị cảm ứng và giúp phát hiện các kháng thể miễn dịch thuộc hệ thống Rhesus, Kidd, Kell, Duffy...

6. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Mẫu máu lấy không đúng quy cách.
- Lam kính, ống nghiệm bẩn gây ngưng kết giả.
- Ly tâm không đúng tốc độ và thời gian.
- Nhiệt độ của bình cách thủy không đúng.
- Mẫu máu bị tiêu huyết hay nhiễm trùng.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày mục đích của phản ứng hòa hợp.
2. Trình bày ý nghĩa của 3 giai đoạn trong phản ứng hòa hợp
3. Trình bày quy trình kỹ thuật của phản ứng hòa hợp.

BẢNG KIỂM

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ và hóa chất	Dụng cụ và hóa chất phải đầy đủ và thuốc thử còn hạn sử dụng	0,4	0,8	1
2	Phân loại nhóm máu của bệnh nhân và người cho	Cẩn thận, chính xác	0,8	1,6	2
3	Chuẩn bị ống chính, ống phụ, ống chứng	Đúng yêu cầu, đúng số lượng	0,4	0,8	1
4	Quay ly tâm đọc kết quả ngưng tập	Quay ly tâm đúng thời gian quy định. Đọc đúng	0,4	0,8	1
5	Ủ ở 37^{0}C	Đúng thời gian và nhiệt độ	0,4	0,8	1
6	Rửa hồng cầu	Đúng 3 lần	0,4	0,8	1
7	Giai đoạn sử dụng huyết thanh Coombs	Đúng liều lượng huyết thanh Coombs	0,4	0,8	1
8	Đọc kết quả ngưng tập	Đọc đúng chính xác	0,8	1,6	2

Bài 42

QUY TRÌNH TRUYỀN MÁU TẠI GIƯỜNG BỆNH (ĐỊNH LẠI NHÓM MÁU ABO)

MỤC TIÊU

1. *Kiểm tra lại lần cuối để loại trừ các nhầm lẫn của các bước trước, bảo đảm an toàn tuyệt đối cho bệnh nhân khi truyền máu.*
2. *Trình bày được ý nghĩa của quy trình truyền máu tại giường bệnh.*

1. THỰC HIỆN QUY TRÌNH TRUYỀN MÁU TẠI GIƯỜNG BỆNH

1.1. Chuẩn bị bệnh nhân: tư vấn cho bệnh nhân hoặc người nhà bệnh nhân hiểu rõ truyền máu để họ hợp tác với thầy thuốc khi truyền máu, nhất là phát hiện sớm các tai biến.

1.2. Điều dưỡng viên (người làm thủ tục truyền máu) chuyển máu tới giường bệnh: Kiểm tra họ và tên, tuổi, số giường, căn bệnh... tất cả phải trùng với phiếu xét nghiệm nhóm máu. Nếu nghi ngờ phải hỏi lại thật kỹ.

1.3. Trực tiếp lấy máu tĩnh mạch hoặc máu đầu ngón tay của chính bệnh nhân để định lại nhóm máu

1.4. Định lại nhóm máu

1.4.1. Định lại nhóm máu của bệnh nhân

- Nhỏ 2 giọt huyết thanh mẫu mỗi loại lên phiến đá theo thứ tự: chống A...
- Từ máu tĩnh mạch bệnh nhân nhỏ 1 giọt vào huyết thanh mẫu.
- Trộn đều, vừa trộn vừa nghiêng phiến quan sát ngưng kết của hồng cầu.

1.4.2. Định lại nhóm máu của đơn vị máu

- Nhỏ 2 giọt huyết thanh mẫu lên phiến theo thứ tự: chống A,...
- Lấy máu từ túi máu qua đoạn dây dự trữ máu thử, nhỏ 1 giọt lớn vào cạnh giọt huyết thanh mẫu trên phiến đá, sau đó dùng que thuỷ tinh trộn đều máu với huyết thanh mẫu.
- Trộn đều và đọc kết quả.

1.4.3. Đối chiếu kết quả

- Nếu hoàn toàn phù hợp, bắt đầu truyền máu vào tĩnh mạch bệnh nhân.
- Nếu không phù hợp: phải kiểm tra lại toàn bộ từ công đoạn đầu lấy máu ở bệnh phòng.

1.5. Theo dõi truyền máu

- 15 phút đầu, cho máu chảy 15 - 20 giọt /1 phút, đồng thời điều dưỡng viên phải liên tục theo dõi: đếm mạch, huyết áp, quan sát toàn trạng bệnh nhân để phát hiện sớm các biểu hiện như rét run, đau ngực, khó thở...
- Sau 15 phút đầu nếu yên ổn, cho máu chảy nhanh hơn 30 - 40 giọt /1 phút, theo chỉ định của bác sĩ điều trị. Tiếp tục theo dõi cứ 15 phút /lần, điều dưỡng viên phải quay lại, quan sát và ghi kết quả lên bảng theo dõi. Thực hiện nghiêm túc việc theo dõi truyền máu theo quy định của Quy chế truyền máu.

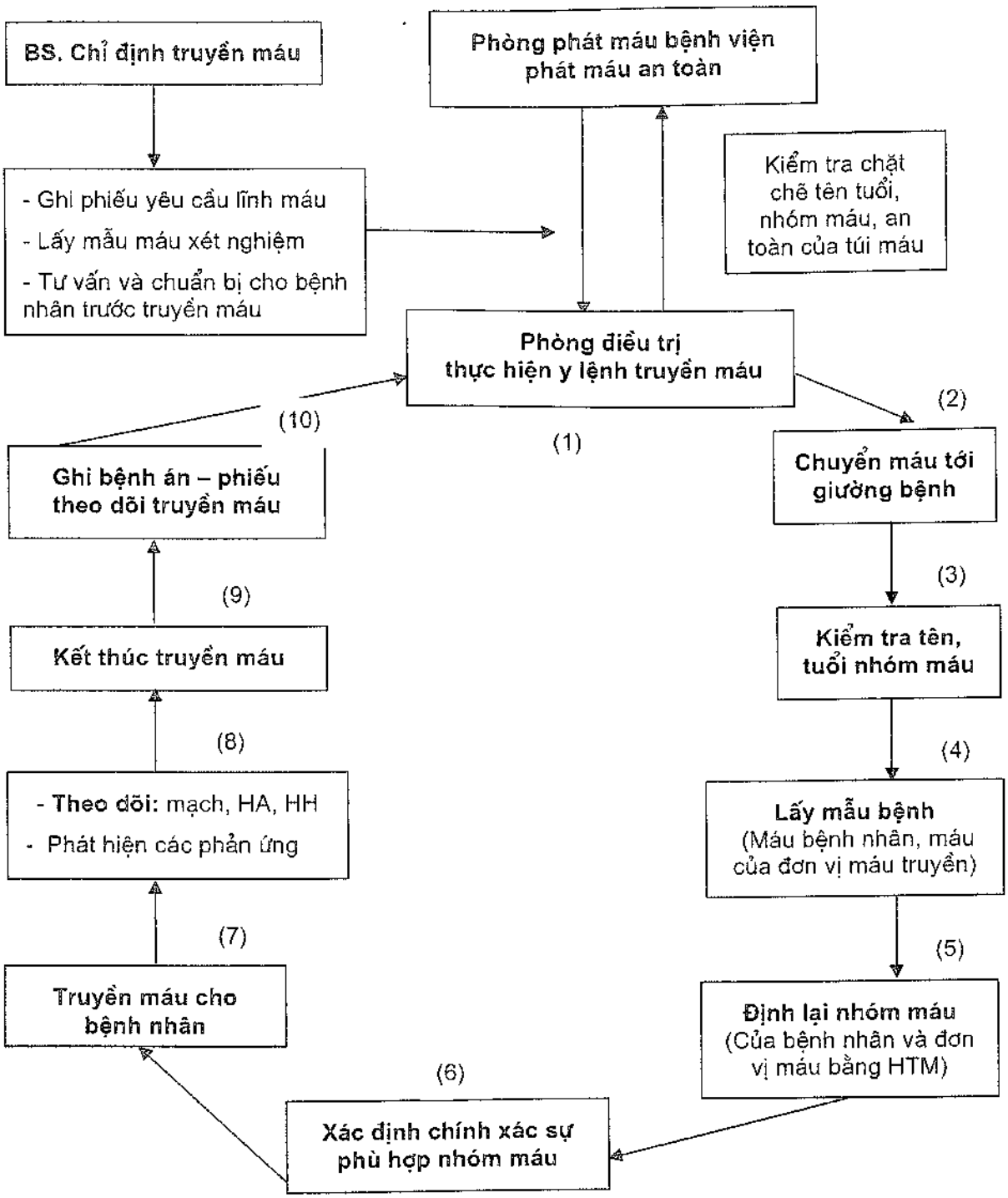
1.6. Kết thúc truyền máu

- Điều dưỡng viên thu bộ truyền máu chuyển tới nơi quy định huỷ.
- Ghi phiếu theo dõi kết quả của cuộc truyền máu, các biểu hiện lâm sàng (nếu có).
- Ghi hồ sơ bệnh án: ghi rõ giờ bắt đầu và giờ kết thúc truyền máu, các biểu hiện lâm sàng (nếu có).
- Nhắc bệnh nhân nếu có biểu hiện gì bất thường báo ngay cho Y - Bác sĩ trực.

1.7. Tiếp tục theo dõi và chăm sóc các tai biến sau truyền máu: chú ý các phản ứng miễn dịch thứ phát và các bệnh nhiễm trùng truyền qua đường truyền máu như HIV, HCV, HBV, đồng thời động viên bệnh nhân và gia đình họ tham gia cho máu cứu người bệnh như máu của người cho máu đã cứu mình.

1.8. Các sai sót có thể gặp

- Không định lại nhóm máu người cho (túi máu) và người nhận (máu đầu ngón tay, hay máu tĩnh mạch).
- Khi định nhóm máu không lấy máu từ chính bệnh nhân mà từ ống nghiệm đã lấy trước.
- Không tuân thủ lịch theo dõi 15 phút 1 lần.
- Không ghi kết quả vào bảng theo dõi truyền máu, ghi hồi cứu.
- Khi theo dõi thì hỏi qua loa, không lấy mạch và huyết áp.
- Không chuẩn bị bệnh nhân trước truyền máu: tư vấn, đại tiểu tiện, vệ sinh tay...



Sơ đồ 42.1. Mô tả quy trình truyền máu tại giường bệnh

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Liệt kê các bước của quy trình truyền máu tại giường bệnh.
2. Trình bày ý nghĩa của quy trình truyền máu tại giường bệnh.

Bài 43

KỸ THUẬT ĐIỀU CHẾ CÁC SẢN PHẨM MÁU: HUYẾT TƯƠNG - KHỐI HỒNG CẦU - KHỐI TIỂU CẦU

MỤC TIÊU

1. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ thuốc thử để điều chế các sản phẩm máu.*
2. *Trình bày được tiến trình kỹ thuật điều chế huyết tương khối hồng cầu.*
3. *Trình bày được tiến trình điều chế khối tiểu cầu.*

1. KỸ THUẬT ĐIỀU CHẾ HUYẾT TƯƠNG

1.1. Nguyên tắc

Huyết tương được tách ra khỏi các thành phần tế bào để bảo quản dài ngày ở nhiệt độ lạnh.

1.2. Dụng cụ – Thuốc thử

- Máy ly tâm lạnh
- Bàn ép huyết tương
- Kéo, kẹp hay khóa nhựa

1.3. Tiến trình kỹ thuật

- Lấy máu toàn phần vào túi nhựa có chất chống đông CPD - A_1.
- Quay ly tâm với tốc độ 2000 – 2500 vòng /phút trong 10 – 15 phút.
- Lấy ra để tách huyết tương có luôn cả bạch cầu, tiểu cầu.
- Phần huyết tương đã tách được đem ra quay ly tâm lần thứ hai với tốc độ 2000 – 2500 vòng /phút trong 10 – 15 phút.
- Một đơn vị huyết tương là 100ml, dán nhãn nhóm máu ABO, Rhesus, nhóm máu huyết thanh (nếu được), ghi số điều chế, số túi.
- Bảo quản ở nhiệt độ-18^{0}C tốt nhất là -35^{0}C.

- Huyết tương tươi là huyết tương được điều chế trong vòng 8 giờ kể từ khi 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. Thời gian bảo quản là 12 tháng.
- Sau khi rã đông, cần được sử dụng trong vòng 6 - 8 giờ.

2. KỸ THUẬT ĐIỀU CHẾ KHỐI HỒNG CẦU

2.1. Nguyên tắc

Tách huyết tương từ máu toàn phần bằng cách ly tâm hoặc để lắng ta sẽ thu được khối hồng cầu.

2.2. Dụng cụ – Thuốc thử

- Máy quay ly tâm lạnh
- Bàn ép huyết tương
- Kéo, kẹp hay khóa nhựa
- Kìm vuốt dây
- Máu toàn phần được lấy vô trùng vào bộ túi dẻo.

2.3. Tiến trình kỹ thuật

- Xếp các túi máu vào ống ly tâm.
- Quay ly tâm lạnh 2000 – 2500 vòng /phút trong 10 – 15 phút.
- Rút bớt huyết tương trên bàn ép huyết tương.
- Mở thông dây nối túi máu toàn phần với túi chuyển để huyết tương chảy sang túi chuyển.
- Khóa, dây nối túi máu chứa khối hồng cầu và túi chứa huyết tương bằng kẹp hay khóa nhựa.
- Hàn dây nối giữa túi khối hồng cầu và túi huyết tương ở hai vị trí cách nhau 0,5m.
- Điền đầy đủ thông tin.
- Cắt rời dây nối giữa 2 vị trí hàn.
- Bảo quản khối hồng cầu ở tủ lạnh nhiệt độ 2 – 6^{0}C
- Thời gian bảo quản: nếu không bổ sung dung dịch bảo quản hồng cầu, điều chế vô trùng, thể tích khối hồng cầu = 75% thì thời gian bảo quản như máu toàn phần.

– Sử dụng bộ dây có bầu lọc với đường kính lỗ lọc 170 - 200μm để truyền.

3. KỸ THUẬT ĐIỀU CHẾ KHỐI TIỂU CẦU

3.1. Nguyên tắc

Khối tiểu cầu được điều chế từ huyết tương giàu tiểu cầu sau khi loại bỏ phần lớn hồng cầu bạch cầu, huyết tương.

3.2. Dụng cụ - thuốc thử

- Máu toàn phần tươi được lấy trong hệ thống 3 hoặc 4 túi.
- Máy ly tâm lạnh
- Bàn ép huyết tương
- Kéo
- Kẹp hoặc khóa nhựa
- Máy hàn dây

3.3. Tiến trình kỹ thuật

- Lấy máu người cho vào hệ thống túi 3 hay túi 4.
- Xếp túi máu vào ống ly tâm ly tâm nhẹ ở 22^{0}C.
- Đặt túi máu đã ly tâm lên bàn ép huyết tương.
- Mở thông dây nối túi máu toàn phần với túi chuyển thứ nhất để huyết tương giàu bạch cầu, tiểu cầu chảy sang túi chuyển.
- Khóa dây nối túi máu chứa khối hồng cầu và túi chứa huyết tương giàu tiểu cầu, bạch cầu bằng kẹp hay khóa nhựa.
- Hàn dây nối giữa túi khối hồng cầu và túi huyết tương
- Cắt rời dây nối giữa 2 vị trí hàn.
- Xếp các túi chứa huyết tương giàu tiểu cầu vào ống ly tâm.
- Ly tâm mạnh ở 22^{0}C.
- Đặt túi huyết tương đã ly tâm lên bàn ép huyết tương.
- Mở khóa cho phần huyết tương nghèo tế bào chảy sang túi chuyển thứ hai.
- Khi lượng huyết tương trong túi còn 30 - 50ml; ngừng ép.
- Điền đầy đủ thông tin ở nhãn túi khối tiểu cầu.
- Hàn dây nối giữa 2 túi và cắt rời dây nối giữa 2 vị trí hàn.
- Bảo quản khối tiểu cầu ở 22^{0}C có lắc trong 3 đến 7 ngày kể từ ngày lấy máu.
- Sử dụng bộ dây lọc có đường kính lỗ lọc 170 - 200 μm để truyền.

Bài 44

KỸ THUẬT SẢN XUẤT HUYẾT THANH MẪU, HỒNG CẦU MẪU

MỤC TIÊU

1. *Chuẩn bị đầy đủ các phương tiện cần thiết để sản xuất huyết thanh mẫu, hồng cầu mẫu.*
2. *Thực hiện thành thạo kỹ thuật sản xuất hồng cầu mẫu.*
3. *Trình bày được nguyên tắc sản xuất hồng cầu mẫu và huyết thanh mẫu.*

1. SẢN XUẤT HUYẾT THANH MẪU (HTM)

1.1. Nguyên tắc

Huyết thanh mẫu là những huyết thanh dùng để định nhóm máu, phải được sản xuất ở những phòng thí nghiệm riêng biệt. Những huyết thanh này phải được kiểm tra từng lô. Sản xuất ở phòng thí nghiệm để chuẩn hoá.

1.2. Dụng cụ - thuốc thử

1.2.1. Dụng cụ

- Phương tiện lấy máu và chứa máu vô khuẩn
- Máy ly tâm lớn
- Kim dài để hút huyết thanh
- Tủ ấm 56^0C
- Pipette, lam kính, đá men, ống nghiệm
- Nhãn các loại: HTM A, HTM B, HTM O
- Lọ chứa huyết thanh mẫu
- Đồng hồ bấm giây

1.2.2. Thuốc thử

- Chất pha màu:

+ Đỏ congo hoặc eosin.

+ Xanh ánh sáng hoặc xanh methylen.

- NaCl 0,9%
- Sodiumazit 5%

1.2.3. Người cho máu

- Đủ tiêu chuẩn sức khoẻ.
- Đã được hiệu giá kháng thể đạt:
  + Hiệu giá kháng thể kháng A = 1/128.
  + Hiệu giá kháng thể kháng B = 1/64.
  + Hiệu giá kháng thể kháng AB = 1/32.

1.3. Tiến trình kỹ thuật

- Lấy máu vào chai khô, sạch, vô khuẩn, không cho chất chống đông (số lượng tùy theo yêu cầu).
- Để ở nhiệt độ phòng thí nghiệm 24 – 48 giờ (cục máu sẽ co hoàn toàn và tiết hết huyết thanh).
- Hút huyết thanh sang một chai vô khuẩn khác.
- Quay ly tâm mạnh.
- Hút huyết thanh này sang 1 chai vô khuẩn khác.
- Khử bổ thể ở 56^{0}C trong 30 phút.
- Cứ 100ml huyết thanh cho 2ml dung dịch sodiumazit 5%.
- Kiểm tra lại các tiêu chuẩn
  + Hiệu giá > 1/64
  + Độ nhạy: 10 giây – 20 giây
  + Cường độ: +++
- Pha màu:
  + Huyết thanh mẫu A (kháng B: Anti B): pha màu đỏ, cứ 100ml huyết thanh cho 2ml đỏ congo 10%.
  + Huyết thanh mẫu B (kháng A: Anti B): pha màu xanh, cứ 100ml huyết thanh cho 2ml xanh ánh sáng 10%.
  + Huyết thanh mẫu O (kháng A, B: Anti A, B): không pha màu.
- Dùng bơm tiêm vô khuẩn phân phối từng loại huyết thanh mẫu vào chai đã vô khuẩn, mỗi chai 3ml.

- Đóng nút hàn ống.
- Dán nhãn, ghi ngày tháng sản xuất, nơi sản xuất, hiệu giá, độ nhạy, thời hạn sử dụng...
- Sau mỗi lô sản xuất đều phải giữ lại một bộ mẫu để làm chứng. Mẫu này chỉ được hủy đi khi đã dùng hết số lượng.
- Bảo quản ở 2 – 4^{0}C liên tục để tránh nhiễm khuẩn.
- Thời gian bảo quản: tùy theo điều kiện sản xuất và điều kiện bảo quản.

1.4. Kiểm tra các tiêu chuẩn

1.4.1. Đo độ nhạy

- Nhiệt độ 20^{0}C.
- Nhỏ lên đá men:
  + 1 giọt huyết thanh mẫu
  + 2 giọt hỗn dịch hồng cầu 10%.
- Trộn nhanh thành vòng tròn 3cm.
- Bấm đồng hồ và tính thời gian khi xuất hiện ngưng kết đầu tiên nhìn bằng mắt thường.

1.4.2. Đo cường độ

- Nhiệt độ 20°C.
- Nhỏ lên đá men:
  + 1 giọt huyết thanh mẫu
  + 1 giọt hỗn dịch hồng cầu 10%.
- Trộn đều và bấm đồng hồ.
- Trong 3 phút phải ngưng kết hoàn toàn (+++), không có hồng cầu tự do.

1.4.3. Đo hiệu giá và điểm (score) của ngưng kết

- Pha loãng huyết thanh bằng nước muối 9‰ (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128).
- Nhiệt độ 20^{0}C.
- Nhỏ vào mỗi ống nghiệm:
  + 2 giọt huyết thanh ở mỗi độ pha loãng
  + 2 giọt hồng cầu 10%.
- Ly tâm 500 vòng /phút trong 1 phút.

- Lắc nhẹ.
- Xem hiện tượng ngưng kết bằng mắt thường:
  + Nếu có ≥ 3 đám lớn: (+++) 10 điểm
  + Nếu có 4 - 10 đám lớn: (++) 8 điểm
  + Nếu có 10 đám, lắc lại bị tách ra: (+) 5 điểm
  + Nếu ngưng kết rất nhỏ: (+/-) 2 điểm
  + Nếu không ngưng kết: (-) 0 điểm

2. SẢN XUẤT HỒNG CẦU MẪU (HCM)

Hồng cầu mẫu là những hồng cầu đã biết kháng nguyên dùng để định nhóm máu với huyết thanh của bệnh nhân. Khác với HTM, HCM không được sản xuất hàng loạt vì không bảo quản được lâu nên chỉ sản xuất với số lượng ít tại các phòng xét nghiệm.

2.1. Dụng cụ - Thuốc thử

2.1.1. Dụng cụ

- Các dụng cụ lấy máu tĩnh mạch.
- Ống nghiệm ly tâm có chia độ.
- Lam kính, pipette, que gỗ, bút chì sáp.
- Máy ly tâm.

2.1.2. Hóa chất

- NaCl 0,9%.
- Natricitrat 3,8%.
- Anti A và anti B.

2.1.3. Người cho máu

- Đạt tiêu chuẩn sức khoẻ.
- Đã được xác định nhóm máu (ABO)

2.2. Tiến trình kỹ thuật

- Lấy máu tĩnh mạch cho vào chai có chất chống đông.
- Lắc nhẹ ống máu.
- Lấy ba ống nghiệm ly tâm và ghi A, B, O tương ứng.

- Cho vào ống A 1ml máu nhóm A, ống B 1ml máu nhóm B và ống O 1ml máu nhóm O.
- Cho thêm dung dịch NaCl 0,9% vào mỗi ống nghiệm đến vạch 10. Trộn đều máu với nước muối.
- Ly tâm 5 phút với tốc độ 1.000 vòng/phút.
- Hút hết phần nước ở trên, cho thêm nước muối NaCl 0,9% vào ống nghiệm đến vạch 10.
- Dùng gòn không thấm đậy miệng ống nghiệm và lắc nhẹ nhàng để trộn đều máu và nước muối.
- Ly tâm lần thứ hai và tiếp tục như thế để rửa sạch hồng cầu ba lần.
- Lần ly tâm thứ ba để 10 phút cho hồng cầu lắng kỹ.
- Dùng ống hút, hút hết phần nước ở trên, đọc mức hồng cầu lắng trong ống ly tâm.
- Cho thêm NaCl 0,9% vào để có huyền trọc hồng cầu theo công thức:

$$\text{Thể tích toàn phần (hồng cầu + nước muối)} = \frac{\text{Thể tích khối hồng cầu} \times 100}{\text{Nồng độ}}$$

- Nếu phần nước nổi bên trên có màu hồng sau lần rửa thứ hai thì không nên dùng.
- Phải phân loại máu lại sau khi điều chế để có hồng cầu mẫu chính xác.
- Phải lưu trữ hồng cầu mẫu ở 2° - 4°C, tốt nhất là điều chế để sử dụng trong ngày.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc điều chế huyết thanh mẫu và hồng cầu mẫu.

2. Nêu các tiêu chuẩn của huyết thanh mẫu.

3. Tại sao hồng cầu mẫu không được sản xuất với số lượng lớn và để dùng lâu ngày.

4. Trình bày tiến trình kỹ thuật sản xuất huyết thanh mẫu.

5. Trình bày tiến trình kỹ thuật sản xuất hồng cầu mẫu.

BẢNG KIỂM

Kỹ thuật điều chế hồng cầu mẫu

STT	Thao tác	Yêu cầu phải đạt	Điểm đạt		
			Làm chưa đạt yêu cầu	Làm được	Làm tốt
1	Chuẩn bị dụng cụ và hóa chất để điều chế hồng cầu mẫu.	Dụng cụ và hóa chất phải đúng và đầy đủ.	0,4	0,8	1
2	Ghi ký hiệu A, B, O vào 3 ống nghiệm ly tâm có chia độ	Ghi rõ và đúng ký hiệu vào 3 ống nghiệm ly tâm khô và sạch	0,4	0,8	1
3	Cho máu nhóm A, B, O vào 3 ống nghiệm có ký hiệu tương ứng	Cho đúng thể tích 1ml và đúng nhóm máu vào ống nghiệm có ký hiệu tương ứng.	0,8	1,6	2
4	Cho dung dịch NaCl 0,9% vào mỗi ống nghiệm, trộn đều máu và nước muối.	Cho dung dịch vào đúng vạch chỉ thể tích 10ml, lắc nhẹ để trộn đều máu và nước muối.	0,8	1,6	2
5	Quay ly tâm	Ly tâm đúng tốc độ 1000 vòng/5 phút	0,4	0,8	1
6	Đọc khối thể tích hồng cầu. Sau lần ly tâm thứ 3, hút bỏ nước muối, áp dụng công thức để cho nước muối vào sao cho đúng nồng độ hồng cầu mẫu cần điều chế.	Đọc khối thể tích hồng cầu và cho thêm nước muối vào ống nghiệm chính xác.	0,8	1,6	2
7	Phân phối hồng cầu mẫu vào lọ có ghi nhãn tương ứng.	Cho hồng cầu mẫu vào đúng lọ có ghi nhãn tương ứng.	0,4	0,8	1

Bài 45

PHƯƠNG PHÁP HIỆU GIÁ KHÁNG THỂ MIỄN DỊCH

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo kỹ thuật hiệu giá kháng thể miễn dịch.*
2. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ, thuốc thử.*

1. NGUYÊN TẮC

Kỹ thuật hiệu giá kháng thể chống A và chống B được tiến hành qua hai giai đoạn:

- Khử kháng thể tự nhiên bằng cách đun nóng ở 70^0C trong 10 phút.
- Hiệu giá kháng thể miễn dịch được thực hiện bằng kỹ thuật

  Phương pháp hiệu giá ở môi trường albumin và xét nghiệm Coombs gián tiếp.

2. DỤNG CỤ - THUỐC THỬ

- Dụng cụ: ống nghiệm nhỏ, lam kính, pipette.
- Huyết thanh xét nghiệm 5ml
- 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.
- Huyết thanh chứng lấy ở người bình thường không có kháng thể miễn dịch.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

3.1. Khử kháng thể tự nhiên bằng nhiệt

- Sử dụng 2 ống nghiệm:

  Trong ống nghiệm 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 thủy có nhiệt độ 70^{0}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.

3.2. Kỹ thuật hiệu giá kháng thể miễn dịch

3.2.1. Phương pháp trong ống nghiệm

- 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 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 dãy B.
- Lắc đều. Để tất cả hai dãy ống nghiệm vào trong bình cách thủy 37^{0}C/1 giờ. Quay ly tâm 2000 vòng /phút/1 phút trong điều kiện nhiệt độ của phòng thí nghiệm. Sau khi ly tâm xong, phải để những ống nghiệm đó ở nhiệt độ 37^{0}C trong 3 phút.
- Đọc kết quả: quan sát hiện tượng tan máu và ngưng kết bằng mắt thường.

3.2.2. Xét nghiệm Coombs gián tiếp

- 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. Lấy những ống không ngưng kết để vào thùng cách thủy 37^{0}C/1giờ, 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.

– Lấy những ống không ngưng kết đem ly tâm ở tốc độ 2000 vòng /phút/3phút. 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/1 phút. 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.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày nguyên tắc hiệu giá kháng thể chống A, chống B.
2. Liệt kê tiến trình kỹ thuật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Trần Văn Bé. Thực hành Huyết học – Truyền máu. Nhà xuất bản Y học – 2003.
2. Bộ môn Xét nghiệm. Giáo trình huyết học thực hành 2002
3. Tài liệu dùng trong các kỹ thuật xét nghiệm cơ bản và huyết học. Nhà xuất bản Y học – 1997.
4. Nguyễn Ngọc Minh. Cầm máu và huyết khối. Trung tâm Huyết học – Truyền máu khu vực Huế – 2005.
5. Đỗ Trung Phấn. Kỹ thuật xét nghiệm Huyết học và truyền máu ứng dụng trong lâm sàng. Nhà xuất bản Y học – 2005, 2009.
6. Đỗ Trung Phấn. Bệnh lý tế bào nguồn tạo máu. Nhà xuất bản Y học – 2003, 2008 (tái bản lần 1).
7. Đỗ Trung Phấn và cộng sự. Một số chỉ số máu ngoại vi bình thường: kết quả bước đầu nghiên cứu một số chỉ tiêu sinh học người Việt Nam. Nhà xuất bản Y học – 1996.
8. Trịnh Hồng Thái. Miễn dịch huyết học. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật – 2002
9. Ngô Thị Thắng. Giáo trình Huyết học. Nhà xuất bản Y học – 2004.
10. Lê Thị Kim Thu – Hoàng Bích Ngọc. Giáo trình xét nghiệm cơ bản dùng cho kỹ thuật viên Trung học xét nghiệm. Nhà xuất bản Y học – 2004
11. Nguyễn Anh Trí. Đông máu ứng dụng trong lâm sàng. Nhà xuất bản Y học – 2000.
12. Trần Minh Tùng. Kỹ thuật thí nghiệm y khoa Hạng A. Bộ Y tế – 1970.
13. Bạch Quốc Tuyên và cộng sự. Huyết học tập 1. Nhà xuất bản Y học – 1991.

TIẾNG NƯỚC NGOÀI

14. Armando G., Amador. Hemostasis parameters. Hematology databases – 1999.
15. John H. Griffin. Hemostasis and Thrombosis. The Scripps Research Institue – 2002.
16. Manabu Yamanaka. Blood plaletes. Sysmex Corporation – Kobo Japan – 2000.
17. Mazza Joseph. Manual of Clinical Hematology – 2002.
18. Noriyuki Tatsumi. General Hematology. Sysmex Corporation – 2002.
19. Shiro Miwa. Atlas of blood cell. Bunkodo Co., Ltd. Tokyo, Japan – 1998.
20. Williams. Examination of blood. William Hematology – 2001.

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

KỸ THUẬT XÉT NGHIỆM HUYẾT HỌC TRUYỀN MÁU

Chịu trách nhiệm xuất bản
HOÀNG TRỌNG QUANG

Biên tập: BS. NGUYỄN LAN
Sửa bản in: NGUYỄN LAN
Trình bày bìa: CHU HÙNG
Kt vi tính: BÙI HUỆ CHI

In 300 cuốn, khổ 19x27 tại Xưởng in Nhà xuất bản Y học.
Giấy phép xuất bản số: 577 - 2009/CXB/8 - 61/YH
In xong và nộp lưu chiểu quý III năm 2009.