

**BỘ Y TẾ**

**CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM**

**Độc lập - Tự do - Hạnh phúc**

Số: 3123 /QĐ-BYT

Hà Nội, ngày 02 tháng 10 năm 2025

**QUYẾT ĐỊNH**

**Về việc ban hành tài liệu chuyên môn  
“Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Giải phẫu bệnh”**

**BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ**

Căn cứ Luật Khám bệnh, chữa bệnh năm 2023;

Căn cứ Nghị định số 42/2025/NĐ-CP ngày 27/02/2025 của Chính phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Y tế;

Căn cứ Thông tư số 23/2024/TT-BYT ngày 18 tháng 10 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành Danh mục kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh;

Căn cứ Quyết định số 621/QĐ-BYT ngày 14 tháng 03 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế về việc thành lập Hội đồng chuyên môn nghiệp thu “Hướng dẫn quy trình chuyên môn kỹ thuật về Giải phẫu bệnh”;

Căn cứ Biên bản họp ngày 08 tháng 08 năm 2025 của Hội đồng chuyên môn nghiệp thu “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Giải phẫu bệnh”; Công văn số 3270/BVK-KHTH ngày 25 tháng 08 năm 2025 của Bệnh viện K về việc hoàn thiện Hướng dẫn Quy trình chuyên môn kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh;

Theo đề nghị của Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh.

**QUYẾT ĐỊNH:**

**Điều 1.** Ban hành kèm theo Quyết định này Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Giải phẫu bệnh” – Tập 1, gồm 69 quy trình kỹ thuật (Tài liệu chuyên môn kèm theo).

**Điều 2.** Tài liệu chuyên môn “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về Giải phẫu bệnh” được áp dụng tại các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh. Dựa trên tài liệu chuyên môn này, các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh có trách nhiệm xây dựng quy trình kỹ

thuật về Giải phẫu bệnh phù hợp với điều kiện thực tế của cơ sở khám bệnh, chữa bệnh.

**Điều 3.** Quyết định này có hiệu lực kể từ ngày 01/7/2026.

**Điều 4.** Các ông, bà: Chánh Văn phòng Bộ; Cục trưởng Cục Quản lý Khám, chữa bệnh; Cục trưởng, Vụ trưởng các Cục, Vụ thuộc Bộ Y tế; Giám đốc các bệnh viện trực thuộc Bộ Y tế; Giám đốc Sở Y tế các tỉnh, thành phố trực thuộc trung ương; Thủ trưởng Y tế các ngành và các cơ quan, đơn vị liên quan chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

*Noi nhận:*

- Như Điều 4;
- Bộ trưởng (để báo cáo);
- Các Thứ trưởng;
- BHXNVN - Bộ Tài chính;
- Cổng thông tin điện tử Bộ Y tế;
- Website Cục QLKCB;
- Tổng hội Y học Việt Nam và các hội y khoa;
- Lưu: VT, KCB.

**KT. BỘ TRƯỞNG  
THÚ TRƯỞNG**



Trần Văn Thuấn



# **HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ GIẢI PHẪU BỆNH (TẬP 1)**

(Ban hành kèm theo Quyết định số 3123/QĐ-BYT ngày 02 tháng 10 năm 2025  
của Bộ trưởng Bộ Y tế)

**Hà Nội, 2025**

**Chỉ đạo biên soạn, thẩm định**

GS.TS. Trần Văn Thuần	Thứ trưởng Bộ Y tế
-----------------------	--------------------

**Chủ biên**

PGS.TS. Trịnh Tuấn Dũng	Chủ tịch Hội Giải phẫu bệnh - Tế bào bệnh học Việt Nam
-------------------------	--

TS. BS. Hà Anh Đức	Cục trưởng, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
--------------------	---

**Tham gia biên soạn, thẩm định**

PGS.TS. Trịnh Tuấn Dũng	Chủ tịch Hội Giải phẫu bệnh - Tế bào bệnh học Việt Nam
-------------------------	--

TS.BS. Dương Huy Lương	Phó Cục trưởng, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
------------------------	---

TS.BS. Vương Ánh Dương	Phó Cục trưởng, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
------------------------	---

PGS.TS. Tạ Văn Tờ	Giám đốc Trung tâm Giải phẫu bệnh & Sinh học phân tử, Bệnh viện K
-------------------	---

TS. Nguyễn Văn Chi	Phó Cục trưởng, Cục Bà mẹ và Trẻ em
--------------------	-------------------------------------

TS.BS. Phạm Văn Tuyên	Giám đốc Trung tâm Giải phẫu bệnh - Tế bào học, Bệnh Viện Bạch Mai
-----------------------	--

PGS.TS. Nguyễn Văn Chủ	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh Bệnh Viện K (K1).
------------------------	--

TS.BS. Dương Hoàng Hảo	Trưởng Khoa Giải Phẫu Bệnh- Bệnh viện Ung bướu Hà Nội
------------------------	---

TS.BS. Nguyễn Công Trung	Trưởng Khoa Giải Phẫu Bệnh- Bệnh viện E; Giảng viên Bộ môn Giải phẫu bệnh, Đại học Y Hà Nội
--------------------------	---

TS. BS. Nguyễn Khánh Dương	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh, bệnh viện Phụ Sản Trung ương
----------------------------	--

BS CKII. Nguyễn Bùi Ngọc Diệp	Phó khoa Giải phẫu bệnh lý, Bệnh viện Chợ Rẫy
-------------------------------	---

BS CKII. Đoàn Phước Thi	Phó trưởng khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Đa khoa Trung ương Huế
-------------------------	--

PGS.TS. Đặng Công Thuận	Trưởng Khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện Đại học Y Dược Huế
-------------------------	---

TS.BS. Đoàn Thị Phương Thảo	Trưởng Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Đại học Y - Dược thành phố Hồ Chí Minh
-----------------------------	--

TS. BS. Ngô Thị Minh Hạnh	Chủ nhiệm Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Trung ương Quân đội 108
---------------------------	--

PGS.TS. BS CKII. Trần Ngọc Dũng	Chủ nhiệm Bộ môn-Khoa Giải phẫu bệnh - Pháp Y, Bệnh viện Quân y 103
---------------------------------	---

TS.BS. Nguyễn Ngọc Dũng	Trưởng Khoa Giải phẫu bệnh -Tế bào học – Viện Huyết học Truyền máu Trung ương
-------------------------	---

TS.BS. Hoàng Anh Tuấn	Trưởng khoa Xét nghiệm Bệnh viện Mắt Trung ương
-----------------------	---

TS.BS. Trần Ngọc Minh	Trưởng Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội; Giảng viên bộ môn Giải phẫu bệnh, Đại học Y Hà Nội
-----------------------	--

TS.BS. Nguyễn Sỹ Lánh	Trưởng Khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức
-----------------------	--

TS. BS. Hoàng Ngọc Thạch	Khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương
BS CK II. Phó Hồng Địệp	Phó Trưởng khoa Khoa Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương
BS CKII. Phạm Duy Đạt	Trưởng khoa Khoa Giải phẫu bệnh lý, Bệnh viện da khoa Xanh Pôn Hà Nội
PGS.TS.BS. Lê Trung Thọ	Giám đốc Trung tâm Giải phẫu bệnh- Sinh học phân tử, Bệnh viện Phổi Trung ương; Giảng viên cao cấp Bộ môn Giải phẫu bệnh, Đại học Y Hà Nội
ThS.BS. Đỗ Xuân Anh	Trưởng khoa Xét nghiệm tổng hợp, bệnh viện Tai Mũi Họng Trung ương
TS.BS. Phạm Nguyên Cường	Trưởng Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện TW Huế
BSCKII. Lê Thị Hải Yến	Phó Trưởng Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Da liễu Trung ương
TS.BS.NCVCC. Tưởng Phi Vương	Viện trưởng, Viện 69
ThS.BS.NCVC. Lê Tài Thế	Chủ nhiệm khoa hình thái học, Viện 69
<b>Thư ký</b>	
ThS.BS. Đào Nguyên Minh	Trưởng phòng Quản lý chất lượng và Chuyển giao kỹ thuật, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh
BS. CKII Nguyễn Thị Thanh Mai	Phó Giám đốc Trung tâm Giải phẫu bệnh & Sinh học phân tử, Bệnh viện K
BS CKII. Trần Văn Chương	Phó Giám đốc Giám đốc Trung tâm Giải phẫu bệnh - Tế bào học, Bệnh Viện Bạch Mai
ThS.KTY. Ninh Văn Quyết	Trung tâm Giải phẫu bệnh - Tế bào học, Bệnh Viện Bạch Mai
BSCKII. Chủ Quốc Hoàn	Trưởng phòng Kế hoạch Tổng hợp; Bệnh viện K
ThS.BS. Nguyễn Cao Cường	Phòng Kế hoạch Tổng hợp; Bệnh viện K
ThS.BS. Lê Sinh Quân	Chuyên viên, Phòng Quản lý chất lượng và Chuyên giao kỹ thuật, Cục Quản lý Khám, chữa bệnh

## **LỜI NÓI ĐẦU**

Ngành Giải phẫu bệnh đóng vai trò hết sức quan trọng trong Hệ thống y tế hiện đại, được xem là tiêu chuẩn vàng trong để chẩn đoán xác định nhiều bệnh, đặc biệt là các bệnh lý u và ung thư. Việc chuẩn hóa các quy trình chuyên môn kỹ thuật trong lĩnh vực này là hết sức cần thiết nhằm đảm bảo chất lượng chẩn đoán, thống nhất trong thực hành, nâng cao hiệu quả điều trị và an toàn cho người bệnh.

Trên cơ sở các tiến bộ khoa học kỹ thuật, cập nhật theo các hướng dẫn quốc tế và phù hợp với điều kiện thực tiễn tại Việt Nam, Bộ Y tế tổ chức xây dựng tài liệu chuyên môn “**Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tập 1**”. Tài liệu này tổng hợp, hệ thống hóa các quy trình kỹ thuật từ cơ bản đến chuyên sâu, áp dụng trong hoạt động chuyên môn tại các cơ sở khám chữa bệnh có triển khai các xét nghiệm Giải phẫu bệnh.

Tài liệu này là cơ sở quan trọng cho các bác sĩ, kĩ thuật viên và nhân viên y tế trong việc thực hành các kỹ thuật về Giải phẫu bệnh một cách khoa học, chính xác và hiệu quả. Đồng thời, đây cũng là căn cứ để các cơ sở y tế xây dựng quy trình nội bộ, phục vụ công tác đào tạo, kiểm tra và đánh giá chất lượng chuyên môn.

Bộ Y tế trân trọng cảm ơn các chuyên gia, các nhà khoa học, các đơn vị y tế và các cá nhân đã đóng góp nhiều công sức trong quá trình xây dựng tài liệu này.

Trong quá trình sử dụng, nếu có khó khăn, vướng mắc hoặc góp ý hoàn thiện, đề nghị các đơn vị phản hồi về Bộ Y tế để kịp thời cập nhật, bổ sung.

Trân trọng !

**GS. TS. Trần Văn Thuấn  
THỨ TRƯỞNG BỘ Y TẾ**

## NGUYÊN TẮC ÁP DỤNG HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT

1. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật được xây dựng và ban hành theo từng chương, chuyên ngành; bao gồm các quy định về chỉ định, chống chỉ định, thận trọng, chuẩn bị thực hiện kỹ thuật, đến các bước thực hiện theo trình tự từ khi bắt đầu đến khi kết thúc thực hiện kỹ thuật.

2. Tài liệu chuyên môn Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tế bào; Quyển 1 được xây dựng và ban hành cho các kỹ thuật có trong Phụ lục số 02, Thông tư số 23/2024/TT-BYT ngày 18 tháng 10 năm 2024 của Bộ trưởng Bộ Y tế ban hành danh mục kỹ thuật trong khám bệnh, chữa bệnh. Tài liệu chuyên môn này được áp dụng tại các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh từ ngày 01 tháng 07 năm 2026.

3. Quy định về thời gian thực hiện kỹ thuật, nhân lực (chức danh chuyên môn nghề nghiệp, số lượng nhân lực), thuốc, thiết bị y tế... trong Hướng dẫn quy trình kỹ thuật do Bộ Y tế ban hành dựa trên tính phổ biến, thường quy thực hiện tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh. Trong thực tế triển khai, căn cứ diễn biến lâm sàng, tình trạng người bệnh, căn cứ vào điều kiện thực tế về hạ tầng, thiết bị, nhân lực các đơn vị quy định thời gian tương ứng với điều kiện của đơn vị mình trong hướng dẫn quy trình của từng đơn vị để làm căn cứ thực hiện.

4. Chỉ sử dụng các thuốc, thiết bị y tế... được cấp phép theo quy định hiện hành.

5. Trong quá trình triển khai áp dụng Hướng dẫn quy trình kỹ thuật, nếu thấy các bất cập hoặc nhu cầu cần sửa đổi, bổ sung, các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh chủ động cập nhật và ban hành Hướng dẫn quy trình kỹ thuật, đồng thời báo cáo, đề xuất Bộ Y tế (Cục QLKCB) về việc cập nhật để ban hành áp dụng trong cả nước.

## MỤC LỤC

CHỦ VIẾT TẮT .....	16
PHẦN I. CÁC QUY TRÌNH KỸ THUẬT TẾ BÀO HỌC .....	17
1. CHỌC HÚT KIM NHỎ MỘT VỊ TRÍ TỐN THƯƠNG HOẶC U CỦA DA, DƯỚI DA VÀ CÁC CƠ QUAN CÓ VỊ TRÍ NÔNG .....	18
2. CHỌC HÚT KIM NHỎ MỘT VỊ TRÍ TỐN THƯƠNG HOẶC U CỦA DA, DƯỚI DA VÀ CÁC CƠ QUAN CÓ VỊ TRÍ NÔNG DƯỚI HƯỚNG DẪN CỦA SIÊU ÂM .....	23
3. CHỌC HÚT KIM NHỎ CÁC TỐN THƯƠNG HOẶC U Ở VỊ TRÍ SÂU (Ồ BỤNG, TRUNG THẤT,...) DƯỚI HƯỚNG DẪN CỦA SIÊU ÂM .....	28
4. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN TẾ BÀO HỌC CÁC BỆNH PHẨM CHỌC HÚT KIM NHỎ, ÁP LAM .....	33
5. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN TẾ BÀO HỌC DỊCH CƠ THỂ .....	36
6. XÉT NGHIỆM TẾ BÀO HỌC KẾT MẠC, GIÁC MẠC BẰNG PHƯƠNG PHÁP ÁP (Impression Cytology – IC) .....	39
7. XÉT NGHIỆM TẾ BÀO HỌC KẾT MẠC, GIÁC MẠC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NẠO (Scraping cytology on the conjunctive and cornea) .....	43
8. QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN TẾ BÀO HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM PAPANICOLAOU .....	48
9. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM HAI MÀU HEMATOXYLIN - EOSIN TIÊU BẢN TẾ BÀO HỌC .....	51
10. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN TẾ BÀO HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP TẾ BÀO HỌC CHẤT LỎNG (LIQUID – BASED CYOTLOGY) .....	54
11. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN TẾ BÀO TRONG CÁC LOẠI DỊCH CƠ THỂ BẰNG PHƯƠNG PHÁP TẾ BÀO HỌC CHẤT LỎNG (Non Gyn) .....	57
13. QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM TẾ BÀO TÌM TINH THỂ URAT QUA KÍNH HIỂN VI PHÂN CỤC .....	62
PHẦN II. CÁC QUY TRÌNH NHUỘM MÔ BỆNH HỌC – TẾ BÀO .....	65
28. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM ĐỎ CONGO KIÈM (THEO PUCHTLER 1962) .....	66
29. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM XANH ALCIAN .....	69
30. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM 3 MÀU CỦA MASSON (1929) .....	73
31. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM MAY – GRUNWALD – GIEMSA CHO TUÝ XƯƠNG .....	77
32. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM SOUDAN III HOẶC IV .....	81

33. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM OIL RED O TRONG DUNG DỊCH ETHANOL .....	84
34. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM ĐEN SOUDAN B TRONG DIACETIN .....	87
35. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GROCOTT .....	90
36. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM XANH PHÔ PERL PHÁT HIỆN ION SẮT.....	94
37. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM BẠC WARTHIN – STARY PHÁT HIỆN HELICOBACTER PYLORI .....	97
38. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM SẮT CAO .....	100
39. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GOMORI CHO SỢI VÕNG .....	103
40. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM ORCEIN CẢI BIÊN THEO SHIKATA PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN HbsAg.....	107
41. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM ORCEIN PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN VIÊM GAN B (HbsAg) TRONG MÔ GAN .....	110
42. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM MUCICARMIN .....	113
43. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM MAY – GRUNWALD – GIEMSA .....	116
44. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM XANH TOLUIDINE.....	119
45. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM XANH LUXOL/NISEELL .....	121
46. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GRAM .....	124
47. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM NGÁM BẠC XEM DƯỚI KÍNH HIỂN VI ĐIỆN TỬ QUÉT .....	131
48. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM TRICHROME BLUE .....	137
49. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GOMORI METHENAMINE SILVER .....	139
50. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM SẮT ....	141
51. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM CHẤT ĐỒNG.....	144
52. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM BẠC CHO THẬN BẰNG PHƯƠNG PHÁP XANH JONES .....	146
53. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM PAS (Periodic Acid Schiff).....	149

54. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM PERIODIC ACID SCHIFF DIASTATE (PAS – D) .....	152
55. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM HEMATOXYLIN EOSIN TRÊN TIÊU BẢN MÔ .....	159
56. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GIEMSA TRÊN MÀNH CẮT MÔ PHÁT HIỆN HP .....	162
57. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM PAS KẾT HỢP XANH ALCIAN .....	165
58. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM DIFF - QUICK.....	168
59. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MÔ BỆNH HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GIEMSA.....	171
60. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MÔ BỆNH HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GOMORI.....	174
61. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MÔ BỆNH HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM RETICULINE .....	177
62. NHUỘM ZIEHL – NEELSEN TÌM VI KHUẨN LAO TRONG TỔ CHỨC.....	180
63. CHUẨN BỊ MẪU MÔ VÀ ĐỌC TỒN THƯƠNG TRÊN KÍNH HIỂN VI ĐIỆN TỬ QUÉT.....	184
PHẦN III. CÁC QUY TRÌNH .....	200
65. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH CHO MỘT DẤU ẨN .....	201
66. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH TỰ ĐỘNG CHO MỖI MỘT DẤU ẨN BẰNG MÁY .....	206
67. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH CHO MỖI DẤU ẨN TRONG ĐIỀU TRỊ ĐÍCH.....	211
68. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH DẤU ẨN ALK.....	218
69. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH CHO MỖI DẤU ẨN TRONG ĐIỀU TRỊ MIỄN DỊCH .....	225
70. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH DẤU ẨN PD-L1 TRONG ĐIỀU TRỊ MIỄN DỊCH .....	232
71. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH ĐỒNG THỜI TỪ HAI DẤU ẨN TRỎ LÊN TRÊN CÙNG MỘT PHIẾN ĐỒ HOẶC MỘT TIÊU BẢN.....	239
72. XÉT NGHIỆM HÓA TẾ BÀO MIỄN DỊCH TRÊN PHIẾN ĐỒ HOẶC MỘT TIÊU BẢN CHO MỘT DẤU ẨN .....	247
73. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MIỄN DỊCH ĐỒNG THỜI TỪ HAI DẤU ẨN TRỎ LÊN TRÊN CÙNG MỘT PHIẾN ĐỒ HOẶC TIÊU BẢN .....	254

75. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG GIÁN TIẾP PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN .....	262
76. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG TRỰC TIẾP PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN .....	270
77. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG GIÁN TIẾP PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ .....	278
78. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG TRỰC TIẾP CHO BỘ 6 KHÁNG THỂ .....	282
79. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG GIÁN TIẾP ĐỊNH LƯỢNG HIỆU GIÁ KHÁNG THỂ .....	285
80. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG GIÁN TIẾP TÁCH MUỐI PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ .....	289
81. XÉT NGHIỆM BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI TẠI CHỖ GẮN BẠC HAI MÀU (DUAL-ISH).....	292
82. XÉT NGHIỆM BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI TẠI CHỖ (IN SITU HYBRIDIRATION: ISH) .....	297
83. XÉT NGHIỆM BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI TẠI CHỖ GẮN MÀU (CISH) ...	303
84. XÉT NGHIỆM BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI TẠI CHỖ GẮN HUỲNH QUANG (FISH).....	309

## DANH MỤC KỸ THUẬT

STT (cột 1)	STT của chương (cột 2)	Tên chương (cột 3)	Mã liên kết (cột 4)	Tên kỹ thuật (cột 5)
9009	1	29. Giải phẫu bệnh	25.13; 25.16	Chọc hút kim nhỏ 1 vị trí tổn thương hoặc u của da, dưới da hoặc các cơ quan có vị trí nồng
9010	2	29. Giải phẫu bệnh	25.1	Chọc hút kim nhỏ 1 vị trí tổn thương hoặc u của da, dưới da hoặc các cơ quan có vị trí nồng dưới hướng dẫn của siêu âm
9011	3	29. Giải phẫu bệnh	25.1; 25.4; 25.6; 25.12; 25.16	Chọc hút kim nhỏ các tổn thương hoặc u có vị trí sâu (ở bụng, trung thất,...) dưới hướng dẫn của siêu âm
9012	4	29. Giải phẫu bệnh	25.89	Xét nghiệm và chẩn đoán tế bào học các bệnh phẩm chọc hút kim nhỏ, áp lam
9013	5	29. Giải phẫu bệnh	25.20; 25.21; 25.22; 25.23; 25.24; 25.25; 25.26; 25.27	Xét nghiệm và chẩn đoán tế bào học dịch cơ thể
9014	6	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán tế bào học kết mạc, giác mạc bằng phương pháp áp (Impression cytology)
9015	7	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán tế bào học kết mạc, giác mạc bằng phương pháp nạo (Scraping cytology on the conjunctive and cornea)
9016	8	29. Giải phẫu bệnh	25.74	Xét nghiệm và chẩn đoán tế bào học bằng phương pháp nhuộm Papanicolaou
9017	9	29. Giải phẫu bệnh	25.60	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm hai màu Hematoxyline - Eosin trên tiêu bản tế bào học
9018	10	29. Giải phẫu bệnh	25.78	Xét nghiệm và chẩn đoán tế bào học bằng phương pháp tế bào học chất lỏng (Liquid base Cytology)
9019	11	29. Giải phẫu bệnh	25.78	Xét nghiệm và chẩn đoán tế bào trong các loại dịch cơ thể bằng phương pháp tế bào học chất lỏng (Non Gyn)

9021	13	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm tìm tinh thể urat qua kính hiển vi phân cực
9036	28	29. Giải phẫu bệnh	25.32	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm đỏ Congo kiềm (theo Puchtler 1962)
9037	29	29. Giải phẫu bệnh	25.36	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm xanh alcian
9038	30	29. Giải phẫu bệnh	25.38	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm 3 màu của Masson (1929)
9039	31	29. Giải phẫu bệnh	25.40	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm May - Grunwald - Giemsa cho tuy xương
9040	32	29. Giải phẫu bệnh	25.43	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Soudan III hoặc IV
9041	33	29. Giải phẫu bệnh	25.44	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Oil Red O trong dung dịch Ethanol
9042	34	29. Giải phẫu bệnh	25.45	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm đen Soudan B trong diacetin
9043	35	29. Giải phẫu bệnh	25.49	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Grocott
9044	36	29. Giải phẫu bệnh	25.50	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm xanh Phổ Perl phát hiện ion sắt
9045	37	29. Giải phẫu bệnh	25.51	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm bạc Warthin - Stary phát hiện Helicobacter pylori
9046	38	29. Giải phẫu bệnh	25.53	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm sắt cao
9047	39	29. Giải phẫu bệnh	25.54	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Gomori cho sợi võng
9048	40	29. Giải phẫu bệnh	25.57	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Orcein cải biến theo Shikata phát hiện kháng nguyên HBsAg
9049	41	29. Giải phẫu bệnh	25.58	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Orcein phát hiện kháng nguyên viêm gan B (HBsAg) trong mô gan
9050	42	29. Giải phẫu bệnh	25.72	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Mucicarmine
9051	43	29. Giải phẫu bệnh	25.77	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm May Grunwald - Giemsa
9052	44	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Xanh Toluidine
9053	45	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Xanh LuXol/Nisell
9054	46	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Gram

9055	47	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm ngâm bạc xem dưới kính hiển vi điện tử quét
9056	48	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Trichrome blue
9057	49	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Gomori methenamine silver
9058	50	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm sắt
9059	51	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm đồng
9060	52	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm xanh jones
9061	53	29. Giải phẫu bệnh	25.35	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm PAS Periodic Acid Schiff
9062	54	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Periodic acid schiff - diastate (PAS- D)
9063	55	29. Giải phẫu bệnh	25.37	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm hai màu Hematoxyline - Eosin trên tiêu bản mô
9064	56	29. Giải phẫu bệnh	25.59	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Giemsa trên mảnh cắt mô phát hiện HP
9065	57	29. Giải phẫu bệnh	25.69	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm PAS kết hợp xanh Alcian
9066	58	29. Giải phẫu bệnh	25.75	Xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm Diff - Quick
9067	59	29. Giải phẫu bệnh	25.59	Xét nghiệm và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Giemsa
9068	60	29. Giải phẫu bệnh	25.54	Xét nghiệm và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Gomori
9069	61	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Reticuline
9070	62	29. Giải phẫu bệnh		Nhuộm Ziehl - neelsen tìm vi khuẩn lao trong tổ chức
9071	63	29. Giải phẫu bệnh		Chuẩn bị mẫu mô và đọc tổn thương trên kính hiển vi điện tử quét
9072	64	29. Giải phẫu bệnh		Chuẩn bị mẫu mô và đọc tổn thương trên kính hiển vi điện tử truyền qua
9073	65	29. Giải phẫu bệnh	25.61	Xét nghiệm và chẩn đoán hoá mô miễn dịch cho mỗi một dấu ấn
9074	66	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán hóa mô miễn dịch tự động cho mỗi một dấu ấn bằng máy
9075	67	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán hóa mô miễn dịch cho mỗi dấu ấn trong điều trị đích (ALK, TROP-2, ROS1, BRAF,...)

9076	68	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán hóa mô miễn dịch dấu ấn ALK
9077	69	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán hóa mô miễn dịch cho mỗi dấu ấn trong điều trị miễn dịch (PD-L1, CTLA-4,...)
9078	70	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán hóa mô miễn dịch dấu ấn PD-L1 trong điều trị miễn dịch
9079	71	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán hóa mô miễn dịch đồng thời từ hai dấu ấn trở lên trên cùng một phiến đồ hoặc một tiêu bản
9080	72	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm hóa tế bào miễn dịch trên phiến đồ hoặc một tiêu bản
9081	73	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm hóa tế bào miễn dịch đồng thời từ hai dấu ấn trở lên trên cùng một phiến đồ hoặc một tiêu bản
9083	75	29. Giải phẫu bệnh	25.62	Xét nghiệm và chẩn đoán miễn dịch huỳnh quang gián tiếp phát hiện kháng nguyên
9084	76	29. Giải phẫu bệnh	25.63	Xét nghiệm và chẩn đoán miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên
9085	77	29. Giải phẫu bệnh	25.64	Xét nghiệm và chẩn đoán miễn dịch huỳnh quang gián tiếp phát hiện kháng thể
9086	78	29. Giải phẫu bệnh	25.116	Xét nghiệm và chẩn đoán miễn dịch huỳnh quang cho bộ 6 kháng thể để chẩn đoán mô bệnh học
9087	79	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán miễn dịch huỳnh quang gián tiếp định lượng hiệu giá kháng thể
9088	80	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm và chẩn đoán miễn dịch huỳnh quang gián tiếp tách muối phát hiện kháng thể
9089	81	29. Giải phẫu bệnh	25.85	Xét nghiệm bằng phương pháp lai tại chỗ hai màu (Dual-ISH)
9090	82	29. Giải phẫu bệnh	25.83	Xét nghiệm bằng phương pháp lai tại chỗ (In situ - hybridization: ISH)
9091	83	29. Giải phẫu bệnh	25.84	Xét nghiệm bằng phương pháp lai tại chỗ gắn màu (CISH)
9092	84	29. Giải phẫu bệnh		Xét nghiệm bằng phương pháp lai tại chỗ gắn huỳnh quang (FISH)

## CHỮ VIẾT TẮT

AI:	Trí tuệ nhân tạo (Artificial Intelligence)
BS:	Bác sĩ
CISH:	Lai tại chỗ gắn màu (chromogenic in situ hybridization)
Dual ISH:	Lai tại chỗ gắn hai màu
FITC:	Fluorescence Isothiocynate
FNA:	Chọc hút kim nhỏ (Fine Needle Aspiration)
GPB:	Giải phẫu bệnh
HE:	Hematoxylin - Eosin
HMMD:	Hoá mô miễn dịch
HTBMD:	Hoá tế bào miễn dịch
HVĐTTQ:	Hiển vi điện tử truyền qua
IHC:	Hoá mô miễn dịch (Immunohistochemistry)
ISH:	Lai tại chỗ (Insitu Hybridiration)
KHV:	Kính hiển vi
KN:	Kháng nguyên
KT:	Kháng thể
MDHQ:	Miễn dịch huỳnh quang
MDHQGT:	Miễn dịch huỳnh quang gián tiếp
MSDS:	Bảng chỉ dẫn an toàn hoá chất (Material Data Safety Sheets)
PAP:	Papanicolaou
PAS:	Periodic Acid Schiff
TBS:	Dung dịch đệm duy trì PH (Tris-Buffered Saline)
XN:	Xét nghiệm
WSI:	Hình ảnh toàn bộ tiêu bản (Whole Slide Image)

## **PHẦN I. CÁC QUY TRÌNH KỸ THUẬT TẾ BÀO HỌC**

## **1. CHỌC HÚT KIM NHỎ MỘT VỊ TRÍ TỔN THƯƠNG HOẶC Ủ CỦA DA, DƯỚI DA VÀ CÁC CƠ QUAN CÓ VỊ TRÍ NÔNG**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả và hướng dẫn cách thực hiện lấy bệnh phẩm tế bào bằng kỹ thuật chọc hút kim nhỏ của các tổn thương hoặc các khối u da, dưới da hoặc các cơ quan ở vị trí nông (như tuyến vú, hạch, tuyến nước bọt, tuyến giáp,...); không có hướng dẫn của các thiết bị chẩn đoán hình ảnh; nhằm lấy đúng vùng tổn thương, lấy được bệnh phẩm đủ và phù hợp cho xét nghiệm tế bào học cũng như các xét nghiệm khác (hoá tế bào, khối tế bào,...).

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Chọc hút tế bào bằng kim nhỏ (FNA- Fine Needle Aspiration) là kỹ thuật sử dụng kim tiêm, đưa kim qua da vào vùng tổn thương, hút tế bào theo phương pháp mao dẫn hoặc hút với áp lực âm (có gắn bơm tiêm) để các tế bào từ mô đi vào trong kim, bơm chất dịch lấy được trên lam kính và/hoặc vào dung dịch bảo quản phù hợp để phục vụ xét nghiệm chẩn đoán tế bào học cũng như các xét nghiệm khác.

Tế bào thu được sau chọc hút để thực hiện xét nghiệm tế bào nhằm xác định các tổn thương viêm hoặc các tổn thương u lành, u ác tính hoặc thực hiện các xét nghiệm khác như thực hiện kỹ thuật khối tế bào, xét nghiệm các dấu ấn sinh học,...

### **2. CHỈ ĐỊNH**

- Tổn thương u có thể sờ thấy bằng khám lâm sàng.

### **3. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

- Người bệnh có bệnh nặng toàn thân: suy tim, suy thận, suy hô hấp;
- Người bệnh có rối loạn đông máu;

### **4. THẬN TRỌNG**

- Thận trọng với người bệnh có tiền sử động kinh, cao huyết áp,...
- Thận trọng với các tổn thương đang trong giai đoạn viêm, đặc biệt trong viêm cấp hoặc viêm nhiễm nặng tại chỗ.
- Người bệnh quá mức lo lắng, không hợp tác.

### **5. CHUẨN BỊ**

#### **5.1. Người thực hiện**

- Nhân lực trực tiếp:
  - + Bác sĩ được hướng dẫn hoặc đào tạo kỹ thuật: 01
  - + Bác sĩ phụ: 01
  - + Kỹ thuật y: 01
- Nhân lực hỗ trợ:
  - + Nhân viên hành chính;

+ Hộ lý, nhân viên vệ sinh.

### **5.2. Thuốc, hoá chất**

- Cồn 70 độ sát khuẩn hoặc dung dịch cồn iod. Có thể sử dụng bông có thấm sẵn cồn sát khuẩn (nếu có);
- Dung dịch cố định bệnh phẩm: cồn tuyệt đối,...
- Gel sử dụng trong siêu âm;
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh;
- Dung dịch rửa tay thường quy;
- Nước cát;
- Các thuốc trong hộp chống sốc.
- Thuốc giảm đau bôi hoặc xịt ngoài da.

### **5.3. Vật tư, dụng cụ**

#### **Vật tư tiêu hao:**

- Bơm tiêm vô trùng 10ml hoặc 20ml;
- Kim tiêm loại 23G hoặc 27G;
- Lam kính sạch, một đầu mài mờ để ghi thông tin người bệnh;
- Lọ chứa dung dịch cố định để chứa bệnh phẩm;
- Bông khô tiệt trùng;
- Băng dính y tế;
- Găng tay sạch, khẩu trang, mũ y tế;
- Giấy/khăn lau tay;
- Giấy A4; sổ bàn giao bệnh phẩm.
- Bút dạ dầu, bút chì mềm, bút bi;

#### **Dụng cụ:**

- Dụng cụ gắn bơm tiêm;
- Pipet nhựa;
- Hộp inox đựng bông cồn, bông khô có nắp đậy;
- Ống inox đựng phanh, kéo;
- Panh thẳng không máu
- Kéo inox;
- 2 Khay quả đậu đựng dụng cụ, vật tư sạch và vật tư đã sử dụng;
- Hộp đựng bông cồn sát trùng và hộp đựng bông khô tiệt trùng;
- Hộp băng thép không rỉ đựng bơm, kim tiêm sạch;
- Hộp chống sốc;

- Khay/giá để tiêu bản;
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm;
- Tấm phủ vô khuẩn;
- Túi rác thải y tế; túi rác thải thông thường;
- Hộp đựng rác thải sắc nhọn;
- Thùng đựng rác thải y tế (màu vàng) và thông thường (màu xanh).

#### **5.4. Trang thiết bị**

- Ống nghe, máy đo huyết áp;
- Máy siêu âm có đầu dò phù hợp;
- Giường làm thủ thuật.
- Xe tiêm 2 tầng đựng dụng cụ.
- Kính hiển vi quang học;
- Máy tính, máy in; máy quét mã vạch.

#### **5.5. Chuẩn bị người bệnh**

- Giải thích cho người bệnh hoặc người nhà người bệnh về quy trình thực hiện, mục đích, nguy cơ, lợi ích; để người bệnh yên tâm và hợp tác làm xét nghiệm.
- Khai thác tiền sử bệnh và các triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng.
- Khám người bệnh xác định vị trí vùng cần thực hiện thủ thuật, màu sắc, số lượng, mật độ, kích thước, sự di động.

#### **5.6. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Ghi đầy đủ thông tin bệnh nhân, tên khoa phòng, chẩn đoán, thời gian lấy mẫu, kết quả khám lâm sàng và tiền sử của bệnh nhân.

#### **5.7. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

- Thời gian thực hiện kỹ thuật: 20 - 30 phút

#### **5.8. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:**

- Phòng thủ thuật hoặc phòng xét nghiệm tế bào học.

#### **5.9. Kiểm tra hồ sơ**

- Kiểm tra người bệnh: Đánh giá tính chính xác của người bệnh: đúng người bệnh, đúng chẩn đoán, đúng vị trí thực hiện kỹ thuật.
- Thực hiện bảng kiểm an toàn thủ thuật;

- Hướng dẫn bệnh nhân tư thế đảm bảo bộc lộ rõ vùng cần thực hiện thủ thuật và an toàn khi thực hiện. Bộc lộ vị trí cần thực hiện thủ thuật.

### **6. TIẾN HÀNH QUY TRÌNH KỸ THUẬT**

#### **6.1. Thực hiện thủ thuật lấy bệnh phẩm**

- Thủ thuật nên thực hiện sau các xét nghiệm chẩn đoán hình ảnh.
- Giải thích người bệnh về thủ thuật; kiểm tra kết quả chẩn đoán hình ảnh của bệnh nhân để đánh giá chính xác u.
- Hướng dẫn người bệnh nằm hoặc ngồi với tư thế phù hợp với vị trí yêu cầu thực hiện thủ thuật.
- Chuẩn bị dụng cụ thực hiện thủ thuật, chuẩn bị lam kính và/hoặc lọ đựng bệnh phẩm viết tên, tuổi, mã số của bệnh nhân. Sát khuẩn tay trước khi thực hiện thủ thuật.
- Bộc lộ vị trí cần chọc.
- Sát khuẩn vùng cần chọc, phủ sand lõ.
- (Có thể gây tê vùng da tại chỗ bằng lidocain bôi hoặc xịt ngoài da. Nếu người bệnh dị ứng thuốc tê có thể giải thích để không gây tê. Chờ 1 phút).
- Thực hiện thủ thuật: Cố định vị trí cần chọc bằng 2 ngón tay trái, tay phải cầm bơm tiêm có kim. Đưa kim tiêm chọc hút qua da vào ổ tổn thương. Hút dưới áp lực âm để dịch hoặc tế bào vào trong lòng kim. Rút nhanh kim qua da.
  - Có thể hút nhiều vị trí tổn thương nếu  $u > 1,5\text{cm}$ .
  - Sát trùng lại vị trí chọc.
  - Băng ép vết chọc.

## **6.2. Làm phiến đồ (Dàn bệnh phẩm lên lam kính) và cố định bệnh phẩm**

- Tháo kim ra khỏi bơm tiêm. Kéo pittông xuống để lấy không khí vào bơm tiêm tạo áp lực. Lắp kim vào bơm tiêm.
- Nhanh chóng bơm dịch trong kim và bơm tiêm ra các lam kính đã ghi sẵn thông tin người bệnh.
- Dùng một lam kính khác dàn bệnh phẩm trên các lam kính có bệnh phẩm để bệnh phẩm được dàn mỏng, đều. Có thể dàn bằng kim nếu bệnh phẩm ít.
- Để khô lam kính tự nhiên trong khoảng 10 phút. Có thể sử dụng tủ ấm hoặc máy sấy để làm khô bệnh phẩm nếu không khí có độ ẩm cao.
- Cố định lam kính bệnh phẩm bằng dung dịch cố định. Nên cố định ngay sau khô, nếu cố định kém tế bào thoái hoá và không đánh giá đúng tổn thương.
- Nếu có các xét nghiệm có thể bơm 1 phần bệnh phẩm vào lọ đựng bệnh phẩm có sẵn dung dịch bảo quản. Nắp lọ kín tránh tràn đồ.

## **6.3. Đánh giá bệnh phẩm về đại thể**

- Yêu cầu kết quả của lam kính chứa bệnh phẩm: Dàn đều, mỏng, ít máu.
- Lam kính bệnh phẩm không đạt:
  - + Quá nhiều hồng cầu: không đổi hướng mũi kim khi kim đã đâm vào mô để tránh chảy máu khi chọc hoặc thấy nhiều máu có thể chọc thêm 1 vị trí khác nếu  $u$  đủ lớn.
  - + Lam kính bệnh phẩm dàn quá dày hoặc kéo quá mạnh làm chòng chất hoặc nát tế bào: cần dàn nhẹ, đều tay và nên dàn luôn ngay khi rút kim.

+ Quá nghèo tế bào hoặc không lấy được tổn thương: Cần chọc đúng tổn thương, cố định tốt vùng chọc, hút bằng áp lực âm.

+ Dịch bị khô trong lồng kim hoặc trên phiến kính trước khi dàn: Nhanh chóng phết bệnh phẩm lên phiến kính và dàn ngay.

- Các trường hợp đánh giá chưa đạt có thể làm lại kĩ thuật ở một vị trí hoặc hướng khác.

#### **6.4. Kết thúc thủ thuật**

- Đánh giá tình trạng người bệnh sau thực hiện thủ thuật; dẫn người bệnh không để vùng thực hiện thủ thuật dính nước trong 24 giờ.

- Ghi đầy đủ các thông tin về bệnh phẩm trên phiếu chỉ định: số lượng u, kích thước u, tính chất u trên siêu âm, thời gian lấy mẫu, số lượng mẫu,...

- Kiểm tra lại thông tin bệnh nhân trên lam kính và/hoặc trên lọ đựng bệnh phẩm và phiếu chỉ định.

- Đóng gói lam kính và/hoặc lọ đựng bệnh phẩm theo tiêu chuẩn vận chuyển bệnh phẩm, gửi đến phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh – tế bào ngay trong ngày.

### **7. THEO DÕI VÀ XỬ TRÍ TAI BIẾN**

- Chảy máu tại vị trí chọc: băng ép cầm máu..

- Người bệnh choáng sau chọc: Đề phòng nhân nằm nghỉ và xử trí chống choáng.

- Nhiễm trùng tạo vị trí chọc: Chuyển bác sĩ lâm sàng khám và kê đơn chống viêm.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Đề cương tài liệu chuyên môn hướng dẫn quy trình kỹ thuật khám bệnh chữa bệnh; Bộ y tế Quyết định 3023/QĐ-BYT; 2023.

2. Sigmon DF, Fatima S. Fine Needle Aspiration. (2022). StatPearls Publishing.

3. Dey, P. (2022). The Basic Technique of Fine Needle Aspiration Cytology. In: Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-6616-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-19-6616-3_15).

## **2. CHỌC HÚT KIM NHỎ MỘT VỊ TRÍ TỔN THƯƠNG HOẶC U CỦA DA, DƯỚI DA VÀ CÁC CƠ QUAN CÓ VỊ TRÍ NÔNG DƯỚI HƯỚNG DẪN CỦA SIÊU ÂM**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả và hướng dẫn cách thực hiện lấy bệnh phẩm tế bào bằng kĩ thuật chọc hút kim nhỏ của các tổn thương hoặc các khối u da, dưới da hoặc các cơ quan ở vị trí nông (như tuyến vú, hạch, tuyến nước bọt, tuyến giáp,...); có hướng dẫn của các thiết bị chẩn đoán hình ảnh; nhằm lấy đúng vùng tổn thương, lấy được bệnh phẩm đủ và phù hợp cho xét nghiệm tế bào học cũng như các xét nghiệm khác (hoá tế bào, khối tế bào,...).

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Chọc hút tế bào bằng kim nhỏ (FNA- Fine Needle Aspiration) là kỹ thuật sử dụng kim tiêm, đưa kim qua da vào vùng tổn thương, hút tế bào theo phương pháp mao dẫn hoặc hút với áp lực âm (có gắn bơm tiêm) để các tế bào từ mô đi vào trong kim, bơm chất dịch lấy được trên lam kính và/hoặc vào dung dịch bảo quản phù hợp để phục vụ xét nghiệm chẩn đoán tế bào học cũng như các xét nghiệm khác.

Thực hiện lấy bệnh phẩm tế bào dưới hướng dẫn của siêu âm là kỹ thuật FNA kết hợp cùng siêu âm tại vị trí nghi ngờ nhằm xác định đúng tổn thương và hướng dẫn hướng đi của kim tiêm để nâng cao độ chính xác.

### **2. CHỈ ĐỊNH**

- Tổn thương u có thể sờ thấy bằng khám lâm sàng hoặc không sờ thấy rõ trên khám lâm sàng.

### **3. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

- Người bệnh có bệnh nặng toàn thân: suy tim, suy thận, suy hô hấp;
- Người bệnh có rối loạn đông máu;

### **4. THẬN TRỌNG**

- Thận trọng với người bệnh có tiền sử động kinh, cao huyết áp,...
- Thận trọng với các tổn thương đang trong giai đoạn viêm, đặc biệt trong viêm cấp hoặc viêm nhiễm nặng tại chỗ.

- Người bệnh quá mức lo lắng, không hợp tác.

- Các trường hợp tổn thương khu trú tại gan, đặc biệt là những tổn thương nghi ngờ ung thư.

### **5. CHUẨN BỊ**

#### **5.1. Người thực hiện**

- Nhân lực trực tiếp:
  - + Bác sĩ được hướng dẫn hoặc đào tạo kỹ thuật: 01
  - + Bác sĩ phụ: 01

- + Kỹ thuật y: 01
- Nhân lực hỗ trợ:
- + Nhân viên hành chính;
- + Hộ lý, nhân viên vệ sinh.

### **5.2. Thuốc, hoá chất**

- Thuốc gây tê tại chỗ;
- Cồn 70 độ sát khuẩn hoặc dung dịch cồn iod. Có thể sử dụng bông có thấm sẵn cồn sát khuẩn (nếu có);
- Dung dịch cố định bệnh phẩm: cồn tuyệt đối,...
- Gel sử dụng trong siêu âm;
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh;
- Dung dịch rửa tay thường quy;
- Nước cất;
- Các thuốc trong hộp chống sốc.

### **5.3. Vật tư, dụng cụ**

#### **Vật tư tiêu hao:**

- Kim chọc hút chuyên dụng;
- Bơm tiêm 10ml hoặc 20ml;
- Lam kính sạch, một đầu mài mờ để ghi thông tin người bệnh;
- Lọ chứa dung dịch cố định để chứa bệnh phẩm;
- Bông khô tiệt trùng;
- Băng dính y tế;
- Găng tay sạch, khẩu trang, mũ y tế;
- Giấy/khăn lau tay;
- Giấy A4; sổ bàn giao bệnh phẩm.
- Bút dạ dầu, bút chì mềm, bút bi;

#### **Dụng cụ:**

- Dụng cụ gắn bơm tiêm;
- Pipet nhựa;
- Hộp inox đựng bông cồn, bông khô có nắp đậy;
- Ống inox đựng phanh, kéo;
- Panh thẳng không máu
- Kéo inox;
- 2 Khay quả đậu đựng dụng cụ, vật tư sạch và vật tư đã sử dụng;

- Hộp đựng bông cồn sát trùng và hộp đựng bông khô tiệt trùng;
- Hộp băng thép không rỉ đựng bơm, kim tiêm sạch;
- Hộp chống sốc;
- Khay/giá để tiêu bản;
- Hộp vận chuyển bệnh phẩm;
- Tấm phủ vô khuẩn;
- Túi rác thải y tế; túi rác thải thông thường;
- Hộp đựng rác thải sắc nhọn;
- Thùng đựng rác thải y tế (màu vàng) và thông thường (màu xanh).

#### **5.4. Trang thiết bị**

- Ống nghe, máy đo huyết áp;
- Máy siêu âm có đầu dò phù hợp;
- Giường làm thủ thuật.
- Xe tiêm 2 tầng đựng dụng cụ.
- Kính hiển vi quang học;
- Máy tính, máy in; máy quét mã vạch.

#### **5.5. Chuẩn bị người bệnh**

- Giải thích cho người bệnh hoặc người nhà người bệnh về quy trình thực hiện, mục đích, nguy cơ, lợi ích; để người bệnh yên tâm và hợp tác làm xét nghiệm.
- Khai thác tiền sử bệnh và các triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng.

#### **5.6. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Ghi đầy đủ thông tin bệnh nhân, tên khoa phòng, chẩn đoán, thời gian lấy mẫu, kết quả khám lâm sàng và tiền sử của bệnh nhân.

#### **5.7. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

- Thời gian thực hiện kỹ thuật: 30 phút

#### **5.8. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:**

- Phòng thủ thuật hoặc phòng xét nghiệm tế bào học.

#### **5.9. Kiểm tra hồ sơ**

- Kiểm tra người bệnh: Đánh giá tính chính xác của người bệnh: đúng người bệnh, đúng chẩn đoán, đúng vị trí thực hiện kỹ thuật.

- Thực hiện bảng kiểm an toàn thủ thuật;

### **6. TIẾN HÀNH QUY TRÌNH KỸ THUẬT**

#### **6.1. Siêu âm đánh giá lại tổn thương**

- Giải thích cho bệnh nhân về thủ thuật.
- Người bệnh nằm theo đúng tư thế có thể bộc lộ rõ vùng tổn thương.
- Người bệnh quá kích thích, không nằm yên: cần cho thuốc an thần...
- Siêu âm đánh giá vị trí tổn thương, mật độ, tính chất,...
- Đánh dấu vị trí tại da.
- Sát trùng da sau đó phủ khăn phủ vô khuẩn có lỗ.

## 6.2. Lấy bệnh phẩm

- Chuẩn bị dụng cụ chọc, lam kính viết tên, tuổi, mã số của bệnh nhân.
- Đặt đầu dò tìm vị trí chọc kim thuận lợi nhất: tổn thương nằm giữa đường dẫn, đường đi không xuyên qua mạch máu, đường đi ngắn nhất.
  - Sát khuẩn đầu dò, bôi đủ gel lên đầu dò, bọc đầu dò bằng găng vô khuẩn.
  - Sát khuẩn lại vùng da vị trí chọc.
  - Gây tê tại chỗ.
  - Nhân viên phụ cầm đầu dò vị trí nghiêng, cố định tại vị trí có thể nhìn rõ u.
  - Đưa kim tiêm chọc hút vào ổ tổn thương theo đúng đường đã định trước, quan sát trên màn hình siêu âm điều chỉnh đầu kim đúng tổn thương. Hút dưới áp lực âm để dịch chọc chui vào trong lòng kim. Rút nhanh kim qua da.
    - Dùng áp lực của bơm tiêm, đưa toàn bộ bệnh phẩm ra khỏi bơm kim tiêm lên lam kính và/hoặc cho vào lọ chứa dung dịch cố định bệnh phẩm tế bào có sẵn.
      - Nếu lấy bệnh phẩm lên lam kính cần dàn mỏng ngay, lực dàn vừa phải. Có thể dùng kim dàn bệnh phẩm hoặc dùng 2 lam kính dàn đều bệnh phẩm.
      - Có thể hút nhiều vị trí tổn thương nếu  $u > 1,5\text{cm}$ .
      - Sát trùng lại và băng vị trí chọc để tránh chảy máu.

## 6.3. Đánh giá bệnh phẩm về đại thể

- Yêu cầu kết quả của lam kính chứa bệnh phẩm: Dàn đều, mỏng, ít máu.
- Lam kính bệnh phẩm không đạt:
  - + Quá nhiều hòng cầu: không đổi hướng mũi kim khi kim đã đâm vào mô để tránh chảy máu khi chọc hoặc thấy nhiều máu có thể chọc thêm 1 vị trí khác nếu  $u$  đủ lớn.
    - + Lam kính bệnh phẩm dàn quá dày hoặc kéo quá mạnh làm chong chát hoặc nát tế bào: cần dàn nhẹ, đều tay và nên dàn luôn ngay khi rút kim.
    - + Quá nghèo tế bào hoặc không lấy được tổn thương: Cần chọc đúng tổn thương, cố định tốt vùng chọc, hút bằng áp lực âm.
      - + Dịch bị khô trong lòng kim hoặc trên phiến kính trước khi dàn: Nhanh chóng phết bệnh phẩm lên phiến kính và dàn ngay.

- Các trường hợp đánh giá chưa đạt có thể làm lại kỹ thuật ở một vị trí hoặc hướng khác.

#### **6.4. Kết thúc kỹ thuật**

- Đánh giá tình trạng người bệnh sau thực hiện thủ thuật; dặn người bệnh nằm tại giường nếu cần.

- Ghi đầy đủ các thông tin về bệnh phẩm trên phiếu chỉ định: số lượng u, kích thước u, tính chất u trên siêu âm, thời gian lấy mẫu, số lượng mẫu,...

- Kiểm tra lại thông tin bệnh nhân trên lam kính và/hoặc trên lọ đựng bệnh phẩm. Nắp lọ kín tránh tràn đổ.

- Để khô lam kính tự nhiên trong khoảng 10 phút. Có thể sử dụng tủ ấm hoặc máy sấy để làm khô bệnh phẩm nếu không khí có độ ẩm cao.

- Cố định lam kính bệnh phẩm bằng dung dịch cố định. Nên cố định ngay sau khô, nếu cố định kém té bào thoái hoá và không đánh giá đúng tổn thương.

- Đóng gói lam kính và/hoặc lọ đựng bệnh phẩm theo tiêu chuẩn vận chuyển bệnh phẩm, gửi đến phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh – té bào ngay trong ngày.

### **7. THEO DÕI VÀ XỬ TRÍ TAI BIẾN**

- Chảy máu tại vị trí chọc hoặc trong ổ bụng: chuyển ngoại khoa xử trí.

- Rỉ mật, dịch tiêu hoá vào ổ bụng: chuyển ngoại khoa để phẫu thuật.

- Tràn khí màng phổi: chuyển cấp cứu xử trí.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Đề cương tài liệu chuyên môn hướng dẫn quy trình kỹ thuật khám bệnh chữa bệnh; Bộ y tế Quyết định 3023/QĐ-BYT; 2023.

2. Sigmon DF, Fatima S. Fine Needle Aspiration. (2022). StatPearls Publishing.

3. Dey, P. (2022). The Basic Technique of Fine Needle Aspiration Cytology. In: Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-6616-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-19-6616-3_15).

### **3. CHỌC HÚT KIM NHỎ CÁC TỔN THƯƠNG HOẶC U Ở VỊ TRÍ SÂU (Ö BỤNG, TRUNG THẤT,...) DƯỚI HƯỚNG DẪN CỦA SIÊU ÂM**

#### **1. ĐẠI CƯƠNG**

##### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả và hướng dẫn cách thực hiện lấy bệnh phẩm tế bào các bộ phận ở vị trí sâu (gan, lách, hạch trung thất, tuy, hạch ổ bụng,...) dưới hướng dẫn của siêu âm; để lấy đúng vùng tổn thương, lấy được bệnh phẩm đủ và phù hợp cho xét nghiệm tế bào học cũng như các xét nghiệm khác.

##### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Chọc hút tế bào bằng kim nhỏ (FNA- Fine Needle Aspiration) là kỹ thuật sử dụng kim tiêm, đưa kim qua da vào vùng tổn thương, hút tế bào theo phương pháp mao dẫn hoặc hút với áp lực âm (có gắn bơm tiêm) để các tế bào từ mô đi vào trong kim, bơm chất dịch lấy được trên lam kính và/hoặc vào dung dịch bảo quản phù hợp.

Các mô nằm sâu không thể kiểm tra thấy trên lâm sàng, dễ chảy máu, vì vậy cần quan sát trên siêu âm để xác định chính xác vị trí tổn thương, hướng dẫn hướng đi của kim tiêm nhằm lấy chính xác tổn thương. Bệnh phẩm của chọc tế bào có thể sử dụng để chẩn đoán tế bào học và các xét nghiệm khác.

#### **2. CHỈ ĐỊNH**

- Các trường hợp tổn thương khu trú tại các vị trí sâu, đặc biệt là những tổn thương nghi ngờ ác tính.

#### **3. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

- Người bệnh có bệnh nặng toàn thân: suy tim, suy thận, suy hô hấp;
- Người bệnh có rối loạn đông máu.

#### **4. THẬN TRỌNG**

- Thận trọng với người bệnh có tiền sử động kinh, cao huyết áp, cỗ trưởng,...
- Người bệnh quá mức lo lắng, không hợp tác.

#### **5. CHUẨN BỊ**

##### **5.1. Người thực hiện**

- Nhân lực trực tiếp:
  - + Bác sĩ được hướng dẫn hoặc đào tạo kỹ thuật: 01
  - + Bác sĩ phụ: 01
  - + Kỹ thuật y: 01
  - + Điều dưỡng: 01
- Nhân lực hỗ trợ:
  - + Nhân viên hành chính;
  - + Hộ lý, nhân viên vệ sinh.

## 5.2. Thuốc, hoá chất

- Thuốc gây tê tại chỗ;
- Cồn 70 độ sát khuẩn hoặc dung dịch cồn iod. Có thể sử dụng bông có thấm sẵn cồn sát khuẩn (nếu có);
- Dung dịch có định bệnh phẩm: cồn tuyệt đối,...
- Gel sử dụng trong siêu âm;
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh;
- Dung dịch rửa tay thường quy;
- Nước cát;
- Các thuốc trong hộp chống sốc.

## 5.3. Vật tư, dụng cụ

### Vật tư tiêu hao:

- Kim chọc hút chuyên dụng;
- Bơm tiêm 10ml hoặc 20ml;
- Lam kính sạch, một đầu mài mờ để ghi thông tin người bệnh;
- Lọ chứa dung dịch có định để chứa bệnh phẩm;
- Bông khô tiệt trùng;
- Băng dính y tế;
- Găng tay sạch, khẩu trang, mũ y tế;
- Giấy/khăn lau tay;
- Giấy A4; sổ bàn giao bệnh phẩm.
- Bút dạ dầu, bút chì mềm, bút bi;

### Dụng cụ:

- Dụng cụ gắn bơm tiêm;
- Pipet nhựa;
- Hộp inox đựng bông cồn, bông khô có nắp đậy;
- Ống inox đựng phanh, kéo;
- Panh thẳng không máu
- Kéo inox;
- 2 Khay quả đậu đựng dụng cụ, vật tư sạch và vật tư đã sử dụng;
- Hộp đựng bông cồn sát trùng và hộp đựng bông khô tiệt trùng;
- Hộp băng thép không rỉ đựng bơm, kim tiêm sạch;
- Hộp chống sốc;
- Khay/giá để tiêu bản;

- Hộp vận chuyển bệnh phẩm.
- Tấm phủ vô khuẩn;
- Túi rác thải y tế; túi rác thải thông thường;
- Hộp đựng rác thải sắc nhọn;
- Thùng đựng rác thải y tế (màu vàng) và thông thường (màu xanh).

#### **5.4. Trang thiết bị**

- Ông nghe, máy đo huyết áp;
- Máy siêu âm có đầu dò phù hợp;
- Giường làm thủ thuật.
- Xe tiêm 2 tầng đựng dụng cụ.
- Kính hiển vi quang học;
- Máy tính, máy in; máy quét mã vạch.

#### **5.5. Chuẩn bị người bệnh**

- Giải thích cho người bệnh hoặc người nhà người bệnh về quy trình thực hiện, mục đích, nguy cơ, lợi ích; để người bệnh yên tâm và hợp tác làm xét nghiệm.
- Khai thác tiền sử bệnh và các triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng.

#### **5.6. Hồ sơ bệnh án**

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: Ghi đầy đủ thông tin bệnh nhân, tên khoa phòng, chẩn đoán, thời gian lấy mẫu, kết quả khám lâm sàng và tiền sử của bệnh nhân.

- Phim cắt lớp vi tính, cộng hưởng từ nếu có.

#### **5.7. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

- Thời gian thực hiện kỹ thuật: 30 phút

#### **5.8. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:**

- Phòng thủ thuật hoặc phòng xét nghiệm tế bào học.

#### **5.9. Kiểm tra hồ sơ**

- Kiểm tra người bệnh: Đánh giá tính chính xác của người bệnh: đúng người bệnh, đúng chẩn đoán, đúng vị trí thực hiện kỹ thuật.

- Thực hiện bảng kiểm an toàn thủ thuật;

### **6. TIẾN HÀNH QUY TRÌNH KỸ THUẬT**

#### **6.1. Siêu âm đánh giá lại tổn thương và chọn đường vào**

- Tại phòng can thiệp: người bệnh nằm, đặt đường truyền tĩnh mạch, lắp máy theo dõi nhịp thở, mạch, huyết áp, điện tâm đồ, SpO2.
- Người bệnh quá kích thích, không nằm yên: cần cho thuốc an thần...
- Siêu âm đánh giá vị trí tổn thương, mật độ, tính chất,...

- Đánh dấu vị trí tại da.
- Sát khuẩn rộng vùng da bằng dung dịch sát khuẩn tiêu chuẩn và phủ sand lõi.
- Chuẩn bị dụng cụ chọc, lam kính viết tên, tuổi, mã số của bệnh nhân.
- Tìm vị trí chọc kim thuận lợi nhất: tốn thương nằm giữa đường dẫn, đường đi không xuyên qua mạch máu hoặc ống tiêu hoá, đường đi ngắn nhất.
- Mỗi cơ quan khuyến cáo vị trí khác nhau: Với lách, thường sử dụng ở khoảng gian sườn 10 đến 12 trên đường nách giữa để tránh chọc vào màng phổi.
- Sát khuẩn đầu dò, bôi đủ gel lên đầu dò, bọc đầu dò bằng găng vô khuẩn.
- Sát khuẩn lại vùng da vị trí chọc.
- Gây tê tại chỗ: Gây tê theo hướng vào khói u từ da đến phúc mạc, gây tê dưới bao lách. Chờ 1 phút cho thuốc tê có hiệu lực.
  - Nhân viên phụ cầm đầu dò vị trí nghiêng, cố định tại vị trí có thể nhìn rõ u.
  - Đưa kim tiêm chọc hút vào ổ tốn thương theo đúng đường đã định trước, quan sát trên màn hình siêu âm điều chỉnh đầu kim đúng tốn thương. Hút dưới áp lực âm để dịch chọc chui vào trong lòng kim. Rút nhanh kim qua da.
    - Dùng áp lực của bom tiêm, đưa toàn bộ bệnh phẩm ra khỏi bom kim tiêm lên lam kính và/hoặc cho vào lọ chứa dung dịch cố định bệnh phẩm té bào có sẵn.
    - Nếu lấy bệnh phẩm lên lam kính cần dàn mỏng ngay, lực dàn vừa phải. Có thể dùng kim dàn bệnh phẩm hoặc dùng 2 lam kính dàn đều bệnh phẩm.
      - Lấy thêm bệnh phẩm làm xét nghiệm té bào theo quy trình sinh thiết bệnh phẩm làm xét nghiệm giải phẫu bệnh.
      - Sát trùng lại và băng vị trí chọc để tránh chảy máu.

### **6.3. Đánh giá bệnh phẩm về đại thể**

- Yêu cầu kết quả của lam kính chứa bệnh phẩm: Dàn đều, mỏng, ít máu.
- Lam kính bệnh phẩm không đạt:
  - + Quá nhiều hòng cầu: không đổi hướng mũi kim khi kim đã đâm vào mô để tránh chảy máu khi chọc hoặc thấy nhiều máu có thể chọc thêm 1 vị trí khác nếu u đủ lớn.
    - + Lam kính bệnh phẩm dàn quá dày hoặc kéo quá mạnh làm chồng chất hoặc nát té bào: cần dàn nhẹ, đều tay và nên dàn luôn ngay khi rút kim.
    - + Quá nghèo té bào hoặc không lấy được tốn thương: Cần chọc đúng tốn thương, cố định tốt vùng chọc, hút bằng áp lực âm.
    - + Dịch bị khô trong lòng kim hoặc trên phiến kính trước khi dàn: Nhanh chóng phết bệnh phẩm lên phiến kính và dàn ngay.
  - Các trường hợp đánh giá chưa đạt có thể làm lại kỹ thuật ở một vị trí hoặc hướng khác.

### **6.4. Kết thúc kỹ thuật**

- Đánh giá tình trạng người bệnh sau thực hiện thủ thuật; dặn người bệnh nằm tại giường trong 6 giờ, theo dõi mạch, huyết áp và thành bụng trong 24 giờ.

- Ghi đầy đủ các thông tin về bệnh phẩm trên phiếu chỉ định: số lượng u, kích thước u, tính chất u trên siêu âm, thời gian lấy mẫu, số lượng mẫu,...

- Kiểm tra lại thông tin bệnh nhân trên lam kính và/hoặc trên lọ đựng bệnh phẩm. Nắp lọ kín tránh tràn đổ.

- Để khô lam kính tự nhiên trong khoảng 10 phút. Có thể sử dụng tủ ấm hoặc máy sấy để làm khô bệnh phẩm nếu không khí có độ ẩm cao.

- Cố định lam kính bệnh phẩm bằng dung dịch cố định. Nên cố định ngay sau khô, nếu cố định kém tế bào thoái hoá và không đánh giá đúng tổn thương.

- Đóng gói lam kính và/hoặc lọ đựng bệnh phẩm theo tiêu chuẩn vận chuyển bệnh phẩm, gửi đến phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh – tế bào ngay trong ngày.

## **7. THEO DÕI VÀ XỬ TRÍ TAI BIÊN**

- Chảy máu tại vị trí chọc hoặc trong ổ bụng: chuyển ngoại khoa xử trí.

- Tràn khí màng phổi: chuyển cấp cứu xử trí.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Đề cương tài liệu chuyên môn hướng dẫn quy trình kỹ thuật khám bệnh chữa bệnh; Bộ y tế Quyết định 3023/QĐ-BYT; 2023.

2. Sigmon DF, Fatima S. Fine Needle Aspiration. (2022). StatPearls Publishing.

3. Dey, P. (2022). The Basic Technique of Fine Needle Aspiration Cytology. In: Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-6616-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-981-19-6616-3_15).

## **4. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN TẾ BÀO HỌC CÁC BỆNH PHẨM CHỌC HÚT KIM NHỎ, ÁP LAM**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện nhuộm và chẩn đoán tế bào học trên bệnh phẩm tế bào chọc hút kim nhỏ hoặc áp lam.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Bệnh phẩm tế bào của quá trình chọc tế bào hoặc bệnh phẩm tế bào bong, tế bào lấy từ cạo hoặc áp lam tổn thương được dàn trên lam kính, sau đó được nhuộm bằng các phương pháp đặc biệt để đánh giá hình thái tế bào và chẩn đoán tế bào học.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý: 01

#### **2.2. Vật tư, hóa chất**

- Găng tay vô trùng, khẩu trang.
- Pipet nhựa.
- Lam kính.
- Giá đựng lam kính.
- Bút chì mềm ghi mã số người bệnh, vị trí chọc hút.
- Các dụng cụ để nhuộm: khay, cốc pha thuốc nhuộm, ống hút.
- Phiếu xét nghiệm ghi rõ họ và tên người bệnh, vị trí lấy dịch, số lượng dịch, màu sắc, thời gian lấy, người thực hiện kỹ thuật, số lượng phiến đồ.
- Dung dịch cố định phù hợp.
- Dung dịch nhuộm: Phẩm nhuộm phiến đồ (Giemsa/Diff - Quick/ Hematoxylin Eosin/ Papanicolaou/ Ziehl - Neelsen...).
- Các dung dịch sát khuẩn.
- Nước cất, nước sạch để rửa thuốc nhuộm trên lam kính.

#### **2.3. Trang thiết bị**

- Bàn sấy tiêu bản.
- Kính hiển vi quang học (nên có gắn camera chụp ảnh vi thể);
- Máy tính, máy in; đầu quét mã vạch;
- Tủ lưu tiêu bản; tủ lưu hồ sơ;
- Thùng rác đựng rác thải y tế và rác thải thường.

## 2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

**Lấy bệnh phẩm:** Việc lấy mẫu được thực hiện theo Quy trình chọc hút kim nhỏ (FNA) (có thể có hoặc không dưới hướng dẫn của siêu âm).

**Yêu cầu:** bệnh phẩm hút ra được dàn lên lam kính, để khô tự nhiên, sau đó cố định phiến đồ theo đúng hướng dẫn.

## 2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:** 30 phút

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:** Phòng xét nghiệm đủ tiêu chuẩn.

## 3. AN TOÀN

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn Phòng xét nghiệm.

## 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 4.1. Các bước thực hiện

#### Bước 1: Cố định phiến đồ:

- Cố định bằng dung dịch phù hợp lên toàn bộ bề mặt lam kính có chứa bệnh phẩm trước khi nhuộm (dung dịch cố định tùy phương pháp nhuộm).

#### Bước 2: Nhuộm các phiến đồ

- Theo một trong các phương pháp nhuộm: Giemsa, Papanicolaou, Diff - Quick hay May Grünwald Giemsa, Ziehl – Neelsen hoặc Hematoxylin Eosin (tham khảo các phương pháp nhuộm tại Phần III).

### 4.2. Nhận định kết quả

Phiến đồ sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ Giải phẫu bệnh Tế bào, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh:

- + Đánh giá loại tế bào, hình thái, cấu trúc, đánh giá nền, mô đệm

- + Phân loại tổn thương: viêm, tổn thương u lành, u ác tính, phân típ,...

- + Chẩn đoán tế bào theo các hệ thống phân loại được khuyến cáo (hệ thống phân loại Bethesda, ....)

- + Phiên giải kết quả cần kết hợp với các thông tin lâm sàng, cận lâm sàng bác sĩ lâm sàng cung cấp hoặc xem bệnh án. Các kết quả có giá trị cảnh báo (Ví dụ: nghi ngờ ác tính) cần được ghi vào phiếu kết quả xét nghiệm hoặc báo cho bác sĩ khám, điều trị.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định cơ sở.

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- Phiên đồ bị mất tế bào trong quá trình cố định: cần để khô sau khi dàn 10-30 phút trước khi cố định bằng cồn.
- Bong bệnh phẩm: rửa nhẹ nhàng, nên dùng lam kính có phủ chất chống bong
- Các tế bào dày, chòng chất: lấy lượng dịch vừa đủ, dàn đều tay
- Tế bào thoái hóa, tan rã, không nhận định được hình thái nhân và bào tương: dịch lấy ra khỏi cơ thể phải làm xét nghiệm ngay.
- Các tế bào bắt màu quá kém: cần cố định tốt và nhuộm đủ thời gian, thuốc nhuộm tốt.
  - Nhuộm quá đậm: tẩy bớt thuốc nhuộm bằng cồn tuyệt đối.
  - Các tế bào bị kéo dài hoặc bị dập nát: cần thực hiện đúng kỹ thuật.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## 5. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN TẾ BÀO HỌC DỊCH CƠ THỂ

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện xét nghiệm và chẩn đoán tế bào học các loại mẫu dịch lấy từ cơ thể.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Trong các loại dịch của cơ thể như dịch phế quản, dịch màng phổi, dịch khớp, dịch ổ bụng, nước tiểu... có thể có các tế bào bong ra, tế bào u từ các tổn thương ở đó. Vì vậy, cần lấy được các tế bào này và nhận định loại tế bào, hình thái, số lượng tế bào trong dịch, sự sắp xếp tế bào, nền phiến đồ dưới kính hiển vi quang học để chẩn đoán bệnh.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý: 01

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

- Găng tay vô trùng, khẩu trang.
- Ống hút tự động.
- Pipet nhựa
- Lọ đựng dịch ly tâm
- Lam kính sạch, một đầu mài mờ.
- Giá để đựng lam kính đã dàn bệnh phẩm.
- Bút chì mềm ghi mã số người bệnh, vị trí chọc hút.
- Các dụng cụ để nhuộm: khay, giá, cốc pha thuốc nhuộm, ống hút.
- Phiếu xét nghiệm ghi rõ họ và tên người bệnh, vị trí lấy dịch, số lượng dịch, màu sắc, thời gian lấy, người thực hiện kỹ thuật, số lượng phiến đồ.
- Dung dịch cố định phù hợp
- Dung dịch nhuộm: Phẩm nhuộm phiến đồ (Giemsa/Diff - Quick/ Hematoxylin Eosin/ Papanicolaou/ Ziehl - Neelsen...).
- Các dung dịch sát khuẩn.

#### 2.3. Trang thiết bị

- Máy ly tâm;
- Bàn sấy tiêu bản;
- Kính hiển vi quang học;

- Máy tính, máy in; đầu quét mã vạch;
- Tủ lưu tiêu bản; tủ lưu hồ sơ;
- Thùng rác đựng rác thải y tế và rác thải thường.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Lấy bệnh phẩm: Việc lấy mẫu được thực hiện bởi các khoa lâm sàng và gửi bệnh phẩm về Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh.

Yêu cầu: dịch hút ra phải cho vào các lọ đựng bệnh phẩm sạch không có chất bảo quản, có đầy đủ thông tin về bệnh nhân trên nhãn dán.

Bệnh phẩm được vận chuyển ngay đến phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh hoặc bảo quản trong nhiệt độ 2-8°C nếu chưa vận chuyển ngay.

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:** 1 giờ

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn Phòng xét nghiệm

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện**

##### **Bước 1: Tập trung tết bào**

- Ly tâm dịch bằng máy ly tâm.
- Gạn bỏ phần trong bên trên, lấy phần lắng cặn tết bào bên dưới (1-2ml)

##### **Bước 2: Làm phiến đồ:**

- Dùng pipet hút dịch cặn dàn đều lên các lam kính đã ghi sẵn mã người bệnh.
- Dùng một lam kính sạch khác đặt lên trên cặn, dàn nhẹ, đều bệnh phẩm giữa hai lam kính để bệnh phẩm được dàn mỏng, đều

##### **Bước 3: Cố định phiến đồ:**

- Cố định bằng dung dịch phù hợp lên toàn bộ bề mặt lam kính có chứa bệnh phẩm trước khi nhuộm (dung dịch cố định tùy phương pháp nhuộm).

##### **Bước 4 Nhuộm các phiến đồ**

- Theo một trong các phương pháp nhuộm: Giemsa, Papanicolaou, Diff -

Quick hay May Grünwanld Giemsa, Ziehl – Neelsen hoặc Hematoxylin Eosin như đã nêu ở mục nhuộm phiến đồ tế bào học.

- Lưu ý: Đối với các bệnh phẩm đã được các khoa lâm sàng chọc hút và áp nhuộm phết lam kính rồi thì cần được gửi ngay lên Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh để thực hiện xét nghiệm, và tiến hành quy trình xét nghiệm từ bước cố định phiến đồ.

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Phiến đồ sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh:

- + Đánh giá loại tế bào, hình thái, cấu trúc, đánh giá nền, mô đệm
- + Phân loại tổn thương: viêm, tổn thương u lành, u ác tính, phân típ,...
- + Chẩn đoán tế bào theo các hệ thống phân loại được khuyến cáo (hệ thống phân loại Bethesda, ....)
- + Phiên giải kết quả cần kết hợp với các thông tin lâm sàng, cận lâm sàng bác sĩ lâm sàng cung cấp hoặc xem bệnh án. Các kết quả có giá trị cảnh báo (Ví dụ: nghi ngờ ác tính) cần được ghi vào phiếu kết quả xét nghiệm hoặc báo cho bác sĩ khám, điều trị.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- Phiến đồ bị mất té bào trong quá trình cố định: cần để khô sau khi dàn 10-30 phút trước khi cố định bằng cồn tuyệt đối.

- Bong bệnh phẩm: rửa nhẹ nhàng, nên dùng lam kính có phủ chất chống bong
- Các tế bào dày, chồng chất: lấy lượng dịch vừa đủ, dàn đều tay
- Tế bào thoái hóa, tan rã, không nhận định được hình thái nhân và bào tương: dịch lấy ra khỏi cơ thể phải làm xét nghiệm ngay.
- Các tế bào bắt màu quá kém: cần cố định tốt và nhuộm đủ thời gian.
- Nhuộm quá đậm: tẩy bớt thuốc nhuộm bằng cồn tuyệt đối.
- Các tế bào bị kéo dài hoặc bị dập nát: cần thực hiện đúng kỹ thuật.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.
3. Freida Carson: Histotechnoloy, 3<sup>rd</sup> editon, 2017

## 6. XÉT NGHIỆM TẾ BÀO HỌC KẾT MẶC, GIÁC MẶC BẰNG PHƯƠNG PHÁP ÁP (Impression Cytology – IC)

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm tế bào học kết mạc, giác mạc bằng phương pháp áp (test áp) nhằm đánh giá hình thái của một vài lớp tế bào bề mặt của kết mạc/giác mạc; được chỉ định để chẩn đoán một số bệnh ở bề mặt nhãn cầu như: hội chứng khô mắt, viêm kết mạc vùng rìa, thiếu tế bào nguồn vùng rìa, tổn thương hắc tố ở kết mạc, u biểu mô kết giác mạc,...

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật test áp dùng giấy lọc cellulose acetate đặt lên bề mặt nhãn cầu để lấy khoảng 2-3 lớp tế bào bề mặt của biểu mô kết – giác mạc; nếu muốn lấy được các lớp tế bào sâu hơn thì áp lại tại cùng một vị trí tổn thương.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ
- Kỹ thuật Y, Điều dưỡng

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

- Bông hấp tiệt trùng;
- Panh giác mạc và thia nạo (Curette) đã hấp tiệt trùng;
- Giấy lọc cellulose acetate kích thước lỗ từ 0,22 µm - 0,44µm;
- Lam kính sạch một đầu mài mờ, bút viết kính, giá cắm lam;
- Đèn cồn;
- Pipet nhựa;
- Găng tay sạch, mũ, khẩu trang;
- Hộp đựng bông cắt nhỏ vô trùng, hộp đựng dụng cụ lấy bệnh phẩm bằng inox;
- Các dung dịch sát khuẩn;
- Hộp đựng dụng cụ sắc nhọn;
- Cốc pha thuốc nhuộm;
- Thuốc nhỏ mắt gây tê bề mặt nhãn cầu (Alcaine/dicain,...);
- Nước muối sinh lý 0,9% vô trùng/dung dịch thuốc nhỏ mắt sát khuẩn.;
- Dung dịch nhuộm: Phẩm nhuộm phiến đồ (Hematoxylin Eosin/Giemsa/Diff - Quick/ Papanicolaou/Ziehl – Neelsen,...);
- Dung dịch cố định phù hợp (Ví dụ: cồn etylic, axit axetic, formol,...);
- Dầu soi kính: điều kiện bảo quản nhiệt độ phòng.

#### 2.3. Trang thiết bị

- Giường lấy bệnh phẩm, đèn soi;
- Bàn để dụng cụ, ghế ngồi cho Bác sĩ và kỹ thuật viên;
- Bàn có mặt phẳng rộng để đặt kính hiển vi;
- Tủ bảo quản hóa chất sinh phẩm;
- Tủ âm 56°C;
- Kính hiển vi quang học;
- Sổ ghi kết quả, hộp thuốc chống sốc, ống nghe, máy đo huyết áp;
- Máy tính, máy in; đầu quét mã vạch;
- Tủ lưu tiêu bản; tủ lưu hồ sơ;
- Thùng đựng rác thải y tế, thùng đựng rác thải thông thường.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Chuẩn bị người bệnh:

- + Người bệnh được giải thích về quy trình thực hiện, mục đích, nguy cơ, lợi ích để người bệnh yên tâm và hợp tác làm xét nghiệm.
- + Khai thác tiền sử người bệnh có yếu tố dị ứng.
- + Hướng dẫn người bệnh phối hợp để lấy mẫu theo đúng yêu cầu.
- + Người bệnh ở tư thế thoải mái, phù hợp với cách lấy bệnh phẩm.
- Loại mẫu bệnh phẩm: Các tế bào bong ở một vài lớp tế bào bề mặt của biểu mô kết mạc và/hoặc giác mạc.
  - Dụng cụ lấy mẫu, chứa mẫu, bảo quản: Panh giác mạc và thia nạo (Curette), Giấy lọc cellulose acetate kích thước lỗ từ 0,22 µm - 0,44µm, lam, kính.
  - Điều kiện bảo quản và vận chuyển mẫu bệnh phẩm: Bảo quản, vận chuyển mẫu ở nhiệt độ phòng.
  - Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: có các tế bào của các lớp bề mặt nhẵn cầu tại vùng lấy mẫu dính vào Giấy lọc cellulose acetate.

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ các mục: họ tên, tuổi, số giường (đối với người bệnh đang điều trị nội trú), khoa, chẩn đoán, vị trí lấy bệnh phẩm, số lượng,...
- Kiểm tra người bệnh: Đúng người bệnh, đúng chỉ định, đúng mắt cần làm xét nghiệm

#### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 45 – 60 phút**

#### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật.**

Khoa Xét nghiệm hoặc Khoa Giải phẫu bệnh – tế bào bệnh học (bước lấy bệnh phẩm có thể lấy ở khoa lâm sàng).

### **3. AN TOÀN**

- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình về an toàn xét nghiệm.

- Tất cả các mẫu bệnh phẩm được xem như là nguồn nhiễm

## 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Tra thuốc gây tê bì mặt 1-2 lần, mỗi lần 1-2 giọt cách nhau khoảng 2 phút vào kết mạc cùng đồ dưới của mắt cần lấy bệnh phẩm.

4.1.2. Đặt vành mi hoặc dùng ngón tay cái và ngón tay trỏ vành mắt của người bệnh.

4.1.3. Thẩm nhẹ phần thuốc gây tê và nước mắt còn thừa.

4.1.4. Dùng mảnh giấy lọc Cellulose acetate đã cắt sẵn theo kích thước phù hợp đặt lên bì mặt vùng tổn thương ở kết mạc hoặc giác mạc và dùng đầu của curette ấn nhẹ lên mảnh giấy, giữ như vậy trong khoảng từ 5-10 giây.

4.1.5. Dùng panh giác mạc nhẹ nhàng nhắc mảnh giấy ra khỏi bì mặt kết - giác mạc.

4.1.6. Cố định bệnh phẩm trong dung dịch cố định (cồn etylic 95<sup>0</sup> hoặc hỗn hợp axit axetic, formol 37% và cồn etylic theo tỷ lệ 1:1:20,...).

4.1.7. Nhuộm tiêu bản bằng phương pháp Hematoxylin-Eosin hoặc Giemsa hoặc PAS hoặc Papanicolaou,... (đôi khi phải phối hợp nhuộm nhiều phương pháp).

### 4.2. Nhận định kết quả

- Nhận định kết quả trên kính hiển vi quang học
- + Các phiến đồ giàu tế bào, đều, các tế bào không chồng chất lên nhau.
- + Hình thái các tế bào được bảo tồn tốt.
- + Các tế bào bắt màu rõ ràng, phân biệt được rõ hình thái của nhân, bào tương hoặc các thành phần khác tùy vào phương pháp nhuộm.
- Kết luận sau khi phân tích hình thái tế bào, loại tế bào; đôi khi còn có thể đánh giá cả cấu trúc mô.

### 4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả chính xác, ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin theo quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.
- Lưu kết quả theo quy định của Bộ Y tế.

## 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

### 5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Người bệnh không hợp tác: thuyết phục, giải thích.

### 5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

- Người bệnh bị đau, chảy nhiều nước mắt, mắt không cố định nên khó thực hiện kỹ thuật: do lượng thuốc tê chưa đủ hoặc thời gian tra thuốc cho người bệnh đến khi thực hiện kỹ thuật nhanh, tra thêm thuốc tê hoặc tra thuốc tê theo đúng thời gian quy định.

- Người bệnh không hợp tác: thuyết phục, giải thích.

### 5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Quá ít tế bào hoặc không lấy được tế bào: do vị trí đặt giấy áp ướt, có nhiều nước mắt và/hoặc thời gian đặt giấy áp nhanh quá.
- Cố định kém làm tế bào thoái hóa không nhận định được hình thái nhân và bào tương; giải thích cho người bệnh lấy bệnh phẩm làm lại xét nghiệm, cố định ngay sau khi dàn tiêu bản.
- Cặn thuốc nhuộm còn trên phiến đồ: cần lọc thuốc nhuộm trước khi dùng, rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy.
- Các tế bào bắt màu quá kém: do thuốc nhuộm pha chưa đúng tỷ lệ hoặc không nhuộm đủ thời gian. Kiểm tra lại thuốc nhuộm, nhuộm đủ thời gian.

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh, Tế bào học (Ban hành kèm theo Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25 tháng 12 năm 2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế).
2. Đề cương quy trình kỹ thuật xét nghiệm (Ban hành kèm theo Quyết định số 3376/QĐ-BYT ngày 30 tháng 8 năm 2023 của Bộ trưởng Bộ Y tế).
3. Diagnostic technologies in Ophthalmology. Bentham Books, 2012.

## 7. XÉT NGHIỆM TẾ BÀO HỌC KẾT MẶC, GIÁC MẶC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NẠO (Scraping cytology on the conjunctive and cornea)

### 1. ĐẠI CƯƠNG

Xét nghiệm Tế bào học chất nạo kết mạc, giác mạc là một phần quan trọng trong chẩn đoán và điều trị các bệnh lý viêm loét giác mạc, viêm kết mạc,... giúp xác định được nguyên nhân, đặc biệt trong các trường hợp nghi ngờ tác nhân là virus, dị ứng.

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện xét nghiệm và chẩn đoán tế bào học mẫu bệnh phẩm chất nạo kết mạc, giác mạc.

Xét nghiệm tế bào học trong các bệnh ở kết mạc, giác mạc (viêm kết mạc, viêm giác mạc, loét giác mạc...) bằng phương pháp nạo là xác định về sự có mặt, tỉ lệ và phân tích sự biến đổi hình thái của các tế bào, có trong bệnh phẩm nhằm hỗ trợ công tác chẩn đoán, theo dõi và điều trị bệnh.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Tế bào trong các chất nạo kết mạc, giác mạc được phết lên lam kính tạo thành một lớp mỏng, cố định ngay bằng cồn 90-99°C (cố định ướt) hoặc để khô trong không khí (cố định khô) và nhuộm bằng phương pháp Giemsa.

Nguyên lý của nhuộm Giemsa là dựa trên nhóm phosphat của phẩm nhuộm gắn với liên kết adenin - thymine, liên kết có nhiều ở DNA trong tế bào. Phản ứng oxy hóa sẽ tạo ra màu xanh của metylen ở nhân tế bào, bào tương tế bào có thể bắt màu xanh hoặc hồng. Quan sát tiêu bản nhuộm bằng kính hiển vi quang học để nhận định sự thay đổi về số lượng, hình dạng, kích thước, nhân và nguyên sinh chất, phát hiện ra các Chlamydia, thế vùi virus, tế bào bạch cầu toan, vi khuẩn....

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ
- Kỹ thuật Y, Điều dưỡng

#### 2.2. Vật tư, hoá chất

- Bông hấp tiệt trùng;
- Dao mổ số 15 (dùng một lần)/thìa nạo (Curette)/kimura spatula vô trùng hoặc đã được hấp tiệt trùng;
- Lam kính sạch một đầu mài mờ, bút viết kính, giá cắm lam;
- Đèn cồn;
- Pipet nhựa;
- Găng tay sạch, mũ, khẩu trang;
- Hộp đựng bông cắt nhỏ vô trùng, hộp đựng dụng cụ lấy bệnh phẩm bằng inox;
- Các dung dịch sát khuẩn;

- Hộp đựng dụng cụ sắc nhọn;
- Cốc pha thuốc nhuộm;
- Thuốc nhỏ mắt gây tê bì mặt nhăn cầu (Alcaine hoặc thuốc tương đương);
- Nước muối sinh lý 0,9% vô trùng;
- Dung dịch nhuộm: Phẩm nhuộm phiến đồ (Giemsa/Diff - Quick/Hematoxylin Eosin/Papanicolaou/Ziehl – Neelsen,...);
- Dung dịch cố định phù hợp(Còn cố định 90-99°C,...);
- Dầu soi kính: điều kiện bảo quản nhiệt độ phòng.

### **2.3. Trang thiết bị**

- Giường lấy bệnh phẩm, đèn soi;
- Bàn để dụng cụ, ghế ngồi cho Bác sĩ và kỹ thuật viên;
- Bàn có mặt phẳng rộng để đặt kính hiển vi;
- Kính hiển vi quang học;
- Sổ ghi kết quả, hộp thuốc chống sốc, ống nghe, máy đo huyết áp;
- Máy tính, máy in; đầu quét mã vạch;
- Tủ lưu tiêu bản; tủ lưu hồ sơ;
- Thùng đựng rác thải y tế, thùng đựng rác thải thường.

### **2.4. Người bệnh**

- Người bệnh được giải thích về quy trình thực hiện, mục đích, nguy cơ, lợi ích để người bệnh yên tâm và hợp tác làm xét nghiệm;
- Khai thác tiền sử người bệnh có yếu tố dị ứng;
- Hướng dẫn người bệnh phối hợp để lấy mẫu theo đúng yêu cầu;
- Người bệnh ở tư thế thoải mái, phù hợp với cách lấy bệnh phẩm.

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm có đầy đủ các mục: họ tên, tuổi, số giường (đối với người bệnh nội trú), khoa, chẩn đoán, vị trí lấy bệnh phẩm, số lượng;
- Kiểm tra người bệnh: Đúng người bệnh, đúng chỉ định, đúng mắt cần làm xét nghiệm.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: khoảng 45 – 60 phút**

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:** Thực hiện tại khoa Xét nghiệm hoặc khoa Giải phẫu bệnh – Tế bào bệnh học.

## **3. AN TOÀN**

- Áp dụng các biện pháp an toàn chung khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo quy trình về an toàn xét nghiệm.
- Xem tất cả các mẫu bệnh phẩm như là nguồn nhiễm.

## 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 4.1. Các bước thực hiện:

#### Bước 1: Lấy bệnh phẩm

- Người bệnh nằm trên giường lấy bệnh phẩm.
- Tra 1-2 giọt thuốc gây tê bờ mặt nhăn cầu hoặc thuốc tương đương vào kết mạc cùng đồ dưới mắt cần lấy bệnh phẩm trước lúc làm xét nghiệm từ 1 đến 2 phút.

#### a. Lấy bệnh phẩm kết mạc

- Bọc lôpít mạc mi trên.
- Dùng curette vô trùng nạo nhẹ kết mạc. Khi nạo để lấy được tế bào biểu mô, kết mạc phải hơi trắng tránh để chảy máu nhiều. b. Lấy bệnh phẩm giác mạc
- Đặt vành mi hoặc dùng ngón tay cái và ngón tay trỏ vành mắt của người bệnh.
- Dùng Curette vô trùng hoặc dao mổ số 15 hoặc Kimura's spatula nạo nhẹ từ bờ ô loét vào trung tâm hoặc đáy ô loét tùy theo yêu cầu của bác sĩ chỉ định và tính chất của tổn thương.

#### Bước 2: Làm phiến đồ:

- Phết bệnh phẩm lên lam kính sạch tiệt trùng bằng ngọn lửa đèn cồn đã ghi sẵn tên người bệnh.
- Dàn bệnh phẩm theo đường xoắn ốc từ trong ra ngoài, đảm bảo bệnh phẩm được dàn mỏng, đều.

#### Bước 3: Cố định phiến đồ

Cố định bằng dung dịch phù hợp lên toàn bộ lam kính có chứa bệnh phẩm trước khi nhuộm (dung dịch cố định tùy phương pháp nhuộm).

#### Bước 4: Nhuộm phiến đồ

Theo một trong các phương pháp nhuộm: Giemsa, Papanicolaou, Diff - Quick hay May Grünwald Giemsa, Ziehl – Neelsen hoặc Hematoxylin Eosin như đã nêu ở mục nhuộm phiến đồ tế bào học.

### 4.2. Nhận định kết quả

- Nhận định kết quả trên kính hiển vi quang học
  - + Các phiến đồ giàu tế bào, được giàn mỏng, đều, các tế bào không chồng chất lên nhau.
  - + Hình thái các tế bào được bảo tồn tốt.
  - + Các tế bào bắt màu rõ ràng, phân biệt được rõ hình thái của nhân và bào tương.
  - + Bạch cầu đoạn trung tính có những hạt to nhỏ không đều màu xanh lơ tới đỏ, Bạch cầu ái toan màu đỏ.
  - + Các loại tế bào khác nhân màu tím đỏ, bào tương xanh nhạt.
  - + Các thể vùi Chlamydia, vi khuẩn, nấm và Acanthamoeba bắt màu xanh tím.
- Kết luận sau khi phân tích hình thái tế bào.

### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

- Trả kết quả chính xác ghi chép rõ ràng kết quả và các thông tin quy định vào phiếu trả lời kết quả và sổ kết quả xét nghiệm.
- Lưu kết quả theo quy định của Bộ Y tế.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

### **5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật**

- Người bệnh không hợp tác: thuyết phục, giải thích.

### **5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:**

- Người bệnh bị đau, chảy nhiều nước mắt, mắt không cố định nên khó thực hiện kỹ thuật: do lượng thuốc tê chưa đủ hoặc thời gian tra thuốc cho người bệnh đến khi thực hiện kỹ thuật nhanh, tra thêm thuốc tê hoặc tra thuốc tê theo đúng thời gian quy định.
- Người bệnh không hợp tác: thuyết phục, giải thích.

### **5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật**

- Quá ít tế bào hoặc không lấy được tế bào của tổn thương: do ổ loét giác mạc quá mỏng hoặc dọa thủng.
- Tiêu bản dàn quá dày hoặc phết quá mạnh làm các tế bào chồng chất hoặc bị kéo dài, nát: dàn nhẹ nhàng đều tay.
- Cố định kém làm tế bào thoái hóa không nhận định được hình thái nhân và bào tương; giải thích cho người bệnh lấy bệnh phẩm làm lại xét nghiệm, cố định ngay sau khi dàn tiêu bản.
- Cặn thuốc nhuộm còn trên phiến đồ cần lọc thuốc nhuộm trước khi dùng, rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy.
- Các tế bào bắt màu quá kém: do cố định không tốt, do thuốc nhuộm pha chưa đúng tỷ lệ, hoặc không nhuộm đủ thời gian. Kiểm tra lại thuốc nhuộm, nhuộm đủ thời gian.
- Nhuộm quá đậm: tẩy bớt thuốc nhuộm bằng cồn tuyệt đối.
- Các tế bào bị kéo dài hoặc bị dập nát: cần thực hiện đúng kỹ thuật.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Vi sinh vật y học (2016), Bộ Y tế.
2. Thực tập Vi sinh vật Y học, Bộ môn Vi sinh, trường Đại học Y Hà Nội.
3. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật xét nghiệm Vi sinh lâm sàng ban hành kèm theo quyết định số 1539/QĐ-BYT ngày 20/4/2017.

4. Bộ Y tế (2016), Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh, Té bào học các quy trình kỹ thuật té bào học, Nhà xuất bản Y học, trang 379-457.
5. Ocular Microbiology. Aravind Eye Hospitals and Postgraduate Institute of Ophthalmology Madurai, India.
6. Diagnostic technologies in Ophthalmology. Bentham Books, 2012.

## 8. QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN TẾ BÀO HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM PAPANICOLAOU

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phương pháp nhuộm tế bào được sử dụng đặc biệt trong sàng lọc ung thư cổ tử cung và trong chẩn đoán ở mức độ tế bào của các bướu đặc. Phương pháp này cho phép đánh giá chi tiết cấu trúc tế bào, bào tương và nhân, từ đó hỗ trợ quá trình chẩn đoán và theo dõi điều trị bệnh lý.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Nhuộm Papanicolaou còn được gọi là “nhuộm PAP”, là một loại kỹ thuật Tế bào học nhuộm đa sắc, dùng để phân biệt tế bào trên phiến đồ được lấy từ các dịch hoặc từ tế bào bong của cơ thể. Dạng kinh điển của nhuộm PAP gồm 5 loại phẩm màu, được pha thành 3 dung dịch:

- Hematoxylin (*phẩm nhuộm base*): nhuộm nhân tế bào
- Orang G (gồm acid photphotungstic và OG-5, OG-8): nhuộm chất keratin có trong tế bào.
- Phẩm EA (Eosin Azure): gồm 3 loại phẩm (EA-36, EA-50, EA-65). Eosin Y nhuộm các tế bào vảy bề mặt, hạt nhân, hồng cầu. Xanh lá cây nhạt SF (Light Green). Ánh vàng dùng để nhuộm bào tương của các loại tế bào khác (tế bào vảy không sưng hóa). Nâu Bismarck Y do không nhuộm thành phần nào nên trong công thức nhuộm hiện tại, một số phòng xét nghiệm đã bỏ đi.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### 2.2. Vật tư, hóa chất:

- Dung dịch cố định bệnh phẩm: Cồn tuyệt đối, cồn ete...
- Dung dịch nhuộm: Phẩm nhuộm PAP, EA50, Orange...
- Nước cất, nước sạch để rửa thuốc nhuộm trên phiến kính.
- Bề nhuộm, khay đựng tiêu bản, lam kính, phiến kính, keo gắn phiến kính...

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Máy nhuộm tiêu bản tự động.
- Kính hiển vi quang học, bàn có mặt phẳng, đủ rộng để đặt kính hiển vi
- Sổ hoặc máy tính ghi lại thông tin của từng Người bệnh, đặc điểm tổn thương, kết quả chẩn đoán.
- Thùng rác thải y tế, rác thải thường.

## 2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Lấy bệnh phẩm:

+ Việc lấy mẫu được thực hiện bởi các khoa lâm sàng và gửi bệnh phẩm về phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh.

+ Phiến đồ được cố định ngay trong cồn tuyệt đối hoặc cồn - ete: 30 giây

## 2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Phiếu xét nghiệm ghi rõ họ và tên người bệnh, vị trí lấy bệnh phẩm, màu sắc, thời gian lấy, người thực hiện kỹ thuật, số lượng phiến đồ...

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

## 2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 60 phút.

## 2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật : Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

## 3. AN TOÀN

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

## 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 4.1. Các bước thực hiện

+ Chuyển liên tục trong các bể cồn 80°, 70° rồi 50°, mỗi bể 5 lần nhúng

+ Rửa nước cát

+ Nhuộm nhân trong hematoxylin Harris: 3 - 6 phút

+ Rửa nước cát

+ Nhúng 5 - 6 lần trong dung dịch acid HCl 0,25%

+ Rửa nước chảy trong 6 phút rồi qua nước cát khoảng 30 giây

+ Chuyển liên tục trong các bể cồn 50°, 70°, 80° rồi 95°: mỗi bể 5 lần nhúng

+ Nhỏ Orange G phủ kín bệnh phẩm: khoảng 1 - 3 phút

+ Chuyển liên tục qua 2 bể cồn 95°: mỗi bể 5 lần nhúng

+ Nhuộm trong hỗn hợp đa sắc “EA50” trong khoảng 1 - 4 phút

+ Chuyển liên tục trong các bể cồn 95° rồi 100°: mỗi bể 5 lần nhúng

+ Khử nước bằng cồn 95° và 100°

+ Làm trong bằng 3 bểtoluen sạch

+ Gắn lá kính bằng bôm nhu thường lệ.

- Kết quả

+ Nhân: xanh xám hoặc tím

+ Bào tương tế bào ura acid: đỏ hồng, đỏ tươi hoặc vàng da cam

- + Các tế bào ưa base: xanh nhạt, đôi khi xanh ve nhạt.

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh:

- + Đánh giá loại tế bào, hình thái, cấu trúc, đánh giá nền, mô đệm
- + Phân loại tổn thương: viêm, tổn thương u lành, u ác tính, phân típ,...
- + Chẩn đoán tế bào theo các hệ thống phân loại được khuyến cáo (hệ thống phân loại Bethesda, ....)
- + Phiên giải kết quả cần kết hợp với các thông tin lâm sàng, cận lâm sàng bác sĩ lâm sàng cung cấp hoặc xem bệnh án. Các kết quả có giá trị cảnh báo (Ví dụ: nghi ngờ ác tính) cần được ghi vào phiếu kết quả xét nghiệm hoặc báo cho bác sĩ khám, điều trị.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Phiến đồ bị mất tế bào vào trong dịch cố định: cần để khô sau khi dàn 10-30 phút trước khi cố định bằng cồn.
- Bong bệnh phẩm: rửa nhẹ nhàng, nên dùng phiến kính có phủ chất chống bong
- Các tế bào dày, chồng chất: lấy lượng dịch vừa đủ, dàn đều tay
- Các tế bào bắt màu quá kém: cần cố định tốt và nhuộm đủ thời gian, thuốc nhuộm tốt
- Nhuộm quá đậm: tẩy bớt thuốc nhuộm bằng cồn tuyệt đối.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## **9. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM HAI MÀU HEMATOXYLIN - EOSIN TIÊU BẢN TẾ BÀO HỌC**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả và hướng dẫn quy trình, cách thực hiện xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm HE (Hematoxylin – Eosin) trên phiến đồ tế bào học.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Phương pháp nhuộm này áp dụng cho tất cả các phiến đồ tế bào học chọc hút kim nhỏ, tế bào bong và phiến đồ áp nhuộm thường quy, phiến đồ tế bào học dịch. Tương tự như quy trình nhuộm HE trên mẫu mô, đây cũng là phương pháp nhuộm phối hợp đơn giản hai phẩm màu liên tiếp, một phẩm màu có tính base là Hematoxylin để nhuộm nhân, một phẩm màu có tính acid là Eosin để nhuộm bào tương.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### **2.2. Hóa chất, Vật tư:**

- Cồn methanol
- Xylen (toluen)
- Hematoxylin, Eosin
- Acid HCL, Lithiumcarbonat
- Keo gắn lamen
- Lam kính, lamen
- Găng tay vô trùng, khẩu trang.
- Ống hút tự động.
- Ống đựng mẫu ly tâm
- Giá để đựng lam kính đã dàn bệnh phẩm.
- Bút chì mềm ghi mã số người bệnh, vị trí chọc hút.
- Các dụng cụ để nhuộm: khay, giá, cốc pha thuốc nhuộm, ống hút.

#### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy ly tâm
- Kính hiển vi quang học, bàn có mặt phẳng, đủ rộng để đặt kính hiển vi
- Máy tính, máy in.
- Máy đo pH.

- Máy nhuộm tiêu bản tự động

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Lấy bệnh phẩm: mẫu bệnh phẩm được thu thập từ các kỹ thuật chọc hút kim nhỏ, áp lam té bào bong hoặc trên các dịch cơ thể.

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 1h30 phút.

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản cố định bằng cồn tuyệt đối hoặc cồn ete, đế khô
  - + Rửa nước: nhúng 15 lần.
  - + Nhuộm nhân bằng Hematoxylin: 3-5 phút hoặc lâu hơn.
  - + Rửa nước chảy: 5-10 phút.
  - + Kiểm tra màu của nhân qua kính hiển vi, nếu đậm, tẩy nhẹ bằng cồn-acid.
  - + Rửa nước chảy: 1 phút.
  - + Nhuộm Eosin1%: 1 -2 phút.
  - + Rửa nước chảy: 1 phút.
  - + Biệt hoá trong 2 bể cồn 95° - 100°, mỗi bể 15 lần nhúng.
  - + Qua 3 bểtoluen, bể I và II nhúng 15 lần, bể III: 5-10 phút.
  - + Gắn lamen
- Ngoài ra, tiêu bản sau khi cố định, đế khô có thể nhuộm bằng máy nhuộm tiêu bản tự động theo quy trình cài đặt sẵn.
  - Kết quả:

Nhân tế bào: xanh đến xanh đen

Bào tương tế bào: hồng đến đỏ

Hồng cầu: hồng đậm

Sợi tạo keo: hồng nhạt

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh:

- + Đánh giá loại tế bào, hình thái, cấu trúc, đánh giá nền, mô đệm
- + Phân loại tổn thương: viêm, tổn thương u lành, u ác tính, phân típ,...
- + Chẩn đoán tế bào theo các hệ thống phân loại được khuyến cáo (hệ thống phân loại Bethesda, ....)
  - + Phiên giải kết quả cần kết hợp với các thông tin lâm sàng, cận lâm sàng bác sĩ lâm sàng cung cấp hoặc xem bệnh án. Các kết quả có giá trị cảnh báo (Ví dụ: nghi ngờ ác tính) cần được ghi vào phiếu kết quả xét nghiệm hoặc báo cho bác sĩ khám, điều trị.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Bào tương và nhân đều bắt màu nhạt: thuốc nhuộm cũ, thay thuốc nhuộm mới.
- Nhân nhạt màu: tăng thời gian nhuộm nhân.
- Nhân đậm màu quá mức: tẩy nhẹ bằng cồn-acid.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## **10. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN TẾ BÀO HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP TẾ BÀO HỌC CHẤT LỎNG (LIQUID – BASED CYTOPLOGY)**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán xét nghiệm và chẩn đoán kỹ thuật tế bào học chất lỏng trong đó bao gồm cả bệnh phẩm tế bào học các loại dịch cơ thể và tế bào bong như tế bào cổ tử cung – âm đạo.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Phương pháp này nhằm nâng cao hiệu quả phát hiện sớm các tế bào tiền ung thư, ung thư cổ tử cung. Đây là kỹ thuật tế bào không ảnh hưởng đến môi trường, thiết bị đơn giản, có thể lưu trữ bệnh phẩm để xét nghiệm lại khi cần (không phải mời người bệnh đến lấy lại bệnh phẩm tế bào như các phương pháp khác), có thể sử dụng bệnh phẩm cho phân tích các thụ thể, gen, các tác nhân gây bệnh, hóa miễn dịch tế bào... chỉ trong 1 lần lấy bệnh phẩm. Dùng các hóa chất hòa tan chất nhầy và hòng cầu để các thành phần này không che lấp các tế bào cần quan sát, cũng như dùng chất dính để các tế bào như được dán lên lam kính, không bị trôi khi nhuộm. Các tế bào không bị chồng chất lên nhau, nên rất dễ quan sát, do đó tăng độ nhạy, độ chính xác, giảm tỷ lệ âm tính giả.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý: 01

#### **2.2. Vật tư, hóa chất**

- Các ống ly tâm, lọ đựng bệnh phẩm có chất cố định.
- Ống hút tự động loại 20 đến 200 $\mu$  và loại 500 đến 6000 $\mu$ .
- Dung dịch làm sạch.
- Lam kính có gân săn chất chống bong, lamen sạch.
- Hộp đựng phiến đồ
- Côn 50°, 70°, 80°, 90°, 95°, 100°.
- Dung dịch cố định phù hợp
  - Dung dịch nhuộm: Phẩm nhuộm phiến đồ (Giemsa/Diff - Quick/Hematoxylin&Eosin/ Papanicolaou, Ziehl - Neelsen...).
  - Nước cất, nước sạch để rửa thuốc nhuộm trên lam kính.

#### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy ly tâm, tốc độ từ 1000-2000 vòng/phút.
- Máy tách chiết tế bào tự động (Thinprep, Surethin, Surepath...)

- Ống hút tự động loại 20 đến 200 $\mu$  và loại 500 đến 6000 $\mu$ .
- Kính hiển vi quang học (có gắn camera).
- Dụng cụ sấy tiêu bản;
- Hệ thống máy tính, máy in, đầu quét mã vạch;
- Tủ lưu tiêu bản, lưu hồ sơ;
- Thùng rác đựng rác thải y tế và rác thải thường.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Vìệc lấy mẫu được thực hiện bởi các khoa lâm sàng và gửi bệnh phẩm về Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.
- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.
- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

#### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 60 phút**

#### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh**

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn Phòng xét nghiệm

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện**

**Bước 1: Kỹ thuật tập trung tế bào:** Bệnh phẩm sau khi nhận sẽ được trộn đều, ly tâm và hút tế bào phết trên lam kính chống bong. Việc thực hiện tự động trên hệ thống tách chiết tế bào, theo hướng dẫn của từng hệ thống.

**Yêu cầu:** Tế bào lấy được phải đảm bảo đủ số lượng và thành phần, loại trừ một phần hồng cầu hoặc tế bào viêm, tạo chất.

#### **Bước 2: Cố định phiến đồ:**

- Cố định bằng dung dịch phù hợp lên toàn bộ bề mặt lam kính có chứa bệnh phẩm trước khi nhuộm (tùy phương pháp nhuộm).

**Bước 3: Nhuộm phiến đồ** Theo một trong các phương pháp nhuộm: Giemsa, Papanicolaou, Diff - Quick hay May Grünwald Giemsa, Ziehl – Neelsen hoặc Hematoxylin Eosin).

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Phiến đồ sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh:

- + Đánh giá loại tế bào, hình thái, cấu trúc, đánh giá nền, mô đệm
- + Phân loại tổn thương: viêm, tổn thương u lành, u ác tính, phân típ,...
- + Chẩn đoán tế bào theo các hệ thống phân loại được khuyến cáo (hệ thống phân loại Bethesda, ....)
- + Phiên giải kết quả cần kết hợp với các thông tin lâm sàng, cận lâm sàng bác sĩ lâm sàng cung cấp hoặc xem bệnh án. Các kết quả có giá trị cảnh báo (Ví dụ: nghi ngờ ác tính) cần được ghi vào phiếu kết quả xét nghiệm hoặc báo cho bác sĩ khám, điều trị.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định tại cơ sở

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

Cần xem xét lượng tế bào nhiều hay ít để pha dung dịch chất dính (cell base). Nếu mật độ tế bào thấp, cần dùng ít dung dịch cell base để có đủ tế bào chẩn đoán.

Lưu ý thời gian nhuộm nhân, không để quá dài, vì nếu nhuộm nhân lâu sẽ làm tăng sắc, có thể dẫn đến nhận định sai.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## 11. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN TẾ BÀO TRONG CÁC LOẠI DỊCH CƠ THỂ BẰNG PHƯƠNG PHÁP TẾ BÀO HỌC CHẤT LỎNG (Non Gyn)

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả và hướng dẫn cách thực hiện xét nghiệm Tế bào học các loại dịch trong cơ thể bằng kỹ thuật tế bào học chất lỏng (Liquid base cytology).

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Tế bào học chất lỏng là một phương pháp xét nghiệm tế bào thay vì phết trực tiếp bệnh phẩm trên lam kính như xét nghiệm tế bào truyền thống thường, mẫu bệnh phẩm trong xét nghiệm tế bào học chất lỏng được lấy vào các lọ có chứa dung dịch bảo quản có sẵn, chất lỏng được xử lí loại bỏ chất nhầy và hồng cầu. Tại phòng xét nghiệm sẽ sử dụng hệ thống thiết bị có màng lọc, chất dính tế bào để phết một lớp tế bào lên lam kính để xét nghiệm. Các tế bào không bị trôi hoặc chồng chất lên nhau, nên rất dễ quan sát, do đó tăng độ nhạy, độ chính xác, giảm tỷ lệ âm tính giả.

Phương pháp này nhằm nâng cao hiệu quả phát hiện sớm các tế bào tiền ung thư, ung thư. Đây là kỹ thuật tế bào không ảnh hưởng đến môi trường, thiết bị đơn giản, có thể dùng bệnh phẩm để làm nhiều xét nghiệm khác (như phân tích các thụ thể, gen, các tác nhân gây bệnh, hóa miễn dịch tế bào...) chỉ trong 1 lần lấy bệnh phẩm. Đồng thời có thể lưu trữ bệnh phẩm để xét nghiệm lại khi cần (không phải mời người bệnh đến lấy lại bệnh phẩm tế bào như các phương pháp khác).

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

- **Nhân lực trực tiếp**

- + Bác sĩ: 01

- + Kỹ thuật y: 01.

- **Nhân lực hỗ trợ:**

- + Nhân viên hành chính;

- + Hộ lý, nhân viên vệ sinh.

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

##### 2.2.1. Hoá chất

- Dung dịch nhuộm: Phẩm nhuộm phiến đồ (Giemsa/Diff - Quik/HE/ Papanicoulou, Ziehl - Neelsen...);

- Nước cát, nước sạch để rửa thuốc nhuộm trên phiến kính;

- Cồn 80°, 90° và cồn tuyệt đối;

- Dung dịch rửa tay thường quy.

##### 2.2.2. Vật tư tiêu hao

##### Vật tư tiêu hao:

- Lam kính sạch có chất chống bong, một đầu mài mờ để ghi thông tin người bệnh;

- Lamelle (lá kính);

- Bộ lấy mẫu bệnh phẩm chuyên dụng: lọ chứa dung dịch đựng bệnh phẩm (có sẵn chất cố định và chất làm sạch), chổi quét lấy mẫu.

- Bơm tiêm vô trùng 10ml hoặc 20ml và Kim tiêm loại 23G hoặc 27G (các trường hợp lấy dịch trong các tổn thương dạng nang);

- Bộ dụng cụ nhuộm lam kính;

- Ống hút tự động loại 20 đến 200 $\mu$  và loại 500 đến 6000 $\mu$ ;

- Các ống ly tâm;

- Bông khô tiệt trùng;

- Băng dính y tế;

- Găng tay sạch, khẩu trang, mũ y tế;

- Giấy/khăn lau tay;

- Giấy A4; sổ bàn giao bệnh phẩm.

- Bút dạ dầu, bút chì mềm, bút bi;

#### **Dụng cụ:**

- 2 Khay quả đậu đựng dụng cụ, vật tư sạch và vật tư đã sử dụng;

- Hộp đựng bông cồn sát trùng và hộp đựng bông khô tiệt trùng;

- Hộp bằng thép không rỉ đựng bơm, kim tiêm sạch;

- Hộp chống sốc;

- Khay/giá để tiêu bản;

- Túi rác thải y tế; túi rác thải thông thường;

- Hộp đựng rác thải sắc nhọn;

- Thùng đựng rác thải y tế (màu vàng) và thông thường (màu xanh).

### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy ly tâm, tốc độ từ 1000-2000 vòng/phút.

- Máy tách chiết tế bào tự động.

- Ống hút tự động loại 20 đến 200 $\mu$  và loại 500 đến 6000 $\mu$ .

- Kính hiển vi quang học (có gắn camera).

- Dụng cụ sấy tiêu bản;

- Hệ thống máy tính, máy in, đầu quét mã vạch;

- Tủ lưu tiêu bản, lưu hồ sơ;

- Thùng rác đựng rác thải y tế và rác thải thường.

## 2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

### 2.4.1. Lấy mẫu bệnh phẩm

- Bệnh phẩm tế bào một số vị trí như cổ tử cung – âm đạo, khoang miệng, tế bào bong ở da,... có thể dùng dụng cụ lấy mẫu chuyên dụng (chổi quét) để lấy mẫu, nhúng vào lọ đựng dung dịch cố định.

- Các loại dịch như dịch màng phổi, dịch màng bụng, dịch não tuỷ,... được lấy tại các phòng thủ thuật, chừa trong các lọ đựng, bảo quản lạnh nếu chưa được vận chuyển đến phòng tế bào.

- Các mẫu phẩm tế bào khác có thể được lấy mẫu bằng các kĩ thuật chọc hút tế bào tại phòng thủ thuật hoặc phòng xét nghiệm tế bào; cho mẫu dịch vào các lọ chừa dung dịch cố định.

### 2.4.2. Bàn giao mẫu

- Các mẫu bệnh phẩm được bàn giao đến phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh tế bào ngay trong ngày.

- Trên các lọ chừa mẫu phẩm ghi đầy đủ thông tin người bệnh: tên, tuổi, mã số, mã vạch. Các thông tin phù hợp với chỉ định xét nghiệm.

- Các lọ bệnh phẩm được đóng nắp, không tràn lắc bệnh phẩm. Nếu tràn lắc bệnh phẩm cần lấy lại bệnh phẩm để thực hiện xét nghiệm.

## 2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Ghi đầy đủ thông tin bệnh nhân, tên khoa phòng, chẩn đoán, kết quả khám lâm sàng và tiền sử của bệnh nhân, thời gian lấy mẫu, số lượng mẫu.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng, phương pháp lấy mẫu, vị trí, số lượng mẫu.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến khoa xét nghiệm.

## 2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 40 phút

## 2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:

Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh – tế bào

## 3. AN TOÀN

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm:

## 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 4.1. Làm tiêu bản

- Khởi động hệ thống.
- Đặt lọ chừa bệnh phẩm vào vị trí quy định trên máy.
- Đặt lam kính vào giá cài trên máy.
- Cài màng lọc.

- Chọn chương trình.
- Án start.
- Sau khi chạy xong chương trình , nhắc lam kính ra và nhuộm theo quy trình.
- Bỏ lọ đựng bệnh phẩm vào vị trí lưu trữ và huỷ bỏ theo quy trình quy định.

#### **4.2. Nhuộm lam kính tế bào**

- Theo một trong các phương pháp nhuộm: Giemsa, Papanicolaou, Diff - Quick hay May Grünwald Giemsa, Ziehl – Neelsen hoặc HE).
- Lựa chọn phương pháp nhuộm tuỳ mục đích làm xét nghiệm.

#### **4.3. Nhận định kết quả**

- Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ Giải phẫu bệnh.
- Đánh giá chất lượng tiêu bản: màu sắc, mật độ tế bào trên tiêu bản nhuộm. Tiêu bản chất lượng tốt.
  - + Các tế bào tập trung chủ yếu ở trung tâm tiêu bản, lớp tế bào mỏng đều.
  - + Các tế bào bắt màu rõ nhân và bào tương: nhân tím xanh, bào tương hồng nhạt, hồng cầu xanh nhạt.

- Đọc và nhận định kết quả:

- + Đánh giá loại tế bào, hình thái, cấu trúc, đánh giá nền, mô đệm
- + Phân loại tổn thương: viêm, tổn thương u lành, u ác tính, phân típ,...
- + Một số vị trí có thể chẩn đoán tế bào theo các hệ thống phân loại được khuyến cáo như tuyến giáp, cổ tử cung có hệ thống phân loại Bethesda, ....
  - + Phiên giải kết quả cần kết hợp với các thông tin lâm sàng, cận lâm sàng bác sĩ lâm sàng cung cấp hoặc xem bệnh án. Các kết quả có giá trị cảnh báo (Ví dụ: nghi ngờ ác tính) cần được ghi vào phiếu kết quả xét nghiệm hoặc báo cho bác sĩ khám, điều trị.

#### **4.4. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

- Báo cáo kết quả: vào kết quả trên phần mềm máy tính, in và ký kết quả bản cứng.

- Lọ chứa mẫu bệnh phẩm và tiêu bản thực hiện xét nghiệm lưu trữ đúng vị trí và huỷ theo quy định.

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

#### **5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật**

- Sai sót về tủ tục hành chính: Phiếu và lọ xét nghiệm không khớp tên, thiếu thông tin bệnh phẩm.... Cần kiểm tra đầy đủ thông tin họ tên đầy đủ, tuổi của bệnh nhân đối chiếu mẫu bệnh phẩm trước khi thực hiện xét nghiệm và liên hệ với bác sĩ lâm sàng.

- Sai phiếu chỉ định xét nghiệm: Nhân viên phòng xét nghiệm kiểm tra đúng loại phiếu, nếu sai cần báo cho bác sĩ và người thực hiện.

### **5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật**

- Sự cố do máy: máy rung lắc mạnh, kêu... Vận hành máy đúng quy trình.
- Phiến đồ bị mất tế bào trong quá trình cố định: cần để khô sau khi dàn 10-30 phút trước khi cố định bằng cồn tuyệt đối.
- Bong bệnh phẩm: rửa nhẹ nhàng, nên dùng lam kính có phủ chất chống bong
- Các tế bào dày, chồng chát: lấy lượng dịch vừa đủ, dàn đều tay
- Tế bào thoái hóa, tan rã, không nhận định được hình thái nhân và bào tương: dịch lấy ra khỏi cơ thể phải làm xét nghiệm ngay.
- Các tế bào bắt màu quá kém: cần cố định tốt và nhuộm đủ thời gian, thuốc nhuộm tốt.
- Nhuộm quá đậm: tẩy bớt thuốc nhuộm bằng cồn tuyệt đối.
- Các tế bào bị kéo dài hoặc bị dập nát: cần thực hiện đúng kỹ thuật.
- Nhầm tiêu bản giữa các bệnh nhân: Cần đổi chiếu đúng tên người bệnh trên lam kính.

### **5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật**

Nhầm bệnh nhân khi vào kết quả xét nghiệm : Kiểm tra kỹ phiếu chỉ định và tiêu bản của bệnh nhân, ghi mô tả/ chẩn đoán trên phiếu chỉ định trước khi vào kết quả trên máy.

Nếu có 2 bệnh nhân trùng tên toàn bộ, cần đổi chiếu thêm thông tin khác (tuổi, địa chỉ, mã y tế).

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Pratical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.
3. Freida Carson: Histotechnoloy, 3<sup>rd</sup> editon, 2017.

### **13. QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM TẾ BÀO TÌM TINH THỂ URAT QUA KÍNH HIỂN VI PHÂN CỰC**

#### **1. ĐẠI CƯƠNG**

##### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện xét nghiệm và chẩn đoán tế bào học tìm tinh thể urat qua kính hiển vi phân cực

##### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Xét nghiệm dịch khớp, quan sát phát hiện tinh thể urat giúp bác sĩ chẩn đoán chính xác bệnh Gout. Xét nghiệm này giúp đánh giá tổn thương các khớp, từ đó xác định mức độ viêm và có biện pháp xử lý kịp thời.

#### **2. CHUẨN BỊ**

##### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý: 01

##### **2.2. Vật tư, hóa chất**

- Găng tay vô trùng, khẩu trang.
- Pipet nhựa
- Lam kính sạch, một đầu mài mờ.
- Giá để đựng lam kính đã dàn bệnh phẩm.
- Bút chì mềm ghi mã số người bệnh, vị trí chọc hút.
- Các dụng cụ để nhuộm: khay, giá, cốc pha thuốc nhuộm, ống hút.
- Phiếu xét nghiệm ghi rõ họ và tên người bệnh, vị trí lấy dịch, số lượng dịch, màu sắc, thời gian lấy, người thực hiện kỹ thuật, số lượng phiến đồ.
- Dung dịch cố định phù hợp
- Dung dịch nhuộm: Phẩm nhuộm phiến đồ (Giemsa/Diff – Quick/ Hematoxylin Eosin/ Papanicolaou/ Ziehl - Neelsen...).
- Các dung dịch sát khuẩn.
- Nước cát, nước sạch để rửa thuốc nhuộm trên lam kính.

##### **2.3. Trang thiết bị**

- Bàn sấy tiêu bản;
- Kính hiển vi quang học (có gắn camera chụp ảnh vi thể);
- Máy tính, máy in; đầu quét mã vạch;
- Tủ lưu tiêu bản; tủ lưu hồ sơ;
- Thùng rác đựng rác thải y tế và rác thải thường.

## 2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Lấy bệnh phẩm: Việc lấy mẫu được thực hiện bởi các khoa lâm sàng và gửi bệnh phẩm về Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh.

Yêu cầu: dịch hút ra được dàn lên lam kính, để khô tự nhiên, sau đó cố định

## 2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

## 2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 30 phút

## 2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

## 3. AN TOÀN

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn Phòng xét nghiệm.

## 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 4.1. Các bước thực hiện

#### Bước 1: Cố định phiến đồ:

- Cố định bằng dung dịch phù hợp lên toàn bộ bề mặt lam kính có chứa bệnh phẩm trước khi nhuộm (tùy phương pháp nhuộm).

#### Bước 2: Nhuộm các phiến đồ

- Theo một trong các phương pháp nhuộm: Giemsa, Papanicolaou, Diff - Quick hay May Grünwald Giemsa, Ziehl – Neelsen hoặc Hematoxylin Eosin như đã nêu ở mục nhuộm phiến đồ tế bào học).

### 4.2. Nhận định kết quả

- Phiến đồ sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh.

### 4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định tại cơ sở.

## 5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ

- Phiến đồ bị mất tế bào vào trong dịch cố định: cần để khô sau khi dàn 10-30 phút trước khi cố định

- Bong bệnh phẩm: rửa nhẹ nhàng, nên dùng lam kính có phủ chất chống bong

- Các tế bào dày, chồng chất: lấy lượng dịch vừa đủ, dàn đều tay

- Tế bào thoái hóa, tan rã, không nhận định được hình thái nhân và bào tương: dịch lấy ra khỏi cơ thể phải làm xét nghiệm ngay hoặc phai tiền cố định.

- Các tế bào bắt màu quá kém: cần cố định tốt và nhuộm đủ thời gian, thuốc nhuộm tốt.

- Nhuộm quá đậm: tẩy bớt thuốc nhuộm bằng cồn tuyệt đối.

- Các tế bào bị kéo dài hoặc bị dập nát: cần dàn đúng kỹ thuật.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.

- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.

2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## **PHẦN II. CÁC QUY TRÌNH NHUỘM MÔ BỆNH HỌC – TẾ BÀO**

## 28. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM ĐỎ CONGO KIỀM (THEO PUCHTLER 1962)

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả và hướng dẫn quy trình, cách thực hiện và chẩn đoán kỹ thuật nhuộm đỏ Congo kiềm (theo Puchtler 1962)

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đỏ Congo là phẩm nhuộm acid nhóm diazo, gồm hai nửa giống nhau, trong đó, mỗi nửa có vòng phenol gắn với nhóm phân tử naphthalen nhò nhóm diazo. Hai nhómphephenyl gắn với nhau bằng liên kết diphenyl. Tuy nhiên, việc nhuộm chất dạng tinh bột (amyloid) bằng đỏ Congo là nhò liên kết hydrogen khác với liên kết hóa điện tử được tạo ra giữa phẩm nhuộm và hầu hết các thành phần mô được nhuộm. Trong dung dịch nước, đỏ Congo nhuộm nhiều thành phần mô khác nhau, mặc dù ái lực với chất dạng tinh bột lớn hơn đối với thành phần khác.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý: 01

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

##### Vật tư, hóa chất dùng cho nhuộm tự động

- Lamen , keo gắn lamen
- Lam kính có chất chống bong
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Dung dịch tẩy nến
- Dung dịch dầu khoáng
- Dung dịch rửa
- Bộ kít nhuộm đỏ Congo

##### Vật tư, hóa chất dùng cho nhuộm tay

- Lamen , keo gắn lamen
- Lam kính sạch
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Cồn  $70^0$ ,  $80^0$ ,  $95^0$ ,  $100^0$
- Xylen hoặc Toluene

- Dung dịch A lưu trữ: Chlorit sodium bão hòa trong 80% etanol.
- Dung dịch B lưu trữ: đỗ Congo bão hòa trong 80% etanol được bão hòa bằng chlorit sodium.
- 1% dung dịch nước hydroxit sodium.

Dung dịch làm việc

- 100 ml dung dịch A lưu trữ thêm 1 ml dung dịch nước hydroxit sodium 1% rồi lọc.

- 100ml dung dịch B lưu trữ thêm 1ml dung dịch nước hydroxit sodium 1% rồi lọc.

### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lát mỏng
- Kính hiển vi quang học
- Tủ âm
- Tủ hút
- Máy nhuộm đặc biệt

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Mẫu bệnh phẩm là mẫu mô đã vùi paraffin

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 giờ**

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh**

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn Phòng xét nghiệm

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

**Nhuộm máy:**

- Bước 1: Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm

- Bước 2: Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm

- Bước 3: Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- Bước 4: Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

### **Nhuộm tay:**

- Bước 1: Tẩy parafin mảnh cắt bằng 3 bểtoluen (xylen), mỗi bể 2 phút
- Bước 2: Chuyển vào các bể còn 100°, 95°, 80° mỗi bể 2 phút
- Bước 3: Rửa trong nước cắt 3 – 5 phút
- Bước 4: Nhuộm nhân trong alun hematoxylin, biệt hóa và làm xanh
- Bước 5: Nhúng trong dung dịch chlorit sodium kiềm x 20 phút
- Bước 6: Chuyển ngay sang dung dịch đỏ Congo kiềm x 20 phút
- Bước 7: Đẩy nước bằng cồn 95° và 100°
- Bước 8: Làm trong bằng 3 bể toluen sạch
- Bước 9: Gắn lá kính.

### **Kết quả:**

Bác sĩ giải phẫu bệnh phân tích kết quả nhuộm trên kính hiển vi quang học:

- + Chất dạng tinh bột, sợi chun, hạt bạch cầu ura toan: đỏ
- + Nhân: xanh

### **4.2. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ theo quy định tại cơ sở

## **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá.
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.
  - + Mặc dù dung dịch lưu trữ có khả năng ổn định khoảng 2 tháng, nhưng để có màu sắc tốt, không nên để lưu dung dịch làm việc mà chỉ sử dụng trong khoảng 20 phút sau chuẩn bị.
    - + Để bảo hòa trong 100ml etanol 80%, cần sử dụng 0,2g phẩm đỏ Congo. Lưu giữ dung dịch trong tủ lạnh

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.
3. Freida Carson: Histotechnoloy, 3<sup>rd</sup> editon, 2017.

## 29. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM XANH ALCIAN

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả và hướng dẫn quy trình, cách thực hiện và chẩn đoán kỹ thuật nhuộm xanh Alcian

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đây là kỹ thuật nhuộm xác định các loại chất nhầy khác nhau (loại acid, trung tính hoặc kiềm, thường được áp dụng cho các tổn thương đường tiêu hóa). Nguyên lý dựa vào tính chất thuốc nhuộm cation và hình thành các liên kết với các anion nhất định trong mô mang nhóm carboxyl hoặc nhóm sunfat, tạo nên các liên kết tĩnh điện cation-anion. Gốc photphat của acid nhân không sẵn sàng liên kết với thuốc nhuộm xanh alcian. Có thể nhuộm xanh alcian ở các độ pH khác nhau để phân biệt các chất nhầy acid.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý: 01

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

##### **Vật tư, hóa chất nhuộm tự động:**

- Lamen, keo gắn lamen
- Lam kính có chất chống bong
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Dung dịch tẩy nến
- Dung dịch dầu khoáng
- Dung dịch rửa
- Bộ kít nhuộm đỏ xanh Alcian

##### **Vật tư, hóa chất nhuộm tay:**

- Lamen, keo gắn lamen
- Lam kính sạch
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Cồn 70°, 80°, 95°, 100°
- Xylen hoặc Toluen
- Pha dung dịch xanh alcian 1% trong acid acetic 3% (pH 2,5)

- + Xanh alcian 1g
- + Acid acetic 3% 100ml

Hòa tan xanh alcian trong acid acetic. Lọc trước khi sử dụng.

- Pha dung dịch xanh alcian 1% trong acid hydrochloric 0,1M (pH 1,0)

- + Xanh alcian 1g
- + Acid hydrochloric 0,1M 100ml

Hòa tan xanh alcian trong acid hydrochloric. Lọc trước khi sử dụng.

- Pha dung dịch natri carbonat 0,3%

- + Natri cacbonat 0,3 g
- + Nước cất 100ml

### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lát mỏng
- Kính hiển vi quang học
- Tủ âm
- Tủ hút
- Máy nhuộm đặc biệt
- Máy đo pH

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Mẫu bệnh phẩm là mẫu mô đã vùi paraffin

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 giờ**

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh**

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn Phòng xét nghiệm

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

### Nhuộm máy:

- Bước 1: Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm
- Bước 2: Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- Bước 3: Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- Bước 4: Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

### Nhuộm tay:

- Bước 1: Tẩy nén trongtoluen 3 lần, mỗi lần 2 phút
- Bước 2: Chuyển vào bể cồn 100°, 95°, 80° mỗi bể 2 phút
- Bước 3: Rửa nước chảy 5 phút
- Bước 4: Đặt trong dung dịch acid acetic 3% trong 2 phút
- Bước 5: Nhuộm trong dung dịch xanh alcian 1%: 30 phút
- Bước 6: Rửa nước chảy 5 phút
- Bước 7: Đे trong dung dịch natri carbonat 0,3% trong 30 phút
- Bước 8: Rửa nước chảy 5 phút
- Bước 9: Nhuộm nhân trong Hematoxylin Mayer: 7 phút
- Bước 10: Rửa nước chảy 5 phút
- Bước 11: Loại nước bằng cồn 80°, 95°, 100°.
- Bước 12: Làm trong qua 3 bể toluen.
- Bước 13: Gắn lá kính

### Kết quả nhuộm:

Bác sĩ giải phẫu bệnh phân tích kết quả nhuộm trên kính hiển vi quang học:

Chất nhày acid: màu xanh ngọc

Nhân tế bào: màu xanh nhạt

## 4.2. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định tại cơ sở

## 5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ

- Mảnh cắt bị bong, gấp quá nhiều:
  - + Có thể do cố định bệnh phẩm không tốt: không khắc phục được hoặc phải lấy bệnh phẩm mới và làm lại kỹ thuật.
    - + Do cắt dày hoặc dán mảnh cắt không tốt: cắt và dán lại mảnh cắt, nhuộm lại.
    - + Mảnh cắt bị rách, nhăn hoặc giãn quá mức: do cắt bị vấp hoặc do dàn mảnh cắt quá mức hoặc bàn hơi quá nóng. Cần điều chỉnh nhiệt độ và cắt nhuộm lại nếu cần.
  - Nhân tế bào và chất nhày bắt màu yếu: tăng thời gian nhuộm.

- Nhiều bọt khí, hơi nước trong tiêu bản: gắn lá kính thật nhanh, ngay khi nhắc qua bểtoluen, thực hiện kỹ thuật trong phòng khô (có điều hòa, máy hút ẩm, đặc biệt vào những khi thời tiết có độ ẩm cao).

- Mảnh cắt bị khô, bay mất thuốc nhuộm, không đánh giá được: cần phủ kín mảnh cắt bằng lá kính, gắn đủ bôm hoặc chất gắn lá kính.

- Chất nhầy acid không bắt màu: kiểm tra lại để đánh giá chính xác độ pH của thuốc nhuộm.

- Tùy thuộc chất nhầy acid loại nào sẽ bắt màu ở các độ pH 1 hay 2,5, nên phải đánh giá sự bắt màu chất nhầy theo loại mô được nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.

- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.
3. Freida Carson: Histotechnology, 3<sup>rd</sup> edition, 2017.

## 30. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM 3 MÀU CỦA MASSON (1929)

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả và hướng dẫn quy trình, cách thực hiện và chẩn đoán kỹ thuật nhuộm nhuộm ba màu theo Masson (1929)

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật nhuộm Masson được sử dụng để nhuộm mô liên kết, nơi nó cho phép phân biệt giữa các thành phần của mô như collagen, cái sợi cơ, và các thành phần khác.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý: 01

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

##### Vật tư, hóa chất nhuộm tự động

- Lamen , keo gắn lamen
- Lam kính có chất chống bong
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Dung dịch tẩy nền
- Dung dịch dầu khoáng
- Dung dịch rửa
- Bộ kít nhuộm 3 màu Masson
- Cồn 70<sup>0</sup>, 80<sup>0</sup>, 95<sup>0</sup>, 100<sup>0</sup>
- Xylen hoặc Toluen
- Keo gắn

##### Vật tư, hóa chất nhuộm tay:

- Lamen , keo gắn lamen
- Lam kính sạch
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Cồn 70<sup>0</sup>, 80<sup>0</sup>, 95<sup>0</sup>, 100<sup>0</sup>
- Xylen hoặc Toluen
- Cồn – acid 1%

- Hematoxylin
- Ione, sodium thiosulfat.

a. Dung dịch A

Acid fuchsin                    0,5g

Acid acetic (rất lạnh) 0,5ml

Nước cất                        100ml

b. Dung dịch B

Acid Photphomolybdic        1,0g

Nước cất                        100ml

c. Dung dịch C

Xanh methyl                    2,0g

Acid acetic rất lạnh        2,5ml

Nước cất                        100ml

### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lát mỏng
- Kính hiển vi quang học
- Tủ âm
- Tủ hút
- Máy nhuộm đặc biệt

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Mẫu bệnh phẩm là mẫu mô đã vùi paraffin

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 giờ**

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh**

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn Phòng xét nghiệm

## 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 4.1. Các bước thực hiện

#### Nhuộm tự động:

- Bước 1: Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm

- Bước 2: Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- Bước 3: Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- Bước 4: Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### Nhuộm tay:

- Bước 1: Tẩy parafin bằng 3 bểtoluen (xylen), mỗi bể 2 phút.
- Bước 2: Chuyển vào các bể còn 100°, 95°, 80° mỗi bể 2 phút.
- Bước 3: Rửa Bước trong nước cất 3 - 5 phút
- Bước 4: Loại bỏ vết thuỷ ngân (nếu có) trong mảnh cắt bằng iodine, sau đó bằng

sodium thiosunfat.

- Bước 5: Rửa dưới vòi nước chảy.
- Bước 6: Nhuộm nhân bằng hematoxylin.
- Bước 7: Biệt hoá bằng cồn - acid 1%.
- Bước 8: Rửa kỹ dưới vòi nước chảy.
- Bước 9: Nhuộm bằng dung dịch A (acid fuchsin) x 5 phút.
- Bước 10: Rửa bằng nước cất.
- Bước 11: Xử lý bằng dung dịch B (acid photphomolybdic) x 5 phút.
- Bước 12: Làm ráo nước.
- Bước 13: Nhuộm bằng dung dịch C (xanh methyl) x 2-5 phút.
- Bước 14: Rửa bằng nước cất.
- Bước 15: Xử lý bằng acid acetic 1% x 2 phút.
- Bước 16: Đẩy nước bằng cồn 95° và 100°
- Bước 17: Làm trong tiêu bản bằng 3 bểtoluen sạch
- Bước 18: Gắn lá kính

#### Kết quả:

Bác sĩ giải phẫu bệnh phân tích kết quả nhuộm trên kính hiển vi quang học:

- Nhân: Xanh da trời- đen
- Bào tương, sợi cơ và hồng cầu: Đỏ
- Sợi tạo keo: Xanh da trời

#### **4.2. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ bằng theo quy định tại cơ sở

#### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.
  - + Khả năng bắt màu phẩm nhuộm tốt trong trường hợp mảnh cắt mô được cố định trong clorua thủy ngân hoặc trong acid picric.
  - + Nếu mảnh cắt mô được cố định trong dung dịch formol trung tính, dung dịch Bouin, có khả năng nhuộm màu do hoạt động như chất gắn màu.
  - + Nếu mảnh cắt bắt màu quá đỏ, cần biệt hóa trong dung dịch acid acetic 1% được hòa lẫn với 0,7g acid photphotungstic

#### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

#### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.
3. Freida Carson: Histotechnology, 3<sup>rd</sup> edition, 2017.

### **31. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM MAY – GRUNWALD – GIEMSA CHO TUÝ XƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả và hướng dẫn quy trình, cách thực hiện và chẩn đoán kỹ thuật nhuộm May – Grunwald – Giemsa cho tuỷ xương

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Đây là sự kết hợp giữa hai phương pháp nhuộm Giemsa và May-Grünwald. Hỗn hợp thuốc nhuộm Giemsa và May-Grünwald là sự kết hợp của hỗn hợp có tính acid và kiềm của eosin lẫn xanh metylen. Độ pH là yếu tố quan trọng, ảnh hưởng đến chất lượng phiến đồ, bất kỳ sự thay đổi pH nào đều có thể dẫn đến tính chất bắt màu của các tế bào bị sai lệch, do đó, độ pH thích hợp được khuyến cáo là từ 6,5 - 6,8.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý: 01

#### **2.2. Vật tư, hóa chất**

##### **Vật tư, hóa chất nhuộm tự động**

- Lamen , keo gắn lamen
- Lam kính có chất chống bong
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Dung dịch tẩy nến
- Dung dịch dầu khoáng
- Dung dịch rửa
- Bộ kít nhuộm May – Grunwald – Giemsa
- Cồn 70<sup>0</sup>, 80<sup>0</sup>, 95<sup>0</sup>, 100<sup>0</sup>
- Xylen hoặc Toluene

##### **Vật tư, hóa chất nhuộm tay**

- Lamen , keo gắn lamen
- Lam kính sạch.
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Cồn 70<sup>0</sup>, 80<sup>0</sup>, 95<sup>0</sup>, 100<sup>0</sup>
- Xylen hoặc Toluene
- Dung dịch May-Grünwald mè (giữ được 2 tuần):  
+ Eosin - xanh metylen 1g

+ Cồn tuyệt đối (metanol) 100ml

- Dung dịch nhuộm:

+ May - Grünwald mè: 40ml

+ Cồn metanol tuyệt đối: 20ml

- Pha dung dịch Giemsa:

+ Giemsa mè: 10ml

+ Nước cất: 90ml

### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lát mỏng

- Kính hiển vi quang học

- Tủ âm

- Tủ hút

- Máy nhuộm đặc biệt

- Máy đo pH

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Mẫu bệnh phẩm là mẫu mô đã vùi paraffin

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 giờ**

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh**

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn Phòng xét nghiệm

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

**Nhuộm tự động:**

- Bước 1: Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm

- Bước 2: Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm

- Bước 3: Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- Bước 4: Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### **Nhuộm tay:**

- Bước 1: Tiêu bản tẩy paraffin bằng xylen và cồn
- Bước 2: Rửa nước
- Bước 3: Dung dịch May - Grünwald: 5 phút
- Bước 4 Nước chảy: 1 phút
- Bước 5: Dung dịch Giemsa: 10 -20 phút
- Bước 6: Đèn khô tự nhiên
- Bước 7: Gắn bôm

#### **Kết quả:**

Bác sĩ giải phẫu bệnh phân tích kết quả nhuộm trên kính hiển vi quang học:

- Các thành phần có tính acid của tế bào bắt màu xanh (xanh metylen).
- Các thành phần kiềm của tế bào bắt màu đỏ da cam.
- Hồng cầu: màu hồng tím đến trung bình, không có màu xám hoặc màu xanh.
- Bạch cầu đa nhân trung tính màu xanh đậm, nhân tím hay đỏ tím hoa cà, bào tương màu hồng nhạt.
- Bạch cầu ái toan: màu xanh đến màu xanh đậm với nhân màu tím, bào tương màu xanh
- Bạch cầu ái kiềm: có thể bắt màu tím đến xanh đậm, nhân màu đen.
- Lymphô bào và bạch cầu đơn nhân: màu tím đậm, bào tương màu xanh da trời.
- Tiếu cầu: màu tím.
- Các tế bào biểu mô: nhân màu xanh, bào tương hồng hay phớt hồng.
- Các vi khuẩn: màu xanh.

#### **4.2. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định tại cơ sở

#### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.
  - Tuân thủ đúng độ pH của phẩm nhuộm từ 6,5 - 6,8. Nếu độ pH kiềm quá hay acid quá đều gây sai lạc tính chất bắt màu của các tế bào. Bởi vậy, cần kiểm tra độ pH trước khi nhuộm. Nếu độ pH thấp, cần điều chỉnh bằng dung dịch đệm có pH 7,2.
  - Cần tuân thủ thời gian nhuộm, nếu thời gian nhuộm ngắn hoặc quá dài đều

ảnh hưởng đến chất lượng chẩn đoán. Nếu sử dụng Giemsa R (nhanh), thời gian nhuộm khoảng 10 phút.

- Phiến đồ nếu dàn không đều sẽ làm ảnh hưởng đến kết quả nhuộm ở những vùng tế bào chồng chất nhau, do vậy, phiến đồ cần dàn mỏng, đều trước khi nhuộm.

- Cần dùng đũa vệ sinh tay có thể gây tan hồng cầu.

- Không để phiến đồ bị khô ở bất kỳ bước nhuộm nào.

- Rửa phiến đồ không đúng cách sẽ gây ra các dấu hiệu giả (artifacts), do đó cần rửa phiến đồ dưới vòi nước chảy.

- Độ pH của nước rửa có thể ảnh hưởng mạnh tới tính chất bắt màu của các tế bào. Nếu độ pH kiềm quá, sẽ làm tăng màu xanh và nếu độ pH acid, sẽ làm tăng màu hồng đỏ của các tế bào khi nhuộm.

- Phẩm nhuộm May-Grünwald - Giemsa rất dễ cháy và độc với da, đường hô hấp, đường tiêu hóa (nếu chẳng may nuốt phải). Bởi vậy, phải đóng kín miệng lọ phẩm nhuộm, tránh xa lửa, không hút thuốc trong khi nhuộm. Khi tiến hành nhuộm, cần có khẩu trang, găng tay bảo hộ. Nếu chẳng may khi tiếp xúc, cảm thấy nguy hiểm cần khám và tư vấn bác sĩ.

- Không sử dụng phẩm nhuộm khi đã hết hạn sử dụng, do vậy, cần kiểm tra hạn dùng của phẩm nhuộm trước khi tiến hành nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.

- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.

2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## **32. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM SOU DAN III HOẶC IV**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả và hướng dẫn quy trình, cách thực hiện và chẩn đoán kỹ thuật nhuộm Soudan III hoặc IV trong dung dịch Ethanol

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Nhận dạng các lipid ký nước ở trạng thái lỏng theo cơ chế vật lý vật chuyển một thể có màu (lysochrom) từ dung môi hòa tan (cồn, diacetin, propylen, ethylen glycol, v.v...) vào trong lipid ở trạng thái lỏng

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ : 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý: 01

#### **2.2. Vật tư, hóa chất**

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lam kính sạch
- Lamen
- Giấy thấm, gạc sạch
- Bút chì để ghi tên tuổi bệnh nhân
- Chổi lông mềm
- Phẩm nhuộm Soudan III hoặc IV trong Ethanol

Soudan III hoặc IV: 1g

Ethanol 70%: 50ml

Aceton: 50ml

Bảo quản trong lọ nút kín, lọc trước khi sử dụng

- Gel cắt lạnh
- Cồn tuyệt đối
- Găng lá kính: Glycerogel hoặc siro Apathy

#### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lạnh ở trạng thái sẵn sàng hoạt động
- Dụng cụ phẫu tích bệnh phẩm
- Tủ ám

- Tủ hút
- Kính hiển vi quang học

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Bệnh phẩm sau khi lấy ra khỏi cơ thể phải gửi ngay đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh (không cố định)

- Kỹ thuật viên tiếp nhận, ghi thông tin,

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:** 2 giờ

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn Phòng xét nghiệm

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **Bước 1: Làm lạnh mẫu bệnh phẩm và cắt mảnh**

- Đặt mẫu bệnh phẩm vào gá đúc lạnh rồi đưa ngay vào vị trí tương ứng trên thanh làm lạnh trong buồng lạnh của máy, phủ gel cắt lạnh, chờ cho đến khi khôi bệnh phẩm đông cứng.

- Mẫu mô sau khi đông cứng được cắt lát mỏng dày 10-15 $\mu$ m

- Cố định mảnh mô (để giữ nguyên hình dáng và bắt màu thuốc nhuộm): cố định bằng cồn tuyệt đối

#### **Bước 2: Tiến hành nhuộm**

- Mảnh cắt rửa trong nước cắt

- Ngâm mảnh cắt vào ethanol 70% vài giây.

- Ngâm vào trong dung dịch bão hòa Soudan trong cồn 70% trong 5 phút (có thể

dùng dung dịch Herxheimer).

- Ngâm nhiều lần trong ethanol 70% cho đến khi không còn vết của phẩm nhuộm thôi ra nữa.

- Rửa nước cắt.

- Nhuộm nhân bằng Hemalun hoặc xanh lơ toluidin 0,5%.
- Rửa nước cất.
- Gắn glyxerogel hoặc sirô Apathy

#### **4.4. Diễn giải và báo cáo**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

#### **4.2. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ bằng File mềm và sổ sách tại Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh thực hiện

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- Mảnh cắt bị co lại: nhiệt độ máy cắt lạnh không đủ lạnh, để lâu hơn hoặc sử dụng bình xịt làm lành nhanh

- Thời gian nhuộm điều chỉnh sao cho phù hợp

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.
3. Freida Carson: Histotechnology, 3<sup>rd</sup> edition, 2017.

### **33. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM OIL RED O TRONG DUNG DỊCH ETHANOL**

#### **1. ĐẠI CƯƠNG**

##### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Oil red O để phát hiện chất béo.

##### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Oil red O là một thuốc nhuộm nhóm Diazo có khả năng hòa tan cao trong chất béo. Oil red O được hòa tan trong dung dịch còn khi tiếp xúc với mô giàu chất béo, thuốc nhuộm này rời khỏi dung môi và di chuyển đến mô mỡ. Kỹ thuật nhuộm này thực hiện trên bệnh phẩm tươi do chất béo sẽ bị mất đi trong quá trình xử lý mô thông thường. Kỹ thuật nhuộm Oil red O cho phép nhuộm cả nhân của tế bào tồn thương, nên rất có lợi cho việc nhận định cấu trúc mô học.

#### **2. CHUẨN BỊ**

##### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

##### **2.2. Vật tư, hóa chất**

###### **2.2.1. Vật tư**

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen, lam kính
- Giấy thấm, gạc sạch
- Bút chì để ghi tên tuổi bệnh nhân
- Chổi lông mềm

###### **2.2.2 Hóa chất**

- Dung dịch Oil red O -Isopropyl.

Oil red O: 0.5g

Cồn isopropyl tuyệt đối 100ml

Để dung dịch này qua đêm

- Dung dịch Dextrin

Dextrin: 1g

Nước cất: 100ml

- Hóa chất nhuộm:

Dung dịch Oil red O -Isopropyl: 60ml

Dextrin: 40ml

- Dung dịch gắn Lamen thích hợp.

### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lạnh
- Dụng cụ phẫu tích bệnh phẩm
- Các bể nhuộm, giá nhuộm
- Máy hút ẩm
- Tủ hút
- Kính hiển vi quang học

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Bệnh phẩm sau khi lấy ra khỏi cơ thể phải gửi ngay đến phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh (không cố định)

- Kỹ thuật viên tiếp nhận, ghi thông tin.

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:** 1,5 giờ

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm .

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1 Các bước thực hiện**

#### **4.1.1 Phẫu tích bệnh phẩm**

- Bác sĩ quan sát, mô tả một số đặc điểm của bệnh phẩm (số lượng, kích thước, tính chất...), xác định vùng tổn thương cần lấy mẫu cắt lạnh.

#### **4.1.2 Làm lạnh mẫu bệnh phẩm và cắt mảnh**

- Đặt mẫu bệnh phẩm vào giá đúc lạnh rồi đưa ngay vào vị trí tương ứng trên thanh làm lạnh trong buồng lạnh của máy, phủ gel cắt lạnh, chờ cho đến khi khôi bệnh phẩm đông cứng.

- Mẫu mô sau khi đông cứng được lấy mặt phẳng bởi các lát cắt 10-15 $\mu$ m, sau

đó điều chỉnh độ dày về 2-5micromet.

- Kết hợp với chổi lông mềm dàn mảnh mô lên phiến kính.
- Cố định mảnh mô: để khô ở nhiệt độ phòng

#### **4.1.3 Nhuộm mảnh cắt**

- Đặt các mảnh cắt lạnh trực tiếp vào dung dịch Oil red O -Isopropyl trong 20 phút.
    - Rửa tiêu bản trong nước chảy.
    - Nhuộm đôi màu bằng Gill II Hematoxylin x 30 giây
    - Rửa tiêu bản trong nước chảy
    - Gắn lamen bằng dung dịch gắn.
- Kết quả: + Chất béo:đỏ  
+Nhân:xanh

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ theo quy định tại cơ sở.

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- Mảnh cắt bị co lại: nhiệt độ máy cắt lạnh không đủ lạnh, để lâu hơn hoặc sử dụng bình xịt làm lạnh nhanh
  - Màu sắc nhân và chất béo quá đậm hoặc quá nhạt: Điều chỉnh thời gian nhuộm sao cho phù hợp.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 34. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM ĐEN SOUDAN B TRONG DIACETIN

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm đen Soudan B trong Diacetin

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nhận dạng các lipid ký nước ở trạng thái lỏng theo cơ chế vật lý vật chuyển một thể có màu (lysochrom) từ dung môi hòa tan (cồn, diacetin, propylen, etylen glycol, v.v...) vào trong lipid ở trạng thái lỏng

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

##### 2.2.1. Vật tư

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Chổi lông mềm
- Lam kính sạch, lamen
- Bút chì (để ghi tên tuổi bệnh nhân)
- Giấy thấm, gạc sạch
- Gel cắt lạnh
- Găng tay, khẩu trang, mũ

##### 2.2.2 Hóa chất

- Cồn tuyệt đối
- Phẩm nhuộm Đen Soudan B trong diacetin, Kernechtrol
- Dung dịch gắn lamen.

#### 2.3. Trang thiết bị

- Máy cắt lạnh.
- Dụng cụ phẫu tích bệnh phẩm
- Các bể nhuộm, giá nhuộm
- Máy hút ẩm
- Tủ hút

- Kính hiển vi quang học

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Bệnh phẩm sau khi lấy ra khỏi cơ thể phải gửi ngay đến phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh (không cố định)

- Kỹ thuật viên tiếp nhận, ghi thông tin

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:** 2 giờ

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1 Các bước thực hiện**

##### **4.1.1 Phẫu tích bệnh phẩm**

- Bác sĩ quan sát, mô tả một số đặc điểm của bệnh phẩm (số lượng, kích thước, tính chất...), xác định vùng tổn thương cần lấy mẫu cắt lạnh.

##### **4.1.2 Làm lạnh mẫu bệnh phẩm và cắt mảnh**

- Đặt mẫu bệnh phẩm vào giá đúc lạnh rồi đưa ngay vào vị trí tương ứng trên thanh làm lạnh trong buồng lạnh của máy, phủ gel cắt lạnh, chờ cho đến khi khôi bệnh phẩm đông cứng.

- Mẫu mô sau khi đông cứng được lấy mặt phẳng bởi các lát cắt 10-15 $\mu$ m, sau đó điều chỉnh độ dày về 2-5micromet.

- Kết hợp với chổi lông mềm dàn mảnh mô lên phiến kính.

- Cố định mảnh mô: để khô ở nhiệt độ phòng

##### **4.1.3 Nhuộm mảnh cắt**

- Chuyển các mảnh cắt lạnh vào dung dịch nước 50% diacetin, trong 30 giây và lắc đều.

- Nhuộm trong dung dịch Đen Soudan B vừa mới lọc trong một giờ.

- Biệt hoá nhanh (30 giây) trong dung dịch nước 50% diacetin.

- Rửa nước cát.
- Nhuộm nhân bằng Kernechtrol.
- Rửa nước cát.
- Gắn trong glycerogel hoặc sirô Apathy.

Kết quả:

+ Lipid ở trạng thái lỏng (triglycerit không bão hoà, cholesterit không bão hoà, acid béo không bão hoà, glycolipid và photpholipid) bắt màu đen.

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học: Lipid ở trạng thái lỏng (triglycerit không bão hoà, cholesterit không bão hoà, acid béo không bão hoà, glycolipid và photpholipid) bắt màu đen.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định tại cơ sở.

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- Mảnh cắt bị co lại: nhiệt độ máy cắt lạnh không đủ lạnh, để lâu hơn hoặc sử dụng bình xịt làm lành nhanh

- Thời gian nhuộm điều chỉnh sao cho phù hợp

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.  
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 35. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GROCOTT

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Grocott

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật này dùng để phát hiện nấm, pneumocystis carinii dựa theo nguyên lý kỹ thuật Gomori trong bạc – methenamine. Nguyên lý chung của phản ứng gần giống với nguyên lý trong phản ứng PAS: nhóm các chất phản ứng bị oxy hóa bằng acid chromic hoặc permanganate sẽ tạo ra các aldehyd và người ta có thể phát hiện ra các aldehyd này nhờ vào hiện tượng thủy phân phức chất bạc - methenamine.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

##### 2.2.1. Vật tư

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen , pipet 1 lần
- Lam kính

##### 2.2.2 Hóa chất

\* Hoá chất dùng để nhuộm thủ công:

- Dung dịch tẩy nến ( Xylen hay toluen...)
- Cồn (70<sup>0</sup>, 80<sup>0</sup>, 95<sup>0</sup>, tuyệt đối)
- Dung dịch acid chromic 5%
- Dung dịch bisunfit Na 1%
- Dung dịch bạc – methenamin
- Dung dịch chlorua vàng
- Dung dịch hyposunfit Na 2%
- Dung dịch Vert lumière
- Dung dịch bạc – methenamin
- Keo gắn lamen

\* Hoá chất dùng cho nhuộm máy

- Bộ kít nhuộm Grocott dành cho máy nhuộm tự động

### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- Kính hiển vi quang học
- Bề nhuộm, giá nhuộm
- Máy hút ẩm
- Tủ an toàn sinh học.
- Máy nhuộm đặc biệt tự động

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được vùi trong paraffin

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.
- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.
- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 giờ**

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh**

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm .

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm

- \* Đối với quy trình nhuộm thủ công
  - + Các mảnh cắt được tẩy parafin qua 3 bểtoluen (hoặc xylen), mỗi bể 2 phút
  - + Chuyển vào các bể còn 100°, 95°, 80° mỗi bể 2 phút
  - + Rửa trong nước cất 3 - 5 phút
  - + Oxy hóa trong dung dịch acid chromic 5% trong 1 giờ
  - + Rửa nước chảy 2 - 3 phút

- + Rửa trong dung dịch bisunfit Na 1% trong 1phút
- + Rửa qua nước chảy: 5 - 10 phút
- + Rửa trong 3 - 4 bể nước cát: mỗi bể 5 lần nhúng
- + Ngâm trong dung dịch bạc - methenamin ở nhiệt độ  $58^{\circ}$  khoảng 30 - 60 phút cho đến khi mảnh cắt có màu vàng nâu
- + Lấy mảnh cắt ra, ngâm trong nước cát. Kiểm tra màu sắc dưới kính hiển vi.
- + Rửa trong 6 bể nước liên tiếp, mỗi bể 5 lần nhúng.
- + Thúc trong dung dịch chlorua vàng trong 2 - 5 phút
- + Rửa trong nước cát
- + Loại bỏ bạc thừa bằng dung dịch hyposunfit Na 2% trong 2 - 5 phút
- + Rửa nước thật kỹ
- + Nhuộm nền bằng xanh lá cây sáng: 30 - 50 giây
- + Đẩy nước bằng cồn  $95^{\circ}$  và  $100^{\circ}$
- + Làm trong bằng 3 bểtoluen sạch
- + Gắn lamen bằng chất gắn
- \* Đối với quy trình nhuộm máy tự động
  - Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm (nếu sử dụng máy nhuộm tự động)
    - Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
    - Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

### Kết quả:

Bác sĩ giải phẫu bệnh đánh giá kết quả trên kính hiển vi quang học:

- + Nấm: màu nâu đen - đen
- + Chất nền: xanh nhạt
- + Chất nhầy: màu ghi đậm.

### 4.2. Nhận định kết quả.

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học.

### 4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

## 5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ

- + Khi nhuộm, cần có mảnh cắt chứng đã có thành phần nấm dương tính với phẩm nhuộm này. Nếu mảnh cắt âm tính giả, nên kiểm tra hạn dùng của dung dịch bạc - methenamin để thay dung dịch mới hoặc để thời gian nhuộm lâu hơn.
- + Trong bước 9 của quy trình nhuộm, dung dịch methenamin được chuẩn bị ngay trước khi sử dụng và cần hâm nóng đến  $58^{\circ}\text{C}$  bằng cách nhanh nhất, mảnh cắt

sẽ được tráng màu nâu vàng bằng dung dịch bạc - methenamin và được kiểm tra mức độ bắt màu.

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá.
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 36. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM XANH PHỒ PERL PHÁT HIỆN ION SẮT

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Xanh Perl

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phản ứng Perl là một trong phản ứng hóa mô kinh điển đầu tiên. Mảnh mô được xử lý bằng dung dịch acid ferrocyanit sẽ bộc lộ ion sắt dưới dạng hydroxide  $[Fe(OH)_3]$  bằng cách hòa tan acid hydrochloric. Sau đó, ion sắt phản ứng với dung dịch ferrocyanide kali để tạo ra phức màu xanh không hòa tan là ferrocyanide sắt (màu xanh phồ)

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

##### 2.2.1. Vật tư

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen , pipet 1 lần
- Lam kính

##### 2.2.2. Hóa chất

\* Hoá chất dùng để cho nhuộm thủ công:

- Dung dịch tẩy nến ( Xylen hay toluen...)
- Cồn ( $70^0$ ,  $80^0$ ,  $95^0$ , tuyệt đối)
- 1% dung dịch nước ferrocyanid kali
- 2% dung dịch nước acid hydrochloric
- dung dịch (fast red) 0,1%.

- Nước cất

- Keo gắn lamen

\* Hoá chất dùng cho nhuộm máy

- Bộ kít nhuộm Grocott dành cho máy nhuộm tự động

#### 2.3. Trang thiết bị

- Máy cắt lát mỏng

- Tủ âm
- Tủ hút
- Kính hiển vi quang học
- Bể nhuộm, giá nhuộm
- Máy hút âm
- Tủ an toàn sinh học.
- Máy nhuộm đặc biệt tự động

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trùn vùi paraffin

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:** 2 giờ

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Tiến hành kỹ thuật**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm

\* Đối với quy trình nhuộm thủ công

+ Tẩy parafin mảnh cắt bằng 3 bểtoluen (hoặc xylen), mỗi bể 2 phút

+ Chuyển vào các bể cồn  $100^\circ$ ,  $95^\circ$ ,  $80^\circ$  mỗi bể 2 phút

+ Rửa trong nước cắt 3 - 5 phút

+ Xử lý mảnh cắt bằng dung dịch acid ferrocyanid mới pha x 30 phút

+ Rửa kỹ trong nước cắt

+ Nhuộm nhạt nhân bằng dung dịch đỏ trung tính 0,5% hoặc đỏ nhanh (fast red) 0,1%.

+ Rửa nhanh trong nước cắt.

- + Đẩy nước bằng cồn 95° và 100°.
- + Làm trong bằng 3 bểtoluen sạch, Gắn lamen
- \* Đổi với quy trình nhuộm máy tự động
- + Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- + Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- + Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học:

- + Ion sắt: xanh
- + Nhân: đỏ

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- + Nên chuẩn bị dung dịch nhuộm ngay trước khi sử dụng do dung dịch acid hydrochloric mới pha sẽ có tác dụng hiệu quả hơn để tách liên kết protein với ion sắt, đồng thời, nên có mảnh cắt chứng nhuộm với nước.
- + Trong bước 7, nếu sử dụng vòi nước chảy để rửa sẽ làm cho nền tiêu bản có màu đỏ và sẽ mất độ tương phản của nhân tế bào.

Bước 9 có tác dụng biệt hóa màu đỏ khi khử nước.

- + Nên tránh các chất cố định có acid hoặc dichromate hoặc các dung dịch acid dùng để khử calci. Các chất phản ứng như vậy có thể làm mất khả năng thủy phân ion sắt của mô, tạo ra kết quả âm tính giả.
- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## **37. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM BẠC WARTHIN – STARY PHÁT HIỆN HELICOBACTER PYLORI**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm bạc Warthin - Stary

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Kỹ thuật này dùng để phát hiện xoắn khuẩn và Helicobacter pylori cùng một số loại vi khuẩn khác. Cơ sở của kỹ thuật là dựa vào khả năng của một số vi khuẩn có thể gắn với ion bạc có trong dung dịch. Sau bước gắn ion bạc, mảnh mô được tiếp xúc với chất khử hydroquinon, nhờ đó, các ion bạc đã gắn với mô và vi khuẩn có thể chuyển ngược trở thành bạc kim loại nhín thấy được. Trước khi nhuộm, mảnh mô được xử lý làm tăng tính mẫn cảm với phức hợp bạc. Dung dịch nước của bạc nitrat có gia thêm chất khử hydroquinon để giúp tạo ra phức hợp diamin bạc.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

#### **2.2. Vật tư, hóa chất**

##### **2.2.1. Vật tư**

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen , pipet 1 lần
- Lam kính

##### **2.2.2. Hóa chất**

\* Hoá chất dùng để cho nhuộm thủ công :

- Dung dịch tẩy nến ( xylen hay toluen...)
- Cồn ( $70^0$ ,  $80^0$ ,  $95^0$ , tuyệt đối)
- Dung dịch acid acetic 1,2%
- Dung dịch bạc nitrat 6%

\* Hoá chất dùng nhuộm máy:

- Dung dịch tẩy nến ( xylen hoặc toluen..)
- Dung dịch rửa
- Bộ kít nhuộm - Bộ kít nhuộm Warthin - Stary

#### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- Kính hiển vi quang học
- Bề nhuộm, giá nhuộm
- Máy hút ẩm
- Tủ an toàn sinh học.
- Máy nhuộm đặc biệt tự động

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trong vùi paraffin

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.

- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

#### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 giờ**

#### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh**

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh.

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm

\* Đối với quy trình nhuộm thủ công:

+ Tẩy parafin mảnh cắt bằng 3 bểtoluen (xylen), mỗi bể 2 phút

+ Chuyển vào các bể còn 100°, 95°, 80° mỗi bể 2 phút

+ Rửa nước

+ Nhấn chìm mảnh cắt trong bể nước đã làm mất ion (bể đựng nước này phải rửa sạch).

+ Ủ trong bạc nitrat 1% ( $\text{AgNO}_3$ ) x 30 – 60 phút ở nhiệt độ 45 - 60°C.

+ Chuẩn bị thuốc hiện hình (developer).

- + Ủ trong thuốc hiện hình 1 phút ở 56°C.
- + Soi kiểm tra sự bắt màu trên kính hiển vi.
- + Rửa dưới voi nước âm để ngừng phản ứng.
- + Rửa bằng nước cát nóng ở 56°C.
- + Rửa bằng nước cát lạnh.
- + Ủ trong sodium thiosunfat 2 – 5% x 1 phút.
- + Rửa bằng nước cát.
- + Làm mất nước nhanh bằng cồn 95° và cồn tuyệt đối
- + Làm trong bằng 3 bểtoluen sạch ,gắn lamen bằng bôm Canada
- \* Đổi với quy trình nhuộm máy
  - + Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
  - + Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
  - + Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học:

- + Vị khuẩn:      đen
- + Mô nền:       vàng tươi

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- + Cần thay đổi thời gian tráng khác nhau tùy mảnh cắt để có thể đạt kết quả tối đa.
- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Pratical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 38. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM SẮT CAO

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Diamine sắt cao

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật diamin sắt cao được coi là kỹ thuật chuẩn để phát hiện các chất nhày có nhóm sunfat. Nguyên lý của phương pháp: một hỗn hợp các muối diamin được oxy hoá bằng clorua sắt hình thành một chất màu đen, liên kết với các nhóm sunfat este. Bằng cách nhuộm tương phản với xanh alcian (mà chỉ nhuộm các chất nhày carboxyl hoá), đã phân biệt được rõ về màu sắc giữa 2 nhóm chính của chất nhày acid. Một điều đáng chú ý, đó là các chất nhày sunfat của các tuyến phế quản đường nhuyễn không phản ứng với hỗn hợp diamin clorua sắt..

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y : 01
- Hộ lý: 01

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

##### 2.2.1. Vật tư

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen , pipet 1 lần
- Lam kính

##### 2.2.2 Hóa chất

\* Hoá chất dùng để cho nhuộm thủ công :

- Dung dịch tẩy nến ( Xylen hay toluen...)
- Cồn ( $70^0$ ,  $80^0$ ,  $95^0$ , tuyệt đối)
- Sodium photphat monobasic
- Sodium photphat dibasic (khan: anhydrous)
- Xanh alcian
- Acid acetic
- Đỏ trung tính.
- N,N - dimethyl - meta - phenylenediamin - dihydrochlorit.
- N,N - dimethyl - para - phenylenediamine- dihydrochlorit.

- Clorua sắt
- Nước cất 2 lần.
- \* Hoá chất dùng để nhuộm máy
- Bộ kít nhuộm Diamine sắt cao

### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- KHV quang học
- Bề nhuộm, giá nhuộm
- Máy hút âm
- Tủ an toàn sinh học.
- Máy nhuộm đặc biệt tự động

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trùn vùi paraffin

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.
- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.
- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 giờ**

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh.**

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh.

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm
  - \* Đối với quy trình nhuộm thủ công
  - Để khô mảnh cắt ở tủ 37°C, 12 giờ trước khi nhuộm.
  - Các mảnh cắt làm chứng và các mảnh cắt cần nhuộm được tẩy parafin, qua

còn, rửa nước và rửa nước cát.

- Nhúng các mảnh cắt trong dung dịch diamin 18-24 giờ.
- Rửa kỹ trong nước chảy.
- Nhuộm tương phản (nếu cần thiết) bằng xanh alcian 1% trong acid acetic 3% trong 5 phút.
- Nhuộm nhân bằng đỏ trung tính 0,5% trong 2-3 phút.
- Rửa qua nước.
- Tẩy nước bằng cồn tuyệt đối.
- Làm trong bằng xylen và gắn lamen bằng bôm Canada.
- \* Đổi với quy trình nhuộm máy
  - Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
  - Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
  - Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học:

- Sulfat mucin : đen-nâu
- Carboxylate mucin : xanh
- Nhân : đỏ.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Pratical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 39. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GOMORI CHO SỢI VÕNG

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Gomori cho sợi võng

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa vào tính ưa bạc của sợi võng, người ta đã sử dụng phương pháp nhuộm tẩm/ngâm bạc để phát hiện loại sợi đặc biệt này. Hai phương pháp nhuộm sợi võng thông dụng nhất là Gomori và Gordon – Sweet. Bước đầu tiên của quy trình là thực hiện oxy hóa chất đường hexose có trong sợi võng để tạo ra aldehyt. Bước tiếp theo làm “tăng độ nhạy” do lắng đọng thành phần kim loại (ammonium sunfat) quanh sợi võng. Hiện tượng tẩm/ngâm bạc xảy ra khi dung dịch bạc diamin hoặc bạc ammoniac bị oxy hóa tạo ra aldehyt. Oxy hóa tiếp theo của bạc diamin khi mảnh cắt được chuyển vào trong formaldehit. Bước này được gọi là “tráng bạc”. Sau cùng, kim loại vàng có trong clorua vàng đã thay thế kim loại bạc để làm tăng độ “sắc nét” sợi võng, làm chúng chuyển từ màu nâu sang màu đen.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y : 01
- Hộ lý: 01

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

##### 2.2.1. Vật tư

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen , pipet 1 lần
- Lam kính

##### 2.2.2 Hóa chất

\* Hoá chất dùng cho nhuộm thủ công:

- Dung dịch tẩy nến ( xylen hoặc toluen...)
- Cồn 70°, 80°, 95°, cồn tuyệt đối
- Formalin 4%
- Dung dịch permanganat kali 1%
- Dung dịch metabisunfat kali 2%
- Dung dịch phèn sắt (iron alum) 2%
- Dung dịch bạc

- Dung dịch clorua vàng 0,2%
- Dung dịch metabisunfat kali 2%
- Dung dịch sodium thiosunfat 2%
- Phẩm nhuộm van Gieson hoặc eosin
- \* Hoá chất dùng cho nhuộm mày:
- Bộ kít nhuộm Gomori

### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- Kính hiển vi quang học
- Khay, giá, cốc đựng phẩm nhuộm
- Máy nhuộm đặc biệt.

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trong vùi paraffin

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.
- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.
- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 giờ**

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh**

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm .

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm
  - \* Đối với quy trình nhuộm thủ công:
    - + Tẩy parafin các mảnh cắt bằng 3 bểtoluen (xylen), mỗi bể 2 phút.
    - + Chuyển vào các bể cồn 100°, 95°, 80° mỗi bể 2 phút.

- + Rửa trong nước cát 3 – 5 phút.
- + Xử lý bằng dung dịch permanganat kali 1% x 2 phút.
- + Rửa dưới voi nước chảy.
- + Làm trắng trong dung dịch metabisulfat kali 2% .
- + Rửa dưới voi nước chảy.
- + Xử lý bằng dung dịch phèn sắt (iron alum) 2% x 2 phút.
- + Rửa vài lần bằng nước cát.
- + Đặt mảnh cát vào trong bình Coplin đựng dung dịch bạc x 1 phút.
- + Rửa vài lần bằng nước cát.
- + Khử bằng dung dịch formalin 4% x 3 phút.
- + Rửa dưới voi nước chảy.
- + Làm sắc nét bằng dung dịch clorua vàng 0,2% x 10 phút.
- + Rửa dưới voi nước chảy.
- + Xử lý bằng dung dịch metabisulfat kali 2% x 1 phút.
- + Rửa dưới voi nước chảy.
- + Xử lý bằng dung dịch sodium thiosulfat 2% x 1 phút.
- + Rửa dưới voi nước chảy.
- + Nhuộm đổi màu bằng van Gieson hoặc eosin.
- + Đẩy nước bằng cồn 95° và 100°
- + Làm trong bằng 3 bểtoluen sạch
- + Gắn lamen
- \* Đổi với quy trình nhuộm máy
- + Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- + Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- + Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học:

Sợi võng: đen xám nhạt

Nhân: xanh đen

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá

+ Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## **40. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM ORCEIN CẢI BIÊN THEO SHIKATA PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN HbsAg**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Orcein cải biến theo Shikata

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Kháng nguyên virus viêm gan B gồm 2 thành phần là kháng nguyên lõi (HBcAg) có bản chất DNA và kháng nguyên bề mặt (HBsAg) có bản chất lipoprotein. Thông thường, orcein sẽ nhuộm cầu nối disunfit có trong thành phần xistin của HBsAg; nhờ vậy, người ta có thể phát hiện được sự có mặt của virus trong tế bào gan. Kỹ thuật orcein cải biến theo Shikata có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn một số kỹ thuật orcein thông thường, đồng thời giá thành rẻ, dễ thực hiện và lợi thế của kỹ thuật là có thể thực hiện được kể cả khi mô gan đã được vùi parafin, thậm chí đã lưu trữ rất lâu, mặc dù hiện nay, cơ chế của hiện tượng nhuộm vẫn chưa hoàn toàn sáng tỏ.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y : 01
- Hộ lý: 01

#### **2.2. Vật tư, hóa chất**

##### **2.2.1. Vật tư**

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen , pipet 1 lần
- Lam kính

##### **2.2.2 Hóa chất**

- \* Dùng cho quy trình nhuộm thủ công:
  - Dung dịch tẩy nến ( xylen hoặc toluen)
  - Cồn 70°,80°,95°, tuyệt đối
  - Dung dịch nước permanganat kali 0,5%
  - Acid sunfuric đậm đặc
  - Orcein
  - Cồn etylic 70%

- HCl đậm đặc
- Dung dịch gắn lamen
- \* Dùng cho quy trình nhuộm mày : - Bộ kít nhuộm Orcein theo Shikata

### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- Kính hiển vi quang học
- Khay, giá, bể đựng phẩm nhuộm
- Máy nhuộm đặc biệt

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trong vùi paraffin

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.
- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.
- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 giờ**

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh**

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm

(\*) Đối với quy trình nhuộm thủ công:

- + Tẩy parafin các mảnh cắt bằng 3 bểtoluen (xylen), mỗi bể 2 phút.
- + Chuyển vào các bể còn 100°, 95°, 80° mỗi bể 2 phút.
- + Rửa nước.
- + Oxy hóa trong dung dịch (A): 5 phút.
- + Rửa nước

- + Làm mất màu trong oxalic acid 2%
- + Rửa bằng nước cát, sau đó rửa nước chảy 3 phút
- + Nhuộm màu bằng dung dịch orcein (B): 2 - 4 giờ
- + Rửa nước
- + Biết hóa trong dung dịch cồn 70% - HCl.
- + Làm mất nước nhanh bằng cồn 95° và cồn tuyệt đối.
- + Làm trong bằng 3 bểtoluen sạch.
- + Gắn lamen bằng dung dịch gắn.
- \* Đổi với quy trình nhuộm máy
- + Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- + Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- + Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học: Bào tương tế bào gan nhiễm virus viêm gan B: dạng thủy tinh mờ.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Pratical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## **41. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM ORCEIN PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN VIÊM GAN B (HbsAg) TRONG MÔ GAN**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Orcein.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Thông thường, virus có kích thước rất nhỏ và chỉ có thể quan sát được dưới kính hiển vi điện tử. Virus chỉ được coi là vật ký sinh khi chúng sinh sản (được nhân lên) trong tế bào vật chủ. Các tiểu phần virus nằm bên trong tế bào vật chủ được gọi là “thể vùi virus” và có thể thấy bằng kính hiển vi quang học. HBsAg (kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B) thường xuất hiện dưới dạng thể vùi trong bào tương tế bào gan. Bào tương của tế bào Kupffer cũng có thể có kháng nguyên này. Phẩm nhuộm orcein và andehit - fuscin có khả năng nhuộm cầu nối disunfit có trong thành phần cistin của HBsAg và tạo ra hình ảnh “thủy tinh mờ” của tế bào gan bị nhiễm virus.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý : 01

#### **2.2. Vật tư, hóa chất**

##### **2.2.1. Vật tư**

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen , keo gắn lamen
- Lam kính sạch.

##### **2.2.2 Hóa chất**

(\*) Đối với quy trình nhuộm thủ công

- Dung dịch tẩy nến ( xylen hoặc toluen)
- cồn 100°, 95°, 80°, cồn-acid 1%
- permanganat kali
- acid oxalic

- Acid periodic 5%

- phẩm nhuộm orcein

(\*) Đối với quy trình nhuộm máy:

- Bộ kít nhuộm Orcein

### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- Kính hiển vi quang học
- Máy nhuộm đặc biệt.
- Khay, giá, bể đựng phẩm nhuộm

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trong vùi paraffin

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.
- Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.
- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển đến Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh – tế bào học, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 giờ**

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh**

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm .

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm

(\*) Đối với quy trình nhuộm thủ công :

- + Tẩy parafin bằng 3 bể toluen (xylen), mỗi bể 2 phút
- + Chuyển vào các bể còn  $100^{\circ}$ ,  $95^{\circ}$ ,  $80^{\circ}$  mỗi bể 2 phút
- + Rửa nước
- + Oxy hóa trong permanganat kali (5 - 10 phút)
- + Rửa nước
- + Tẩy trắng trong acid oxalic (nhìn cho tới trắng)
- + Rửa nước chảy, rồi rửa lại bằng nước cất
- + Acid periodic 5% trong 5 phút

- + Rửa nước chảy, rồi rửa lại bằng nước cất
- + Nhuộm orcein trong lò vi sóng ở công suất thấp trong 30 - 45 giây, rồi tiếp tục đê nhuộm lại nếu chưa đủ màu đen.
- + Rửa trong cồn 70°.
- + Biết hóa trong cồn-acid 1% cho tới khi không còn phẩm màu chảy ra từ mảnh cắt.
- + Rửa bằng cồn 70°.
- + Làm mất nước nhanh bằng cồn 95° và cồn tuyệt đối
- + Làm trong bằng 3 bểtoluen sạch
- + Gắn lamen bằng dung dịch gắn
- (\*) Đối với quy trình nhuộm máy:
- + Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- + Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- + Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### **4.2. Nhận định kết quả.**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học:

- + Kháng nguyên HBsAg, sợi chun: đỏ tía
- + Các protein liên kết với đồng : đỏ tía sẫm
- + Nền: đỏ tía ánh nâu nhạt

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Pratical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 42. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM MUCICARMIN

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Mucicarmine.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Phương pháp nhuộm nhằm phát hiện chất nhầy từ biểu mô

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý : 01

#### **2.2. Vật tư, hóa chất**

##### **2.2.1. Vật tư**

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen.
- Lam kính sạch.

##### **2.2.2 Hóa chất**

- (\*) Đối với quy trình nhuộm thủ công
  - Dung dịch tẩy nến ( xylen hoặc toluen)
  - cồn 100°, 95°, 80°
  - dung dịch mucicarmine
  - nước cất
- (\*) Đối với quy trình nhuộm máy
  - Bộ kít nhuộm Murcamine

#### **2.3. Trang thiết bị**

- Máy cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- Kính hiển vi quang học
- Giá, khay, bể đựng phẩm nhuộm
- Máy nhuộm đặc biệt

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trùn vùi paraffin

## 2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- + Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm.
- + Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, phương pháp lấy bệnh phẩm, vị trí, số lượng bệnh phẩm.
- + Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- + Ghi ngày giờ lấy bệnh phẩm, ngày giờ chuyển phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh, có hay không có cố định bệnh phẩm sơ bộ, loại dung dịch cố định.

## 2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật: 2 giờ

## 2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật: Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

## 3. AN TOÀN

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

## 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 4.1. Các bước thực hiện

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm
  - (\*) Đối với quy trình nhuộm thủ công
    - + Loại parafin như thường lệ.
    - + Nhuộm mảnh cắt trong dung dịch mucicarmine pha loãng từ 10-15 phút hay lâu hơn.
    - + Rửa nhanh trong nước cất.
    - + Loại nước bằng cồn 80°, 95°, sau đó là cồn tuyệt đối.
    - + Làm trong bằng xylen.
    - + Gắn lamen bằng bôm Canada.
  - (\*) Đối với quy trình nhuộm máy:
    - + Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
    - + Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
    - + Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

### 4.2. Nhận định kết quả

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học: Chất nhầy màu đỏ.

### 4.3 Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

## 5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

### **43. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM MAY – GRUNWALD – GIEMSA**

#### **1. ĐẠI CƯƠNG**

##### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả và hướng dẫn quy trình, cách thực hiện nhuộm May – Grunwald – Giemsa cho tuỷ xương.

##### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Phương pháp nhuộm này áp dụng cho tất cả các phiến đồ Tế bào học chọc hút kim nhỏ, tế bào bong và phiến đồ máu. Đây là sự kết hợp giữa hai phương pháp nhuộm Giemsa và May-Grünwald. Hỗn hợp thuốc nhuộm Giemsa và May-Grünwald là sự kết hợp của hỗn hợp có tính acid và kiềm của eosin lân xanh metylen. Độ pH là yếu tố quan trọng, ảnh hưởng đến chất lượng phiến đồ, bất kỳ sự thay đổi pH nào đều có thể dẫn đến tính chất bắt màu của các tế bào bị sai lệch, do đó, độ pH thích hợp được khuyến cáo là từ 6,5 - 6,8.

#### **2. CHUẨN BỊ**

##### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

##### **2.2. Vật tư:**

- Găng tay vô trùng, khẩu trang.
- Ống hút tự động.
- Lọ đựng dịch ly tâm
- Lam kính sạch, một đầu mài mờ.
- Bút chì mềm ghi mã số người bệnh, vị trí chọc hút

##### **2.3. Hoá chất**

- Cồn methanol
- Xylen (toluen)
- Dung dịch May – Grunwald
- Dung dịch Giemsa
- Glycerin
- Keo gắn

##### **2.4. Trang thiết bị:**

- Máy ly tâm
- Giá để đựng phiến kính đã dàn bệnh phẩm.

- Các dụng cụ để nhuộm: khay, giá, cốc pha thuốc nhuộm, ống hút.
- Kính hiển vi quang học.
- Phiếu xét nghiệm ghi rõ họ và tên người bệnh, vị trí lấy dịch, số lượng dịch, màu sắc, thời gian lấy, người thực hiện kỹ thuật, số lượng phiến đồ.
- Số hoặc máy tính ghi lại thông tin của từng Người bệnh, đặc điểm tổn thương, kết quả chẩn đoán.
  - Các sọt rác đựng rác thải y tế, rác thải thường.
  - Máy đo pH.

## **2.5. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Bệnh phẩm từ chọc hút kim nhỏ, áp lam hoặc té bào bong, té bào dịch được phết trên lam kính, cố định đúng cách và gửi về phòng xét nghiệm.

## **2.6. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định; họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.7. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 45 phút.**

**2.8. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm .

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản cố định bằng cồn tuyệt đối, để khô
- Dung dịch May- Grunwald: 3-5 phút
- Rửa nước chảy 1 phút
- Giemsa 10-20 phút
- Rửa nước chảy
- Để khô

### **4.2. Nhận định kết quả**

- Về cơ bản, tính chất bắt màu của các thành phần tế bào như sau:
  - + Các thành phần có tính acid của tế bào bắt màu xanh (xanh metylen).
  - + Các thành phần kiềm của tế bào bắt màu đỏ da cam.
- Hồng cầu: màu hồng tím đến trung bình, không có màu xám hoặc màu xanh.

### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Tuân thủ đúng độ pH của phẩm nhuộm từ 6,5 - 6,8. Nếu độ pH kiềm quá hay acid quá đều gây sai lạc tính chất bắt màu của các tế bào. Bởi vậy, cần kiểm tra độ pH

trước khi nhuộm. Nếu độ pH thấp, cần điều chỉnh bằng dung dịch đệm có pH 7,2.

- Cần tuân thủ thời gian nhuộm, nếu thời gian nhuộm ngắn hoặc quá dài đều ảnh hưởng đến chất lượng chẩn đoán...

- Phẩm nhuộm May-Grünwald - Giemsa rất dễ cháy và độc với da, đường hô hấp, đường tiêu hóa (nếu chẳng may nuốt phải). Bởi vậy, phải đóng kín miệng lọ phẩm nhuộm, tránh xa lửa, không hút thuốc trong khi nhuộm. Khi tiến hành nhuộm, cần có khẩu trang, găng tay bảo hộ. Nếu chẳng may khi tiếp xúc, cảm thấy nguy hiểm cần khám và tư vấn Bác sĩ.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## **44. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM XANH TOLUIDINE**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm xanh Toluidine

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Thuốc nhuộm có ái lực cao với các thành phần mô có tính acid, do đó nhuộm các mô giàu DNA và RNA, làm nổi bật các thành phần như hạt tế bào mast, chất nhầy và sụn

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

#### **2.2. Vật tư:**

- Lưỡi dao cắt lát mỏng;
- Lam kính sạch;
- Lamen.

#### **2.3. Hoá chất**

- Dung dịch tẩy nến
- Dung dịch dầu khoáng
- Dung dịch rửa
- Bộ kít nhuộm xanh toluidine

#### **2.4. Trang thiết bị:**

- Máy cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- Kính hiển vi quang học
- Máy nhuộm đặc biệt

#### **2.5. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Bệnh phẩm từ chọc hút kim nhỏ, áp lam hoặc tế bào bong, tế bào dịch được phết trên lam kính, cố định đúng cách và gửi về phòng xét nghiệm.

## **2.6. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.7. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 1h30 phút.

**2.8. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm .

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ ám và tiến hành quy trình nhuộm

- Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học:

- + Tế bào mast: Đỏ tía;
- + Chất nền: Màu xanh.

### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.

2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Pratical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.

3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 45. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM XANH LUXOL/NISEELL

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm xanh Luxol/ Nisell.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Trong chẩn đoán bệnh lý thần kinh, cả hai kỹ thuật nhuộm Luxol và Nisseel thường được sử dụng kết hợp để cung cấp một cái nhìn toàn diện về tổn thương thần kinh.

Myelin là lớp vật liệu giàu chất béo (lipid) và protein bao bọc xung quanh sợi trục của tế bào thần kinh, hoạt động như một lớp cách điện để bảo vệ và giúp các tín hiệu thần kinh được dẫn truyền nhanh chóng, hiệu quả. Lớp bảo vệ này được tạo ra bởi các tế bào thần kinh đệm, như tế bào Schwann và tế bào oligodendrocyte.

Nhuộm xanh Luxol cho thấy thuốc nhuộm liên kết mạnh với các thành phần mỡ trong myelin, cho phép quan sát rõ ràng các vùng mất myelin dưới kính hiển vi. Trong khi nhuộm Nisseel là nhuộm màu xanh các cấu trúc chứa RNA, bao gồm cả ribosome trong các thể Nissl, giúp quan sát sự suy giảm của tế bào thần kinh, xác định mức độ và bản chất của bệnh lý.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

#### **2.2. Vật tư**

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen , keo gắn lamen.

#### **2.3. Hoá chất:**

- Dung dịch tẩy nén
- Dung dịch dầu khoáng
- Dung dịch rửa
- Bộ kít nhuộm xanh Luxol/ Nisell

#### **2.4. Trang thiết bị:**

- Máy cắt lát mỏng
- Tủ âm

- Tủ hút
- Kính hiển vi quang học
- Máy nhuộm đặc biệt

### **2.5. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trùnぐ trong vùi paraffin.

### **2.6. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.7. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 1h30 phút.

**2.8. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm .

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ ám và tiến hành quy trình nhuộm

- Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học: các sợi myelin có màu xanh lam, với các vùng có nồng độ myelin cao nhất có màu sẫm hơn. Vết nhuộm màu xanh lam xuất hiện trên nền trắng

### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

Đảm bảo chất lượng xét nghiệm theo quy định Bộ Y Tế

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.

2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Pratical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.

3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 46. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GRAM

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này giúp phát hiện các vi khuẩn có trên mẫu mô vùi nén dựa vào sự bắc màu của các vi khuẩn với thuốc nhuộm.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Khi vi khuẩn được nhuộm với thuốc nhuộm ban đầu Crystal Violet (CV-tinh thể tím) và được cố định bằng chất gắn màu, một số vi khuẩn có thể giữ lại thuốc nhuộm ban đầu và một số bị mất màu bởi cồn (ethanol). Dựa vào màu sắc khác nhau có thể phân biệt vi khuẩn Gram âm và vi khuẩn Gram dương trên tiêu bản nhuộm.

Vi khuẩn Gram dương: thành tế bào có một lớp phức hợp protein-đường dày (peptidoglycan) và hàm lượng lipid thấp. Việc khử màu tế bào khiến thành tế bào dày này bị mất nước và co lại, làm bít các lỗ trên thành tế bào và ngăn không cho thuốc nhuộm thoát ra khỏi tế bào. Vì vậy, cồn không thể loại bỏ phức hợp CV-Iodine liên kết với lớp peptidoglycan dày của vi khuẩn gram dương và xuất hiện màu xanh lam hoặc tím.

Vi khuẩn Gram âm: thành tế bào cũng hấp thụ phức hợp CV-Iodine nhưng do lớp peptidoglycan mỏng và lớp ngoài dày được hình thành từ lipid nên phức hợp CV-Iodine bị cuốn trôi. Khi chúng tiếp xúc với cồn, chất khử màu sẽ hòa tan lipid trong thành tế bào, điều này cho phép phức hợp CV-Iodine thoát ra khỏi tế bào. Sau đó, khi nhuộm lại bằng safranin, chúng sẽ có màu đỏ.

#### Chữ viết tắt

- CV: Tinh thể tím (Crystal Violet)
- HE: Hematoxylin Eosin.
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện: Nhân lực trực tiếp

Bác sỹ : 01

Kỹ thuật y: 01

Hộ lý: 01

#### 2.2. Vật tư

##### 2.2.1. Sinh phẩm

Tên hóa chất	Đơn vị
Dung dịch tẩy nén: xylen (hoặc dung dịch thay thế xylen)	ml
Cồn tuyệt đối	ml

Cồn 96%	ml
Nước cất 2 lần (hoặc nước RO)	ml
Bộ kít gồm các dung dịch: 1. Tím gentian, 2. Lugol, 3. Tẩy màu (aceton), 4. Fuchsin, 5. Biệt hóa	test
Dung dịch rửa (Wash)	test
Dung dịch tẩy nến (khử parafin) (Ez Pres)	test
Dung dịch dầu khoáng nhẹ (Lique coverslip LCS)	test
Dung dịch rửa hệ thống (Cleaning Plus kit)	test
Dung dịch gắn lamelle	ml
Dung dịch rửa tay	ml
Dung dịch khử khuẩn bè mặt	ml
Khử khuẩn Presept 2,5 gram	viên

#### 2.2.2. Dụng cụ

- Que tăm bệnh phẩm.
- Kẹp không máu các kích cỡ
- Khay nhôm làm đá lạnh.
- Giá để tiêu bản nằm, đứng.
- Bề nhuộm
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại)
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Thùng đựng rác thải y tế (màu vàng)
- Thùng đựng rác thông thường (màu xanh).

#### 2.2.3. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính tích điện dương super frost.
- Lá kính (lamelle)
- Pipet nhựa
- Hộp đựng rác thải sắc nhọn
- Găng tay không bột tan
- Khẩu trang, mũ, quần áo y tế.
- Bút chì, bút dạ dầu.
- Giấy A4
- Giấy in tem chống thám nước, hóa chất
- Cuộn mực in tem
- Giấy thám tiêu bản

- Giấy lau tay
- Túi đựng rác thải các loại.

### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu)
- Máy nhuộm đặc biệt
- Bề dàn tiêu bản
- Máy gắn lamelle tự động
- Máy khuấy từ
- Cân điện tử
- Kính hiển vi quang học (một và nhiều đầu, không và có kết nối camera)
- Tủ âm
- Tủ hút mùi hóa chất
- Tủ lạnh có ngăn làm đá
- Tủ đựng hóa chất chống cháy lan
- Tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất
- Tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2-8°C
- Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khói nến.
- Máy in tem/nhãn
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm) và lưu trữ mẫu.
  - Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26°C, đảm bảo an toàn sinh học
  - Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại)
  - Máy lọc nước RO 2 lần
  - Các trang thiết bị, dụng cụ vệ sinh, làm sạch.

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:**

- Bệnh phẩm là các mẫu nến cần nhuộm Gram để đánh giá và tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin (HE) kèm theo.
  - Khối nến bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
    - + Bệnh phẩm được cố định trong dung dịch formalin trung tính 10% ngay sau khi lấy ra khỏi cơ thể.
    - + Quy trình tạo ra khối nến phải đảm bảo đúng thời gian và kĩ thuật.
  - Lựa chọn khối nến chứa mẫu bệnh và mẫu chứng nhuộm Gram âm và dương.
  - Chuẩn bị các lam kính chuyên dụng có mã số, ký hiệu tương ứng với từng loại tiêu bản nhuộm. Cắt 1-2 lát mẫu bệnh và mẫu chứng với độ dày 3-5 µm gắn lên mỗi lam kính.

- + 1 tiêu bản mẫu bệnh nhuộm Gram.
- + 1 tiêu bản mẫu chứng Gram âm.
- + 1 tiêu bản mẫu chứng Gram dương.

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.

- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.
- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đổi chiều chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

Tổng thời gian ước tính: 72 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 12 giờ
- Thời gian nhuộm: 24 giờ
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 36 giờ.

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật**

Các cơ sở xét nghiệm Giải phẫu bệnh có đầy đủ tiêu chuẩn.

## **3. AN TOÀN:**

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của từng phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.
- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

Bước	Dung dịch	Thời gian
<b>Tẩy nền</b>		
1	Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen (bề 1)	2 phút

2 Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen (bề 2) 2 phút

3 Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen (bề 3) 2 phút

4 Ngâm các tiêu bản vào cồn tuyệt đối 1 phút

5 Ngâm các tiêu bản vào cồn 96% (bề 1) 1 phút

6 Ngâm các tiêu bản vào cồn 96% (bề 2) 1 phút

7 Ngâm các tiêu bản vào bể nước chảy 2 phút

#### **Nhuộm tiêu bản**

8 Phủ tiêu bản với dung dịch Tím gentian 1 phút

9 Rửa tiêu bản dưới vòi nước chảy 1 phút

10 Phủ tiêu bản với dung dịch Lugol 1 phút

11 Rửa tiêu bản với nước cát 1 phút

12 Phủ tiêu bản với dung dịch tẩy màu aceton 20 giây

13 Rửa tiêu bản với nước cát 5 giây

14 Phủ tiêu bản với dung dịch Fuchsin 2 phút

15 Rửa tiêu bản với nước cát 5 giây

16 Phủ tiêu bản với dung dịch biệt hóa 15 giây

#### **Khử nước**

17 Dội tiêu bản với cồn tuyệt đối lần 1 3 giây

18 Dội tiêu bản với cồn tuyệt đối lần 2 3 giây

19 Dội tiêu bản với cồn tuyệt đối lần 3 3 giây

#### **Gắn tiêu bản**

20 Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen (bề 4) 30 giây

21 Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen (bề 5) 30 giây

22 Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen (bề 6) 30 giây

23 Gắn lamelle bằng dung dịch gắn

24 Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản

## 4.2. Nhận định kết quả

### 4.2.1. Phân tích kết quả

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.

- Đánh giá tiêu bản nhuộm HE, chú ý vùng nghi ngờ có vi khuẩn.

- Đánh giá tiêu bản nhuộm chứng Gram âm và chứng Gram dương:

+ Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.

+ Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.

- Các tiêu chí đánh giá:

+ Vi khuẩn gram dương: xanh lam/tím

+ Vi khuẩn gram âm: đỏ

+ Các phần khác của mô: vàng

+ Nhân: đỏ.

- Các loại vi khuẩn có thể gặp:

+ Vi khuẩn Gram dương: Actinomyces, Bacillus, Clostridium, Corynebacterium, Enterococcus, Gardnerella, Lactobacillus, Listeria, Mycoplasma, Nocardia, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces ...

+ Vi khuẩn Gram âm: Escherichia coli (E. coli), Salmonella, Shigella, Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Moraxella, Helicobacter, Stenotrophomonas, Bdellovibrio, acetic acid bacteria, Legionella ...

- Đưa ra kết luận: Nhuộm Gram có/không có vi khuẩn Gram dương/âm.

### 4.2.2. Báo cáo kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm

- Trả kết quả theo các quy trình liên quan. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

- Lưu khói nến và tiêu bản theo quy trình lưu và hủy bệnh phẩm Giải phẫu bệnh và theo thời gian quy định

## 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

### 5.1. Chứng âm nền:

- Nguyên nhân: tẩy màu thuốc nhuộm chưa đủ

- Khắc phục: Chú ý thời gian tẩy màu đến khi hết màu thuốc nhuộm trên lam.

### 5.2. Chứng dương âm tính:

- Nguyên nhân: Hóa chất hỏng; tẩy màu quá lâu, mẫu hết không đạt tiêu chuẩn, thực hiện không đúng các bước trong quy trình.

- Khắc phục: Pha lại hóa chất mới; cắt các tiêu bản chứng dương để test lại, và tìm mẫu chứng dương khác nhuộm cùng để đối chứng, tuân thủ đúng theo quy trình kỹ thuật.

### 5.3. Tiêu bản chỉ nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm:

- Nguyên nhân: Mẫu cắt mất mô do kỹ thuật cắt hoặc do máy cắt, dao cắt. Tiêu bản bị bóng nước, tiêu bản nhuộm chưa khô, cắt mẫu trên lam thường. Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm.

- Khắc phục: Dựa vào nguyên nhân để loại bỏ các yếu tố ảnh hưởng. Khi thấy trên mẫu bệnh phẩm có bóng nước cần loại bỏ bóng, bọt khí, để tiêu bản khô hoàn toàn, cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn. Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được để trong hệ thống kín gió....

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:

+ Sử dụng mẫu chứng Gram âm và Gram dương đã đánh giá chất lượng

+ Nhuộm Gram trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.1.

+ Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.

+ Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.

- Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng.

- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị.

- Kiểm soát điều kiện môi trường.

- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ Y tế Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Té bào học.

2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/098/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.

3. Bancroft JD, Gamble M (2008). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier 6<sup>th</sup> edition.

4. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD (2019). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier, 8th edition.

## **47. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM NGÂM BẠC XEM DƯỚI KÍNH HIỂN VI ĐIỆN TỬ QUÉT**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Chuẩn bị mô y sinh học và vi sinh vật để soi trên kính hiển vi điện tử quét, quan sát cấu trúc siêu vi thể bề mặt mẫu.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Kỹ thuật này dùng để quan sát bề mặt mẫu kích thước cỡ nanomet dùng trong chẩn đoán, nghiên cứu và soi đặc điểm hình dạng cấu trúc bên ngoài mô.

Nguyên lý của phương pháp là các mô sẽ được cố định, làm khô, mạ phủ bằng kim loại nặng để chùm điện tử electron có thể quét trên bề mặt mẫu. Việc tạo ảnh của mẫu vật được thực hiện thông qua việc ghi nhận và phân tích các bức xạ phát ra từ tương tác của chùm điện tử với bề mặt mẫu vật.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01
- Kỹ thuật viên: 02
- Hộ lí: 01

#### **2.2. Vật tư, phương tiện, hóa chất**

- Chai, lọ thủy tinh đựng hóa chất và mẫu (Số lượng lọ phụ thuộc vào số lượng mẫu)
  - Dung dịch khử khoáng (đối với các mẫu mô xương, răng)
  - Dung dịch glutaraldehyde
  - Dung dịch đệm cacodylat
  - Dung dịch axit Osmic
  - Bộ dụng cụ tiêm phẫu (Gồm dao, kéo, nĩa, kẹp có máu và không máu)
  - Effpendof 0,5ml
  - Cồn 96° (để pha các nồng độ khác nhau)
  - Cồn tuyệt đối
  - Nước cất
  - Giấy lọc
  - Băng dính cacbon
  - Kính phòng hộ,
  - Acetone
  - T-Butyl

- Isoamyl acetate
- Ông hút nhựa
- Xilanh 5ml
- Găng tay, khẩu trang, kính bảo vệ mắt và quần áo bảo hộ: 02 bộ.
- Dung dịch khử trùng là sạch dụng cụ,
- Kim loại mạ phủ: Vàng, Platinum, Palladium hoặc Chromium...

### **2.3. Trang thiết bị**

- Hệ thống kính hiển vi điện tử quét,
- Máy mạ phủ
- Máy bóc bay hơi
- Máy làm khô mẫu ở điểm tối hạn
- Tủ lạnh, hộp cách nhiệt chứa đá khô hoặc đá lạnh để lưu giữ và vận chuyển mẫu bệnh phẩm.
- Điều hòa nhiệt độ.
- Tủ hút phòng thí nghiệm.
- Kính soi nồng
- Cân vi lượng.
- Vòi nước chảy, các dụng cụ
- Chai thuỷ tinh có nắp để đựng bệnh phẩm đã pha còn dư lại để đem huỷ.
- Bình có chứa dung dịch cố định để lưu bệnh phẩm xét nghiệm thêm.

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

#### *Với mẫu mô y sinh học tươi*

- Lấy bệnh phẩm: Tiến hành như quy trình thường quy giải phẫu bệnh. Việc lấy mẫu được thực hiện bởi các khoa lâm sàng, phòng thí nghiệm, nhà nghiên cứu và gửi bệnh phẩm về các phòng nghiên cứu siêu cấu trúc.

- Thu thập mẫu bệnh phẩm:
  - + Đo chiều dài mảnh sinh thiết
  - + Vẽ hoặc chụp lại hình ảnh mẫu
  - + Mẫu có kích thước  $0,5 \times 0,5 \times 0,5$  cm.
  - + Cố định ngay trong lọ đựng 3-5ml dung dịch glutaraldehyde 2,5% .

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm:

- Có ghi đầy đủ thông tin theo quy định (họ tên người bệnh, tuổi, giới, tên khoa phòng yêu cầu xét nghiệm),

- Có ghi ngày vào viện, chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian phương pháp, vị trí, lấy mẫu bệnh phẩm, số lượng bệnh phẩm).

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên người yêu cầu xét nghiệm.
- Có phân mô tả đại thể:
- + Loại mô xét nghiệm
- + Vùng lấy bệnh phẩm
- + Số lượng bệnh phẩm lấy xét nghiệm
- + Màu sắc bệnh phẩm
- + Kích thước bệnh phẩm
- + Đặc điểm hình thái diện cắt

### 3. AN TOÀN

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

### 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

#### 4.1. Chuẩn bị mẫu, hóa chất và chất đúc

##### 4.1.1. Chuẩn bị mẫu

###### **- Lấy mẫu từ mô y sinh học:**

Lấy mẫu từ mô tươi tốt hơn mô đã được cố định thường quy. Cần nhanh chóng lấy mẫu ngay khi bệnh phẩm được lấy ra khỏi cơ thể.

Đặt bệnh phẩm lên thớt nhựa cứng hoặc thớt thuỷ tinh sạch.

Nhỏ vài giọt dung dịch bảo quản glutaraldehyde 2,5% lên vùng khác của tấm thớt, đặt các lát cắt mô lên phía trên và phủ lên trên với vài giọt dung dịch glutaraldehyde 2,5%.

Pha nhỏ các lát cắt thành những khối 1mm<sup>3</sup> bằng dao sắc và nhúng bệnh phẩm vào dung dịch glutaraldehyde 2,5% lạnh (4°C).

Lấy 3-5 mảnh mô là đủ. Nếu bệnh phẩm có nhiều vùng tổn thương khác nhau trên đại thể, cần lấy riêng và đưa đến phòng xét nghiệm hiển vi điện tử trong những lô riêng biệt.

Mô có thể được giữ trong dung dịch cố định dùng cho hiển vi điện tử trong nhiều ngày ở 4°C (không quá 30 ngày) trước khi đưa đến phòng xét nghiệm hiển vi điện tử.

###### **- Lấy mẫu y sinh học từ mô được cố định bảo quản**

Mô đã được cố định bảo quản trong formol trung tính 10% và các dung dịch bảo quản khác.

Cắt bỏ lát mỏng 1mm từ bờ của bệnh phẩm nơi tiếp xúc trực tiếp với dung dịch cố định, cho vào trong bình nước ngâm rửa dưới vòi nước sạch liên tục 48h.

Sau đó tiến hành như đối với mô tươi.

**- Các mẫu xương:** được khử khoáng bằng dung dịch ethylen diamin tetra acetic (EDTA) 5%, thời gian khử khoáng từ 15 đến 20 ngày (thường sử dụng 25 - 30 ml dung dịch EDTA 5% cho một gam xương).

Tiến hành khử khoáng như sau: Dùng một lớp gạc bọc các mẫu xương, lấy một sợi chỉ buộc và treo mẫu lơ lửng trong lọ dung dịch để mẫu được tiếp xúc đều với dung dịch khử khoáng. Hàng ngày lắc đều dung dịch khử khoáng từ 1 đến 2 lần. Sau mỗi tuần thay dung dịch mới. Cuối tuần thứ 2 kiểm tra kết quả khử khoáng bằng các phương pháp sau:

+ Phương pháp cơ học: Dùng kim khâu xuyên vào cạnh mẫu xương, khi kim xuyên qua mà có cảm giác mềm tay là quá trình khử khoáng đã hoàn thành.

+ Phương pháp hóa học: Lấy 1 ml dung dịch amoni oxalat  $\text{NH}_4\text{C}_2\text{O}_4$  5% hay natri oxalat  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  5%; cho một trong hai dung dịch vào dung dịch khử khoáng, nếu có tủa là sự khử khoáng chưa hoàn thành.

#### 4.1.2. Chuẩn bị dung dịch để rửa và cố định mẫu

- Chuẩn bị đệm cacodylate 0,2M và 0,3M
- Chuẩn bị dung dịch cố định glutaraldehyde 2,5%
- Chuẩn bị dung dịch axit Osmic 1%
- Dung dịch cồn các nồng độ: 50°, 70°, 80°, 85°, 90°, 95°
- Chuẩn bị các dung dịch khác

#### 4.2. Tiến hành xử lý mẫu cho nghiên cứu trên kính hiển vi điện tử quét

Tiến hành nhuộm theo các bước sau:

1. Rửa lại mẫu bằng đệm cacodylat 0,3M, 2 lần x 10 phút/lần.
2. Cố định mẫu trong glutaraldehyd 2,5% trong 12 giờ (để qua đêm), ở 40°C;
3. Rửa mẫu bằng đệm cacodylat 0,1M, 2 lần x 10 phút/lần;
4. Cố định bổ sung bằng axit osmic 1% trong 4-6 giờ), ở 40°C;
5. Rửa lại mẫu bằng đệm cacodylat 0,1M, 2 lần x 10 phút/lần.
6. Khử nước các mẫu theo qui trình:
  - Cồn ethanol 50°, 2 lần x 15 phút/lần;
  - Cồn ethanol 70°, 2 lần x 15 phút/lần;
  - Cồn ethanol 80°, 2 lần x 15 phút/lần;
  - Cồn ethanol 90°, 2 lần x 15 phút/lần;
  - Cồn ethanol 95°, 2 lần x 15 phút/lần;
  - Cồn ethanol 100°, 2 lần x 15 phút/lần.
7. Làm khô mẫu:

Tùy thuộc vào loại mẫu mà áp dụng các phương pháp làm khô khác nhau như sau:

- Làm khô tự nhiên (đối với các mẫu mô có bề mặt tương đối rắn chắc: xương, răng, tóc, móng...) bằng cách khử cồn trong các mẫu xương bằng ether:

- + Cồn ethanol 100°, ether nguyên chất (tỉ lệ 1/1) x 20 phút/lần x1 lần;
- + Ether nguyên chất x 20 phút/lần x 1 lần;
- + Làm khô mẫu trong không khí.

- Làm khô bằng bốc bay (đối với các mẫu mô mềm) bằng cách khử cồn ethanol trong các mẫu mô bằng T - Butyl:

+ Ngâm các mẫu mô trong cồn T - Butyl x 30 phút/lần x 3 lần. Sau lần 3 để trong ngăn đá tủ lạnh 30 phút đến 1 giờ để cồn T - Butyl chuyển dạng tinh thể.

- + Bốc bay cồn T - Butyl trong 2-5h.

- Làm khô tại điểm tối hạn (là phương pháp tối ưu nhất để bảo tồn bề mặt mẫu) được thực hiện bằng máy làm khô tại điểm tối hạn với các bước chính sau:

- + Ngâm các mẫu trong isoamyl acetate;
- + Thay thế isoamyl acetate bằng CO<sub>2</sub> lỏng;
- + Làm bay hơi CO<sub>2</sub> lỏng ở điểm tối hạn.

#### 8. Mạ phủ mẫu:

Gắn mẫu trên đế mang mẫu của kính hiển vi điện tử quét bằng băng dính cacbon, hướng bề mặt quan sát lên trên.

Mạ phủ mẫu bằng vàng/Palladium dày 40-60nm trong thời gian 45 - 60 giây, hoặc có thể mạ phủ mẫu bằng cacbon và sau đó là đồng trên máy mạ phủ mẫu

#### 4.3. Nhận định kết quả

Kết quả được Bác sĩ Giải phẫu bệnh đọc trên kính hiển vi điện tử quét.

Đưa mẫu vào máy, vận hành, soi và chụp ảnh theo quy trình và mục đích cần đánh giá, nghiên cứu.

#### 4.4. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định.

### 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

#### 5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Pha mẫu gây tổn thương, bầm ráp mẫu; Sử dụng lưỡi dao sắc, cắt gọn 1 thì, không cưa, kéo mẫu. Dùng nĩa chuyên dụng giữ mẫu.

- Cố định nhầm vào dung dịch khác, loại bỏ và lấy lại bệnh phẩm mới

- Không kịp thời cố định ngày trong dung dịch glutaraldehyd, thời gian cố định không đủ. Bệnh phẩm dính vào thành lọ đựng mẫu, không được ngâm trong dung dịch cố định làm hỏng bệnh phẩm: nên cho lượng dung dịch đủ quy định vào lọ trước khi pha và thả bệnh phẩm ngập trong dung dịch, sau đó đậy nắp và lắc đều lọ đựng mẫu.

#### 5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Mạ phủ nhầm mặt cắt và vùng định quan sát: Mạ phủ lại

### **5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật**

+ Tiêu bản nhăn, rách: Có thể do: Chất đúc không đạt yêu cầu, tủ âm không bảo đảm nhiệt độ, do bản thân mẫu

+ Tiêu bản bị quá nhạt hoặc quá đậm: Kiểm tra lại hóa chất và thời gian nhuộm

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.

- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. **Vi Huyền Trác** (1976), *Các kỹ thuật hiển vi học*, Nhà xuất bản y học, Hà Nội.
2. **Jeol – Serving Advanced Technology**, A guide to Scanning Microscope Observation
3. **Murtey, M. D., & Ramasamy, P.** (2016). Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy – Life Sciences. InTech. doi: 10.5772/61720
4. **Chris G. Jones** (2012), Scanning Electron Microscopy: Preparation and Imaging for SEM, Methods Mol Biol. 2012;915:1-20. doi: 10.1007/978-1-61779-977-8\_1.

## 48. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM TRICHROME BLUE

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Trichrome blue.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Phương pháp nhuộm ba màu theo nguyên lý giống như nhuộm ba màu theo Masson (1929).

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

#### **2.2. Vật tư:**

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen
- Lam kính

#### **2.3. Hoá chất:**

- Dung dịch tẩy nến
- Dung dịch dầu khoáng
- Dung dịch rửa
- Keo gắn lamen
- Bộ kít nhuộm Trichrome blue

#### **2.4. Trang thiết bị:**

- Tủ âm 37°C và 56°C
- Tủ hút
- Tủ lạnh
- Máy cắt lát mỏng (Microtome)
- Khay và giá đựng mẫu
- Kính hiển vi quang học
- Máy nhuộm đặc biệt

#### **2.5. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trong vùi paraffin.

## **2.6. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.7. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 1h30 phút.

**2.8. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm .

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ ám và tiến hành quy trình nhuộm

- Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

### **4.2. Nhận định kết quả**

Bác sĩ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học:

- Nhân: Xanh da trời- đen
- Bào tử, sợi cơ và hồng cầu: Đỏ
- Sợi tạo keo: Xanh da trời

### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.

2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.

3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

#### **49. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GOMORI METHENAMINE SILVER**

## 1. ĐẠI CƯƠNG

### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm gomori methenamine silver .

### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý phương pháp nhuộm giống như nhuộm PAS: : nhóm các chất phản ứng bị oxy hóa bằng acid chromic hoặc permanganate sẽ tạo ra các aldehyd và người ta có thể phát hiện ra các aldehyd này nhờ vào hiện tượng thủy phân phức chất bắc - methenamine.

## 2. CHUẨN BỊ

### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01.
  - Kỹ thuật Y: 01. - Hỗ lý: 01.

## 2.2. Vật tư:

- Lam kính
  - Luõi dao cát lát mõng
  - Lamen

### 2.3. Hoá chất

- Dung dịch tẩy nến
  - Dung dịch dầu khoáng
  - Dung dịch rửa
  - Keo gắn lamen
  - Bô kít nhuộm Gomori Metheamine silver

#### 2.4. Trang thiết bị:

- Tủ ám  $37^{\circ}\text{C}$  và  $56^{\circ}\text{C}$
  - Tủ hút
  - Tủ lạnh
  - Máy cắt lát mỏng (Microtome)
  - Khay và giá đựng mẫu
  - Kính hiển vi quang học
  - Máy nhuộm đặc biệt

### 2.5. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Bệnh phẩm đã được trong vùi paraffin.

## **2.6. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.7. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 1h30 phút.

**2.8. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm .

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ ám và tiến hành quy trình nhuộm;

- Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm;
- Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được;
- Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động.

### **4.2. Nhận định kết quả:**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học:

- Sợi vỗng: đen
- Nhân: xám nhạt
- Mô khác: phụ thuộc chất nhuộm đổi màu

### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Pratical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## **50. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM SẮT**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Sắt.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Kỹ thuật này dùng trong chẩn đoán các bệnh, tổn thương liên quan đến chuyển hóa và lắng động sắt ở các mô, cơ quan, tổ chức.... Việc tẩm dung dịch kim loại sắt sẽ dừng lại khi màu sắc mảnh cắt đạt được màu mong muốn và được thực hiện hoàn toàn trên máy nhuộm tự động.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

#### **2.2. Vật tư:**

- Lam kính
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen

#### **2.3. Hoá chất**

- \* Đối với quy trình nhuộm thủ công :
- Dung dịch tẩy nén ( xylen hoặc toluen)
- Dung dịch acid acetic 12%.
- Dung dịch mạ hydroxit sắt dạng keo
- Dung dịch Ferrocyanua Kali (2%)
- HCl (2%)
- keo gắn lamen

- \* Đối với quy trình nhuộm máy:

- Bộ kit nhuộm sắt

#### **2.4. Trang thiết bị:**

- Tủ ấm 37°C và 56°C
- Tủ hút
- Tủ lạnh
- Điều hòa nhiệt độ

- Máy cắt lát mỏng (Microtome)
- Khay và giá đựng mẫu
- Kính hiển vi quang học
- Máy nhuộm đặc biệt

### **2.5. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trong vùi paraffin.

### **2.6. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.7. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 1h30 phút.

**2.8. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ ám và tiến hành quy trình nhuộm

\* Đối với quy trình nhuộm thủ công :

- + Tẩy parafin các mảnh cắt bằng 3 bểtoluen (xylen), mỗi bể 2 phút.
- + Chuyển vào các bể còn 100°, 95°, 80° mỗi bể 2 phút.
- + Rửa nước.
- + Nhúng mảnh cắt rất nhanh vào dung dịch acid acetic 12%.
- + Không rửa; đặt các mảnh cắt vào trong dung dịch làm việc khoảng 1 giờ.
- + Rửa trong 4 bể acid acetic 12% (3 phút mỗi bể).
- + Đặt mảnh cắt vào trong dung dịch Ferrocyanua Kali (2%) + HCl (2%) với thể tích bằng nhau, khoảng 20 phút.
- + Rửa nước chảy rồi qua nước cất.

+ Nhuộm nhân bằng đỏ nhân trong 3 - 10 phút.

+ Rửa trong nước chảy, rồi nước cất.

+ Làm mất nước nhanh bằng cồn 95° và cồn tuyệt đối.

+ Làm trong bằng 3 bểtoluen sạch.

+ Gắn lamen bằng dung dịch gắn.

\* Đối với quy trình nhuộm máy :

- + Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- + Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- + Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học: Mucopolysaccharit acid bắt màu xanh đậm.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày quá
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Pratical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 51. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM CHẤT ĐỒNG

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm đồng trên máy nhuộm đặc biệt tự động.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Kỹ thuật này dùng trong chẩn đoán các bệnh, tổn thương liên quan đến chuyển hóa và lắng động đồng ở các mô, cơ quan, tổ chức.... Việc tẩm dung dịch kim loại đồng sẽ dừng lại khi màu sắc mảnh cắt đạt được màu mong muốn và được thực hiện hoàn toàn trên máy nhuộm tự động.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý 01

#### **2.2. Vật tư:**

- Lam kính
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen

#### **2.3. Hoá chất**

- Dung dịch tẩy nến ( xylen hoặc toluen)
- Dung dịch rửa
- Bộ kít nhuộm đồng
- Keo gắn lamen

#### **2.3. Trang thiết bị:**

- Tủ âm 37°C và 56°C
- Tủ hút
- Tủ lạnh
- Điều hòa nhiệt độ
- Máy cắt lát mỏng (Microtome)
- Khay và giá đựng mẫu
- Kính hiển vi quang học
- Máy nhuộm đặc biệt

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trong vùi paraffin.

## **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 1h30 phút.

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh.

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ ám và tiến hành quy trình nhuộm

- Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học: chất đồng tích tụ thành phức hợp có màu xanh đen hoặc nâu đen trong mô.

### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị bong: cắt dày quá, cố định thời gian chưa đảm bảo...
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: Kiểm tra lại dung dịch rửa và bộ kit nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## **52. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM BẠC CHO THẬN BẰNG PHƯƠNG PHÁP XANH JONES**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Jones methamine silver.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Kỹ thuật này dùng trong chẩn đoán các bệnh, tổn thương liên quan thận, sử dụng kỹ thuật nhuộm màng đáy cầu thận để phát hiện tổn thương của nó, Oxy hóa các thành phần Carbohydrate của màng đáy tạo ra aldehyde bằng Periodic acid. Các aldehyde được giải phóng sẽ khử bạc thành bạc kim loại có thể nhìn thấy được. Việc tẩm dung dịch kim loại sẽ dừng lại khi màu sắc mảnh cắt đạt được màu mong muốn.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

#### **2.2. Vật tư:**

- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Lamen
- Giấy lọc
- Lam kính
- Giá đựng tiêu bản, bút ghi nhãn, giấy thám
- Bề nhuộm

#### **2.3. Hoá chất**

- Acid periodic 0,5%
- Vàng Chloride 0.5%
- Thiosulphate sodium 5%
- Dung dịch nhuộm bạc thận (Renal Silver Bath – RSB)
  - + 40ml Hexamine 3% (trữ ở nhiệt độ phòng)
  - + 2ml Bạc nitrat 5% (trữ ở tủ lạnh)
  - + 6ml Borax 5% (trữ ở nhiệt độ phòng)
- Hematoxylin, Green Fast
- Keo gắn lamen
- Đôi với trường hợp nhuộm máy tự động: bộ kit test có sẵn của hãng đã bao

gồm đầy đủ dung dịch nhuộm.

### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- Máy đo độ pH
- Kính hiển vi quang học
- Tủ lạnh
- Pipet
- Cân vi lượng
- Khay, giá, Lọ thủy tinh đựng hóa chất...

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trong vùi paraffin.

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 1h30 phút.**

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật : Khoa giải phẫu bệnh.**

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm

(\*) Đối với quy trình nhuộm thủ công:

- + Đối chiếu mã số bệnh nhân trên lam kính và trên phiếu chỉ định sau đó thực hiện kỹ thuật:
- + Tiêu bản tẩy nến như thường lệ sau đó rửa nước chảy: 5 phút
- + Phủ dung dịch Acid Periodic 0.5%: 30 phút
- + Rửa kĩ bằng nước cất: 5 phút
- + Cho tiêu bản vào bể nhựa có chứa dung dịch RSB, cho bể nhựa vào cốc nước ấm 80°C, cho cốc nước vào tủ âm 70°C: 20 phút
  - + Kiểm tra tiêu bản xem đủ đậm màu chưa, nếu chưa đợi đến khi đủ đậm màu rồi rửa kĩ bằng nước cất: 5 phút

- + Phủ Vàng chloride 0.5% lên tiêu bản: 1 phút
- + Rửa kĩ bằng nước cất: 5 phút
- + Phủ Thiosulphate sodium 5% lên tiêu bản: 1 phút
- + Rửa kĩ bằng nước cất: 5 phút
- + Nhuộm Hematoxylin
- + Nhuộm Green fasst
- + Rửa nước
- + Khử nước → làm trong bằng xylen → gắn bôm
- (\*) Đối với quy trình nhuộm máy
  - + Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
  - + Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
  - + Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học: + Màng đáy: Đen; + Nhân: Xanh lam/tía; + Bảo tương: xanh

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- + Tiêu bản bị đen: cắt dày hoặc để thời gian nhuộm RSB quá lâu: cắt mỏng, giảm thời gian nhuộm RSB
- + Dung dịch RSB là chất oxy hóa có độc tính cao, do đó khi tiếp xúc với dung dịch phải cẩn thận, phải đeo khẩu trang, găng tay, ở nơi thoáng gió.
- + Tiêu bản bị nhạt, không rõ màu đen: pha dung dịch RSB chưa đúng tỉ lệ, thời gian ủ chín đủ hoặc dung dịch bạc hết hạn sử dụng.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Pratical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

### 53. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM PAS (Periodic Acid Schiff)

#### 1. ĐẠI CƯƠNG

##### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Acid Periodic Schiff trên mẫu mô bệnh học.

##### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đây là kỹ thuật nhuộm phát hiện nấm và chất nhầy với nguyên lý dùng tác nhân oxy hóa là acid periodic để phá vỡ mối liên kết của 2 nguyên tử các bon (các nhóm glycol 1-2, hydro-1 amino-2, hydroxy-1 alkylamino-2, hydroxyl -1ceto-2...) làm xuất hiện các nhóm aldehyt. Các nhóm aldehyt này nhìn được nhờ phản ứng với thuốc thử Schiff.

#### 2. CHUẨN BỊ

##### 2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật Y: 01
- Hộ lý: 01

##### 2.2. Vật tư:

- Lưỡi dao cắt lát mỏng.
- Giấy lọc.
- Lam kính, lamen.
- Kính phòng hộ, găng tay các loại, mặt nạ phẫu thuật, áo choàng phẫu thuật.

##### 2.3. Hoá chất

- Cồn tuyệt đối
- Dung dịch tẩy nến ( xylen hoặc toluen)
- Các hóa chất để thực hiện nhuộm: thuốc thử Schiff, acid periodic, Hematoxyline.

##### 2.4. Trang thiết bị:

- Máy đo độ pH điện tử.
- Máy chuyển bệnh phẩm tự động.
- Máy đúc khối parafin.
- Bàn hơ dùng điện.
- Máy cắt lát mỏng (microtome).
- Tủ ấm 37<sup>0</sup> và 56<sup>0</sup>.
- Tủ lạnh.

- Điều hòa nhiệt độ.
- Tủ hâm phòng thí nghiệm.
- Bể nhuộm.
- Giá đựng tiêu bản (đứng và nằm ngang).
- Kẹp không mầu, kéo.
- Kính hiển vi 2 mắt để kiểm tra kết quả nhuộm.

## **2.5. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm đã được trong vùi paraffin.

## **2.6. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.7. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 1h30 phút.

**2.8. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Khối nén chứa bệnh phẩm được cắt mỏng 3-4 micromet trên lam kính.
- Tiến hành kỹ thuật nhuộm:

Tẩy parafin bằng 3 bể toluen (xylen), mỗi bể 2 phút.

Chuyển vào các bể cồn 100°, 95°, 80°, 70° mỗi bể 2 phút.

Ngâm trong nước cất: 10 phút.

Oxy hóa trong acid periodic 1%: 10 phút.

Rửa nước chảy: 5 – 10 phút rồi cho vào nước cất.

Ngâm trong thuốc thử Schiff: 15- 30 phút (hoặc thấy có màu hồng là được).

Nhuộm nhân bằng hemalum Mayer: khoảng 1phút.

Rửa nước chảy trong 5 phút.

Đẩy nước bằng cồn 95° và 100°

Làm trong qua 3 bể toluen sạch

Gắn lamen bằng bôm như thường lệ

### **4.2. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ đọc và đánh giá trên kính hiển vi quang học:

+ Nhân tế bào: Xanh đen

- + Näm, chất nhày: Hồng đậm tới đỏ
- + Glycoprotein: Đỏ
- + Glycogen: Đỏ
- + Chất nền: màu ve

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

#### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Tiêu bản gấp, xước, rách, nhăn
- Chất lượng thuốc thử shiff và nồng độ acid periodic cần được kiểm tra thường xuyên

#### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

#### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
3. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## 54. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM PERIODIC ACID SCHIFF DIASTATE (PAS – D).

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phân biệt các thành phần chứa glycogen (Ví dụ: tế bào gan, đại thực bào, thê vùi) với các thành phần chứa carbohydrate khác (như chất nhầy, tinh bột, nấm, màng đáy, sợi võng) khi cùng bắt màu nhuộm Periodic Acid Schiff (PAS).

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật nhuộm PAS-D thường thực hiện sau khi nhuộm PAS bắt màu đỏ với các thành phần chứa carbohydrate trong mô (ví dụ: glycogen, chất nhầy, tinh bột). Đây là một trong những kỹ thuật tiêu enzym giúp loại bỏ glycogen ra khỏi mô, các phân tử glycogen dưới tác động của enzym tiêu glycogen  $\alpha$ -Amylase sẽ bị phá vỡ thành các phân tử nhỏ hơn (maltose và glucose) dễ bị rửa trôi và mất màu đỏ của thuốc nhuộm PAS.

#### Chữ viết tắt

- HE: Hematoxylin Eosin.
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- PAS: Periodic Acid Schiff
- PAS-D: Periodic Acid Schiff- Diastase

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Nhân lực

Bác sỹ:	01
Kỹ thuật y:	01
Hộ lý:	01

#### 2.2. Vật tư

##### 2.2.1. Sinh phẩm

Tên hóa chất	Đơn vị
Dung dịch Xylen hoặc dung dịch thê xylen	ml
Cồn tuyệt đối	ml
Cồn 96%	ml
Nước cất 2 lần (hoặc nước RO)	ml
DD enzym $\alpha$ - Amylase 1%	test
DD Acid periodic 0,5 %	test

DD Schiff	test
DD Hematoxylin Mayer	test
Dung dịch rửa (Wash)	Test
Dung dịch tẩy nén (khử parafin) (Ez Pres)	Test
Dung dịch dầu khoáng nhẹ (Lique coverslip LCS)	Test
Dung dịch rửa hệ thống (Cleaning Plus kit)	Test
DD gắn lamelle (DPX mountant)	ml
Dung dịch rửa tay	ml
Dung dịch khử khuẩn bề mặt	ml
Khử khuẩn Presept 2,5 gram	viên

#### 2.2.2. Dụng cụ

- Que tăm bệnh phẩm.
- Kẹp không mấu các kích cỡ
- Khay nhôm làm đá lạnh.
- Giá để tiêu bản nằm, đứng.
- Bề nhuộm
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại)
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Thùng đựng rác thải y tế (màu vàng)
- Thùng đựng rác thông thường (màu xanh).

#### 2.2.3. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính tích điện dương super frost.
- Lá kính (lamelle)
- Pipet nhựa
- Hộp đựng rác thải sắc nhọn
- Găng tay không bột tan
- Khẩu trang, mũ, quần áo y tế.
- Bút chì, bút dạ dầu.
- Giấy A4

- Giấy in tem chống thấm nước, hóa chất
- Cuộn mực in tem
- Giấy thấm tiêu bản
- Giấy lau tay
- Túi đựng rác thải các loại.

### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu)
- Máy nhuộm đặc biệt
- Bề dàn tiêu bản
- Máy gắn lamelle tự động
- Máy khuấy từ
- Cân điện tử
- Kính hiển vi quang học (một và nhiều đầu, không và có kết nối camera)
- Tủ âm
- Tủ hút mùi hóa chất
- Tủ lạnh có ngăn làm đá
- Tủ đựng hóa chất chống cháy lan
- Tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất
- Tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2-8oC
- Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khói nến.
- Máy in tem/nhãn
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm) và lưu trữ bệnh phẩm.
- Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26oC, đảm bảo an toàn sinh học
- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại)
- Máy lọc nước RO 2 lần
- Các trang thiết bị, dụng cụ vệ sinh, làm sạch.

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:**

- Bệnh phẩm là mẫu nến cần nhuộm PAS-D để đánh giá.
- Các tiêu bản kèm theo gồm:
  - + 1 tiêu bản mẫu bệnh nhuộm Hematoxylin Eosin (HE)
  - + 1 tiêu bản mẫu bệnh nhuộm PAS dương tính.
- Mẫu nến chứa bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:

+ Bệnh phẩm được cô định trong DD formalin trung tính 10% ngay sau khi lấy ra khỏi cơ thể.

+ Quy trình tạo ra mẫu nén phải đảm bảo đúng kỹ thuật.

- Chuẩn bị các lam kính chuyên dụng có mã số, ký hiệu tương ứng với từng loại tiêu bản nhuộm. Cắt từ mẫu nén 1-2 lát với độ dày 3-5 $\mu$ m gắn lên mỗi lam kính.

+ 1 tiêu bản mẫu bệnh để nhuộm PAS-D tương ứng tiêu bản nhuộm PAS dương tính.

+ 1 tiêu bản mẫu chứng PAS-D âm.

+ 1 tiêu bản mẫu chứng PAS-D dương.

## **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.

- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.

- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.

- Đổi chiều chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

## **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

Tổng thời gian ước tính: 72 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 12 giờ

- Thời gian nhuộm: 24 giờ

- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 36 giờ.

## **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật**

Các cơ sở xét nghiệm Giải phẫu bệnh có đầy đủ tiêu chuẩn.

## **3. AN TOÀN:**

Thực hiện theo tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1 Các bước thực hiện**

Bước	Nội dung	Thời gian
<b>Tẩy nến</b>		
1	Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen (bế 1)	2 phút
2	Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen (bế 2)	2 phút

3 Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen 2 phút  
(bể 3)

4 Ngâm các tiêu bản vào cồn tuyệt đối 1 phút

5 Ngâm các tiêu bản vào cồn 96% (bể 1) 1 phút

6 Ngâm các tiêu bản vào cồn 96% (bể 2) 1 phút

7 Ngâm các tiêu bản vào bể nước chảy 2 phút

### **Nhuộm tiêu bản**

8 Phủ tiêu bản với dung dịch α-Amylase 1% 30 phút

9 Rửa các tiêu bản trong bể nước chảy nhẹ 2 phút

10 Phủ các tiêu bản vào dung dịch Acid periodic 0,5% 15 phút

11 Rửa các tiêu bản trong bể nước chảy nhẹ 2 phút

12 Phủ các tiêu bản vào dung dịch Schiff 20 phút

13 Rửa các tiêu bản trong bể nước chảy nhẹ 5 phút

14 Phủ các tiêu bản vào dung dịch Hematoxylin Mayer 1 phút

15 Rửa các tiêu bản trong bể nước chảy 2 phút

### **Khử nước**

16 Dội các tiêu bản bằng cồn 96% 5 giây

17 Ngâm các tiêu bản vào bể cồn 96% 30 giây

18 Ngâm các tiêu bản vào bể cồn tuyệt đối (bể 3) 30 giây

19 Ngâm các tiêu bản vào bể cồn tuyệt đối (bể 4) 30 giây

### **Gắn tiêu bản**

20 Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen 30 giây  
(bể 4)

21 Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen 30 giây  
(bể 5)

22 Ngâm các tiêu bản vào Xylen hoặc dung dịch thay thế xylen 30 giây  
(bể 6)

- 23 Gắn lamelle băng dung dịch gắn
- 24 Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản

## **4.2. Nhận định kết quả**

### **4.2.1. Phân tích kết quả**

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.

- Đánh giá tiêu bản nhuộm HE và PAS nhằm xác định vùng tổn thương.
- Nội kiểm tra đánh giá tiêu bản nhuộm chứng âm và chứng dương:
  - + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.
  - + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.

+ Tiêu chí đánh giá: Nhân tế bào bắt màu xanh tím. Thành phần chứa glycogen trong bào tương không bắt màu hoặc bắt màu hồng nhạt. Thành phần không phải glycogen trong bào tương bắt màu đỏ sáng.

- Đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh theo các tiêu chí:
  - + Tế bào/ thành phần cần đánh giá dương tính hay âm tính
  - + Vị trí dương tính (ở hay lan tỏa).
  - + Mức độ dương tính (nếu cần).
- Đưa ra kết luận: Nhuộm PAS-D dương tính hay âm tính cho thành phần nào.

### **4.2.2. Báo cáo kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm**

- Trả kết quả theo các quy trình liên quan. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

- Lưu khói nến và tiêu bản theo quy trình lưu và hủy bệnh phẩm Giải phẫu bệnh và theo thời gian quy định.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

### **5.1. Chứng âm nền:**

- Nguyên nhân: thời gian khử glycogen thành các phân tử nhỏ hơn như glucose, maltose chưa đủ.

- Khắc phục: Chú ý thời gian phủ dung dịch enzym Amylase tuân thủ đúng, đảm bảo đúng nồng độ và điều kiện môi trường.

### **5.2. Chứng dương âm tính:**

- Nguyên nhân: Hóa chất hỏng; tẩy màu quá lâu, mẫu hết không đạt tiêu chuẩn, thực hiện không đúng các bước trong quy trình.

- Khắc phục: Pha lại hóa chất mới; cắt các tiêu bản chứng dương để test lại, và tìm mẫu chứng dương khác nhuộm cùng để đối chứng, tuân thủ đúng theo quy trình kỹ thuật.

### 5.3. Tiêu bản chỉ nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm:

- Nguyên nhân: Mẫu cắt mất mô do kỹ thuật cắt hoặc do máy cắt, dao cắt. Tiêu bản bị bóng nước, tiêu bản nhuộm chưa khô, cắt mẫu trên lam thường. Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm.

- Khắc phục: Dựa vào nguyên nhân để loại bỏ các yếu tố ảnh hưởng. Khi thấy trên mẫu bệnh phẩm có bóng nước cần loại bỏ bóng, bọt khí, để tiêu bản khô hoàn toàn, cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn. Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được để trong hệ thống kín gió.

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:

+ Sử dụng mẫu chứng âm và mẫu chứng dương đã đánh giá chất lượng

+ Nhuộm PAS-D trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.1.

+ Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.

+ Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục và đánh giá lại. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.

- Thực hiện ngoại kiêm: theo chương trình ngoại kiêm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng.

- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị

- Kiểm soát điều kiện môi trường

- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ Y tế Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Té bào học
- Dongtao A Fu, Martha Campbell-Thompson (2017). Periodic Acid-Schiff Staining with Diastase, 1639:145-149. doi: 10.1007/978-1-4939-7163-3
- Mc Manus (1992). Diastase digestion. Laboratory methods in histopathology - AFIP:153.
- Bancroff JD, Gamble M (2008). Theory and Practice of Histological Techniques. Elsevier 6<sup>th</sup> edition:182-190.
- Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD (2019). Theory and Practice of Histological Techniques. Elsevier, 8th edition.

## 55. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM HEMATOXYLIN EOSIN TRÊN TIÊU BẢN MÔ

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện xét nghiệm và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm hai màu Hematoxylin Eosin.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Đây là phương pháp nhuộm đơn giản, phối hợp hai màu liên tiếp. Nhuộm nhân theo nguyên tắc tăng dần bằng phẩm nhuộm Hematoxylin có tính base, nhuộm bào tương theo nguyên tắc giảm dần bằng phẩm nhuộm Eosin có tính acid.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### **2.2. Hóa chất, Vật tư:**

- Các hóa chất để thực hiện cố định bệnh phẩm: Formol 10%; Formol đệm trung tính 10%, Bouin...
- Các vật tư, hóa chất để thực hiện chuyển, xử lý bệnh phẩm, nhuộm màu: miếng lót bệnh phẩm, casset, bút ghi cassett, Cồn tuyệt đối, Xylen, Toluen, Paraffin, Hematoxylin, Eosin, Lithiumcarbonat, acid HCL, keo gắn lamen, lamen, lam kính, dao cắt mảnh...
- Kính phòng hộ, găng tay các loại.

#### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy đo pH điện tử.
- Máy chuyển, xử lý bệnh phẩm tự động.
- Máy nhuộm tiêu bản tự động
- Máy đúc khối Paraffin.
- Bàn hơ tiêu bản.
- Máy cắt lát mỏng (microtome).
- Tủ ấm 37<sup>0</sup> và 56<sup>0</sup>.
- Tủ lạnh.
- Điều hòa nhiệt độ.
- Tủ hút mùi phòng thí nghiệm.
- Bể nhuộm.

- Kính hiển vi 2 mắt để kiểm tra kết quả nhuộm.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Là các khối nén chứa mẫu bệnh phẩm đã qua quá trình cố định – chuyển – đúc.

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 1h30 phút.

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện**

- Khối nén chứa bệnh phẩm cần xét nghiệm được cắt mảnh và dán mảnh

- Tiến hành kỹ thuật nhuộm:

+ Tẩy paraffin trong 3 bểtoluen (hoặc xylen), mỗi bể 5 phút.

+ Qua 4 bể cồn giảm dần: 100° - 95° - 80° - 70°, mỗi bể nhúng 15 lần.

+ Rửa nước: nhúng 15 lần.

+ Nhuộm nhân bằng Hematoxylin: 3-5 phút hoặc lâu hơn.

+ Rửa nước chảy: 5-10 phút.

+ Kiểm tra màu của nhân qua kính hiển vi, nếu đậm, tẩy nhẹ bằng cồn-acid.

+ Rửa nước chảy: 1 phút.

+ Nhuộm Eosin1%: 1 -2 phút.

+ Rửa nước chảy: 1 phút.

+ Biệt hoá trong 2 bể cồn 95° - 100°, mỗi bể 15 lần nhúng.

+ Qua 3 bể toluen, bể I và II nhúng 15 lần, bể III: 5-10 phút.

+ Gắn lamen

- Ngoài ra có thể thực hiện các bước nhuộm theo quy trình cài đặt sẵn trên máy nhuộm tiêu bản tự động sau khi tiêu bản được cắt mảnh dán trên lam kính.

- Kết quả:

Nhân tế bào: xanh đến xanh đen

Bào tương tế bào: hồng đến đỏ

Hồng cầu: hồng đậm

Sợi tạo keo: hồng nhạt

#### **4.2. Nhận định kết quả**

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Bào tương và nhân đều bắt màu nhạt: thuốc nhuộm cũ, thay thuốc nhuộm mới.
- Nhân nhạt màu: tăng thời gian nhuộm nhân.
- Nhân đậm màu quá mức: tẩy nhẹ bằng cồn-acid.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## **56. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GIEMSA TRÊN MẪU MÔ PHÁT HIỆN HP**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện xét nghiệm và chẩn đoán bằng phương pháp nhuộm giemsa trên mẫu mô bệnh học nhằm phát hiện vi khuẩn HP (*Helicobacter pylori*) .

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Sử dụng thuốc nhuộm giemsa để phát hiện các vi khuẩn *Helicobacter pylori* bắt màu tím đỏ ở khe tuyến, vùng chất nhầy trên bề mặt biểu mô phủ dạ dày.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### **2.2. Hóa chất, Vật tư:**

- Các vật tư, hóa chất để thực hiện cố định chuyển, xử lý bệnh phẩm, nhuộm màu: Cồn, Giemsa, nước cất, keo gắn lamen, lưỡi dao cắt lát mỏng...
- Bề nhuộm.
- Khuôn nhựa.
- Giá đựng tiêu bản (đứng và nằm ngang).
- Kẹp không máu, kéo.
- Giấy lọc.
- Lam kính, lamen
- Kính phòng hộ, găng tay các loại.

#### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy đo pH điện tử.
- Máy chuyển, xử lý bệnh phẩm tự động.
- Máy đúc khói parafin.
- Bàn hơ tiêu bản
- Máy cắt lát mỏng (microtome).
- Tủ âm 37<sup>0</sup> và 56<sup>0</sup>.
- Tủ lạnh.
- Điều hòa nhiệt độ.
- Tủ hút phòng xét nghiệm.

- Kính hiển vi 2 mắt để kiểm tra kết quả nhuộm.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Mẫu bệnh phẩm thực hiện xét nghiệm này là các khối nén chứa mẫu phẩm cần xét nghiệm

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 1h30 phút.**

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm

### **4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện**

- + Khối nén chứa bệnh phẩm được cắt mảnh và dán mảnh;
- Tiến hành kỹ thuật nhuộm Giemsa;
- + Khi dùng, lấy Giemsa mè pha loãng với nước cất, tỷ lệ Giemsa/nước cất là 1/4. Lưu ý là độ pH nên bằng 7,2 và được điều chỉnh bằng đệm photphat.
- + Mảnh cắt được tẩy nến như thường lệ (qua xylen, hoặc toluen, cồn).
- + Rửa nước.
- + Nhuộm tiêu bản trong dung dịch Giemsa đã pha loãng trong 30 phút đến 1 giờ.
- + Rửa nước
- + Biệt hóa trong acid acetic loãng (1 giọt acid acetic với 100ml nước cất)
- + Rửa nước
- + Loại phẩm thửa bằng cồn 95<sup>0</sup>
- + Loại nước bằng cồn và làm trong bằng xylen
- + Gắn lamen
- Kết quả:

Các vi khuẩn *Helicobacter pylori* (HP) bắt màu tím đỏ.

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ (kết hợp cùng tiêu bản nhuộm Hematoxylin – Eosin), từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Các mảnh cắt quá dày, không có phần niêm mạc sẽ không phát hiện được HP.
- Dung dịch dán mảnh cắt bị nhiễm khuẩn: sẽ ngộ nhận các vi khuẩn khác với HP, trường hợp này cần thay dung dịch dán mảnh cắt.
- Thời gian nhuộm lâu hoặc nồng độ Giemsa cao đều làm cho mô bắt màu mạnh, chuyển màu xanh đen, khó nhận định kết quả, xử lý bằng cách làm nhạt màu qua cồn.
- Nước dùng để rửa có nhiều cặn bẩn gây cặn bẩn trên tiêu bản, khó đánh giá kết quả, cần sử dụng nguồn nước sạch và sử dụng lõi lọc nếu cần.
- Thuốc nhuộm cũng có thể bị cặn và nhiễm vi khuẩn làm ảnh hưởng đến việc đánh giá kết quả, nên thay thuốc nhuộm mới.
- Dung dịch Giemsa pha loãng chỉ pha trước khi nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 57. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM PAS KẾT HỢP XANH ALCIAN

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình nhuộm PAS kết hợp Xanh Alcian được sử dụng để phát hiện và phân biệt giữa các loại polysaccharide và glycoprotein trong mô. PAS dùng để nhuộm glycogen và một số glycoprotein, trong khi Xanh Alcian chuyên dùng để nhuộm acid mucopolysaccharide. Kết hợp cả hai giúp xác định vị trí và loại của các thành phần carbohydrate trong mô, hỗ trợ chẩn đoán các tình trạng bệnh lý như fibrosis, các bệnh về gan và bệnh lý tiêu hóa..

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nhuộm PAS kết hợp Xanh Alcian là một kỹ thuật nhuộm trong mô bệnh học, sử dụng để phân biệt các thành phần carbohydrate trong mô. PAS nhuộm glycogen, glycoprotein, và mucin không chứa acid, tạo ra màu hồng/magenta. Xanh Alcian được dùng để nhuộm acid mucopolysaccharide và glycosaminoglycan, tạo màu xanh. Kết hợp hai phương pháp này cho phép xác định rõ ràng vị trí và loại của các carbohydrate, hỗ trợ chẩn đoán các bệnh lý có liên quan đến các biến đổi của carbohydrate trong mô.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### 2.2. Vật tư, hóa chất:

- Các vật tư, hóa chất để thực hiện chuyển bệnh phẩm, nhuộm màu: miếng lót bệnh phẩm, casset, bút ghi cassett, Cồn tuyệt đối, Xylen, Toluen, Paraffin, bể nhuộm, giá đựng tiêu bản...

- Các vật tư, hóa chất để thực hiện nhuộm: thuốc thử Schiff, acid periodic, xanh alcian, Hematoxyline, keo gắn phiến kính, phiến kính, lam kính, dao cắt mảnh...

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Máy đo độ pH điện tử.
- Máy chuyển bệnh phẩm tự động.
- Máy đúc khối parafin.
- Bàn hơ dùng điện.
- Máy cắt lát mỏng (microtome).
- Lưỡi dao cắt lát mỏng.
- Tủ ám 37<sup>0</sup> và 56<sup>0</sup>.
- Tủ lạnh.

- Điều hòa nhiệt độ.
- Tủ hút phòng thí nghiệm.
- Kính hiển vi 2 mắt để kiểm tra kết quả nhuộm.
- Kính phòng hộ, găng tay các loại, mặt nạ phẫu thuật, áo choàng phẫu thuật.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Cố định: Bệnh phẩm lấy ra khỏi cơ thể được đưa ngay vào dung dịch cố định (formol đậm trung tính 10%, formol 0%, Bouin...) với tỷ lệ thể tích dung dịch cố định khuyến cáo nhiều gấp 20-30 lần thể tích bệnh phẩm. Thời gian cố định từ 4 - 24 giờ tùy theo kích thước mảnh bệnh phẩm to hay nhỏ.

- Sau khi cố định, bệnh phẩm được thực hiện qua các khâu kỹ thuật sau:
- + Chuyển bệnh phẩm
- + Vùi Paraffin
- + Đúc khối Paraffin
- + Cắt mảnh và dán mảnh.

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

#### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 60 phút.**

#### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật : Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.**

### **3. AN TOÀN**

Khi thực hiện nhuộm PAS kết hợp Xanh Alcian, cần tuân thủ các biện pháp an toàn như sử dụng găng tay, kính bảo hộ, và làm việc trong tủ hút khí để tránh tiếp xúc với hóa chất độc hại. Cần bảo quản và xử lý hóa chất cẩn thận, theo dõi và tuân thủ hướng dẫn về an toàn hóa chất và tiêu hủy chất thải theo quy định.

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện**

- + Nhuộm tiêu bản
- Tiến hành kỹ thuật
  - + Tẩy parafin bằng 3 bểtoluen (xylen), mỗi bể 2 phút.
  - + Chuyển vào các bể cồn 100°, 95°, 80°, 70° mỗi bể 2 phút.
  - + Ngâm trong nước cất: 10 phút.
  - + Phiến đồ đã cố định, nhuộm 20 phút trong dung dịch nước xanh Alcian 0,1%.
  - + Rửa và nhúng 6 phút trong dung dịch nước acid photphomolybdic.
  - + Rửa cẩn thận trong nước cất 10 phút.
  - + Rửa nước cất 5 phút.

- + Nhuộm thuốc thử Schiff trong 60 phút.
- + Nhúng vào dung dịch Bisunfit Natri 3 lần, cách nhau 20 phút.
- + Rửa nước chảy trong 5 phút.
- + Lần lượt cho qua cồn có nồng độ cao dần ( $70^0$ ,  $80^0$ , cồn tuyệt đối).
- + Làm trong và gắn lá kính như thường lệ.

#### **4.2. Nhận định kết quả**

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học: Chất nhày acid có màu xanh.

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. NHŨNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Tiêu bản bị gấp, xước, rách, nhăn.....
- Chú ý kiểm tra chất lượng acid periodic, thuốc thử schiff, nồng độ xanh alcian...

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LUỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## 58. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM DIFF - QUICK

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mục đích của phương pháp này là cung cấp kết quả nhanh chóng, cho phép phân biệt giữa các loại tế bào khác nhau và nhận diện các dấu hiệu bệnh lý, hỗ trợ chẩn đoán lâm sàng trong thời gian ngắn..

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Là phương pháp nhuộm dựa trên sự cải biến của phương pháp nhuộm Wright Giemsa của Bernard Witlin năm 1970. Nó có ưu điểm hơn phương pháp nhuộm Wright Giemsa, vì các bước nhuộm đơn giản hơn, ít tốn thời gian hơn và cho phép tìm bạch cầu ái toan hay ái kiềm bằng cách thay đổi thời gian nhuộm. Vì vậy, nó là phương pháp nhuộm nhanh tế bào và mô, được áp dụng cho nhiều loại bệnh phẩm, từ chọc hút kim nhỏ, phiến đồ Tế bào học bong, phiến đồ Tế bào học áp, tinh dịch đồ. Phiến đồ nhuộm Diff - Quik cần để khô trong không khí trước khi cố định, không cố định khi phiến đồ còn ướt. Phương pháp nhuộm này giúp đánh giá chi tiết bào tương tế bào, các giọt lipid, các hạt chế tiết, chất nhầy, các chất ngoại bào như chất nhầy, các sợi keo. Các thành phần như vi khuẩn, nấm cũng dễ dàng phát hiện được bằng phương pháp nhuộm này.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### 2.2. Vật tư, hóa chất:

- Dung dịch cố định bệnh phẩm: Cồn tuyệt đối, cồn ete...
- Dung dịch nhuộm: Phẩm nhuộm phiến đồ Diff - Quick
- Nước cát, nước sạch để rửa thuốc nhuộm trên phiến kính.
- Bề nhuộm, giá đựng tiêu bản, lam kính, phiến kính, dung dịch gắn phiến kính...

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Máy nhuộm tiêu bản
- Kính hiển vi quang học, bàn có mặt phẳng, đủ rộng để đặt kính hiển vi
- Sổ hoặc máy tính ghi lại thông tin của từng Người bệnh, đặc điểm tồn thương, kết quả chẩn đoán.
- Các sọt rác đựng rác thải y tế, rác thải thường.

#### 2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

**- Lấy bệnh phẩm:**

+ Việc lấy mẫu được thực hiện bởi các khoa lâm sàng và gửi bệnh phẩm về phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh.

+ Phiến đồ được cố định trong cồn tuyệt đối hoặc cồn - ete: 30 giây

**2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 60 phút.

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

**3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

**4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

**4.1. Các bước thực hiện**

Phiến đồ được cố định trong cồn tuyệt đối hoặc cồn - ete: 30 giây

Nhuộm dung dịch 1: 20 giây

Nhuộm dung dịch 2: 20 giây

Rửa nước cát: 10 giây

Cồn etanol 95°: 10 giây

Cồn tuyệt đối: 15 giây

Xylen: 15 - 20 giây

Gắn lá kính bằng bôm Canada

**- Kết quả:**

+ Hồng cầu: màu hồng/vàng đỏ.

+ Tiếu cầu: màu tím/hạt màu tím.

+ Bạch cầu đa nhân trung tính: nhân màu xanh, bào tương màu hồng tím.

+ Bạch cầu ái toan: nhân màu xanh, bào tương màu xanh, các hạt màu đỏ.

+ Bạch cầu ura kiềm: nhân màu tím hoặc xanh đen.

+ Bạch cầu đơn nhân: nhân màu tím, bào tương xanh sáng.

+ Vi khuẩn: màu xanh.

**4.2. Nhận định kết quả**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi

Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Phiến đồ bị mất tế bào vào trong dịch cố định: cần để khô sau khi dàn 10-30 phút trước khi cố định bằng cồn.

- Bong bệnh phẩm: rửa nhẹ nhàng, nên dùng phiến kính có phủ chất chống bong

- Các tế bào dày, chòng chất: lấy lượng dịch vừa đủ, dàn đều tay

- Các tế bào bắt màu quá kém: cần cố định tốt và nhuộm đủ thời gian, thuốc nhuộm tốt

- Nhuộm quá đậm: tẩy bớt thuốc nhuộm bằng cồn tuyệt đối.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.

- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.

2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## **59. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MÔ BỆNH HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GIEMSA**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện xét nghiệm và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm giemsa.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Các vi khuẩn bắt màu tím đỏ ở khe tuyế̄n, vùng chất nhầy trên bề mặt biểu mô phủ dạ dày và các mô khác.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### **2.2. Vật tư, hóa chất:**

Các vật tư, hóa chất để thực hiện chuyển bệnh phẩm, nhuộm màu: Cồn, Giemsa, nước cất, lam kính, phiến kính, keo gắn phiến kính, bể nhuộm, giá đựng tiêu bản...

#### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy chuyển bệnh phẩm tự động.
- Máy đúc khối parafin.
- Bàn hơ tiêu bản.
- Máy cắt lát mỏng (microtome).
- Lưỡi dao cắt lát mỏng.
- Tủ âm 37<sup>0</sup> và 56<sup>0</sup>.
- Tủ lạnh.
- Điều hòa nhiệt độ.
- Tủ hốt phòng thí nghiệm.
- Kính hiển vi 2 mắt để kiểm tra kết quả nhuộm.
- Kính phòng hộ, găng tay các loại, mặt nạ phẫu thuật, áo choàng phẫu thuật.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Cố định

Bệnh phẩm lấy ra khỏi cơ thể được đưa ngay vào dung dịch cố định (Formol đậm trung tính 10%, Formol 10%, Bouin..) với tỷ lệ thể tích dung dịch cố định khuyến cáo nhiều gấp 20-30 lần thể tích bệnh phẩm. Thời gian cố định từ 4 -24 giờ tùy theo

mảnh bệnh phẩm to hay nhỏ.

- Sau khi cõi định, bệnh phẩm được thực hiện qua các khâu kỹ thuật sau:
  - + Chuyển bệnh phẩm
  - + Vùi Paraffin
  - + Đúc khối Paraffin
  - + Cắt mảnh và dán mảnh

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 45 phút.**

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- + Nhuộm tiêu bản
- Tiến hành kỹ thuật
  - + Khi dùng, lấy Giemsa mè pha loãng với nước cất, tỷ lệ Giemsa/nước cất là 1/4. Lưu ý là độ pH nên bằng 7,2 – 7,6 và được điều chỉnh bằng đệm photphat.
  - + Mảnh cắt được tẩy nến như thường lệ (qua xylen, cồn).
  - + Rửa nước
  - + Nhuộm tiêu bản trong dung dịch Giemsa đã pha loãng trong 1 giờ.
  - + Rửa nước
  - + Biệt hóa trong acid acetic loãng (1 giọt acid acetic với 100ml nước cất)
  - + Rửa nước
  - + Loại phẩm thừa bằng cồn 95<sup>0</sup>
  - + Loại nước bằng xylen
  - + Gắn lá kính bằng bôm Canada
  - + Kết quả: Các vi khuẩn bắt màu tím đỏ.

### **4.2. Nhận định kết quả**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Các mảnh cắt quá dày, không có phần niêm mạc sẽ không phát hiện được HP.
- Dung dịch dán mảnh cắt bị nhiễm khuẩn: sẽ ngộ nhận các vi khuẩn khác với HP, trường hợp này cần thay dung dịch dán mảnh cắt.
- Thời gian nhuộm lâu hoặc nồng độ Giemsa cao đều làm cho mô bắt màu mạnh, chuyển màu xanh đen, khó nhận định kết quả, xử lý bằng cách làm nhạt màu qua cồn.
- Nước dùng để rửa có nhiều cặn bẩn gây cặn bẩn trên tiêu bản, khó đánh giá kết quả, cần sử dụng nguồn nước sạch và sử dụng lõi lọc nếu cần.
- Thuốc nhuộm cũng có thể bị cặn và nhiễm vi khuẩn làm ảnh hưởng đến việc đánh giá kết quả, nên thay thuốc nhuộm mới.
- Dung dịch Giemsa pha loãng chỉ pha trước khi nhuộm.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## 60. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MÔ BỆNH HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM GOMORI

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn quy trình, cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Gomori.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa vào tính ưa bạc của sợi võng, người ta đã sử dụng phương pháp nhuộm tẩm/ngâm bạc để phát hiện loại sợi đặc biệt này. Hai phương pháp nhuộm sợi võng thông dụng nhất là Gomori và Gordon – Sweet. Bước đầu tiên của quy trình là thực hiện oxy hóa chất đường hexose có trong sợi võng để tạo ra aldehit. Bước tiếp theo làm “tăng độ nhạy” do lắng đọng thành phần kim loại (ammonium sunfat) quanh sợi võng. Hiện tượng tẩm/ngâm bạc xảy ra khi dung dịch bạc diamin hoặc bạc ammoniac bị oxy hóa tạo ra aldehit. Oxy hóa tiếp theo của bạc diamin khi mảnh cắt được chuyển vào trong formaldehit. Bước này được gọi là “tráng bạc”. Sau cùng, kim loại vàng có trong clorua vàng đã thay thế kim loại bạc để làm tăng độ “sắc nét” sợi võng, làm chúng chuyển từ màu nâu sang màu đen.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### 2.2. Vật tư, hóa chất:

- Dung dịch tẩy nến
- Dung dịch dầu khoáng
- Dung dịch rửa
- Bộ kít nhuộm gomori
- Bề nhuộm, giá đựng tiêu bản, lam kính, phiến kính, keo gắn phiến kính...

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt lát mỏng
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- Phiến kính, keo gắn phiến kính
- KHV quang học

- Máy nhuộm đặc biệt

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Cố định

Bệnh phẩm lấy ra khỏi cơ thể được đưa ngay vào dung dịch cố định (formol đậm trung tính 10%, formol 10%, Bouin...) với tỷ lệ thể tích dung dịch cố định khuyến cáo nhiều gấp 20-30 lần thể tích bệnh phẩm. Thời gian cố định từ 4 -24 giờ tùy theo mảnh bệnh phẩm to hay nhỏ.

- Sau khi cố định, bệnh phẩm được thực hiện qua các khâu kỹ thuật sau:

- + Chuyển bệnh phẩm
- + Vùi Paraffin
- + Đúc khối Paraffin
- + Cắt mảnh và dán mảnh

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 90 phút.

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm

- Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Nên dùng bình thót cổ đựng dung dịch bạc và khuấy kỹ mỗi khi thêm một giọt amoniac, vì nếu thêm quá nhiều amoniac sẽ làm cho dung dịch bạc kém tác dụng. Dung dịch bạc có thể pha hàng ngày trước sử dụng, nếu cần thiết.

- Dung dịch bạc amoniac có thể cát trũ ở 4°C trong vài tuần. Dung dịch này có thể nổ, nếu để tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời.

- Thời gian xử lý bằng dung dịch bạc – amoniac rất khác nhau phụ thuộc vào nhiệt độ môi trường và hiệu lực của dung dịch bạc.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## 61. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MÔ BỆNH HỌC BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM RETICULINE

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn quy trình, cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm Reticuline.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa vào tính ưa bạc của sợi vồng, người ta đã sử dụng phương pháp nhuộm tẩm/ngâm bạc để phát hiện loại sợi đặc biệt này. Hiện tượng tẩm/ngâm bạc xảy ra khi dung dịch bạc diamin hoặc bạc ammoniac bị oxy hóa tạo ra aldehyt. Oxy hóa tiếp theo của bạc diamin khi mảnh cắt được chuyển vào trong formaldehit. Bước này được gọi là “tráng bạc”. Sau cùng, kim loại vàng có trong clorua vàng đã thay thế kim loại bạc để làm tăng độ “sắc nét” sợi vồng, làm chúng chuyển từ màu nâu sang màu đen.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### 2.2. Vật tư:

- Dung dịch tẩy nén
- Dung dịch dầu khoáng
- Dung dịch rửa
- Bộ kít nhuộm Reticuline
- Bề nhuộm, giá đựng tiêu bản, lam kính, phiến kính, keo gắn phiến kính...

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt lát mỏng
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Tủ ám
- Tủ hút
- Phiến kính , keo gắn phiến kính
- KHV quang học
- Máy nhuộm đặc biệt

#### 2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Cố định

Bệnh phẩm lấy ra khỏi cơ thể được đưa ngay vào dung dịch cố định (formol đậm trung tính 10%, formol 105, Bouin...) với tỷ lệ thể tích dung dịch cố định khuyến cáo nhiều gấp 20-30 lần thể tích bệnh phẩm. Thời gian cố định từ 2-24 giờ tùy theo mảnh bệnh phẩm to hay nhỏ.

- Sau khi cố định, bệnh phẩm được thực hiện qua các khâu kỹ thuật sau:
  - + Chuyển bệnh phẩm
  - + Vùi Paraffin
  - + Đúc khối Paraffin
  - + Cắt mảnh và dán mảnh

## **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 90 phút.

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-3 micromet sẽ được cố định trong tủ âm và tiến hành quy trình nhuộm

- Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm
- Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được
- Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

### **4.2. Nhận định kết quả**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Nên dùng bình thót cổ đựng dung dịch bạc và khuấy kỹ mỗi khi thêm một giọt amoniac, vì nếu thêm quá nhiều amoniac sẽ làm cho dung dịch bạc kém tác dụng. Dung dịch bạc có thể pha hàng ngày trước sử dụng, nếu cần thiết.

- Dung dịch bạc amoniac có thể cất trữ ở 4°C trong vài tuần. Dung dịch này có thể nổ, nếu để tiếp xúc trực tiếp với ánh sáng mặt trời.

- Thời gian xử lý bằng dung dịch bạc – amoniac rất khác nhau phụ thuộc vào

nhiệt độ môi trường và hiệu lực của dung dịch bắc.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## **62. NHUỘM ZIEHL – NEELSEN TÌM VI KHUẨN LAO TRONG TỔ CHỨC**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Mô tả, hướng dẫn quy trình, cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm ziehl - neelsen.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Dựa vào đặc tính kháng cồn, kháng toan của vi khuẩn có trong tổ chức để tiến hành nhuộm màu và quan sát dưới kính hiển vi quang học

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### **2.2. Vật tư:**

- Dung dịch cố định bệnh phẩm
- Cồn ( $70^\circ$ ,  $80^\circ$ ,  $95^\circ$ ,  $100^\circ$ ).
- Xylen hay toluen.
- Nước cát 2 lần.
- Dung dịch fucshin 0,3%
- Dung dịch Phenol
- Dung dịch HCL 3%
- Cồn ethylic  $95^\circ$
- Dung dịch methylen 0,3%
- Bề nhuộm bằng thủy tinh.
- Bề thủy tinh đựng cồn, xylen
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Giá đựng tiêu bản
- Dung dịch tẩy nén
- Dung dịch dầu khoáng
- Dung dịch rửa
- Bộ kít nhuộm Ziehl Neelsen (khi nhuộm tự động)
- Bề nhuộm, giá đựng tiêu bản, lam kính, lamen, keo gắn lamen...
- Găng tay, kính phòng hộ, khẩu trang...

### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy cắt lát mỏng
- Tủ ấm
- Tủ hút
- Máy đo độ pH điện tử
- Kính hiển vi quang học
- Hệ thống chụp ảnh gắn với kính hiển vi
- Máy nhuộm đặc biệt
- Tủ lưu tiêu bản

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Cố định

Bệnh phẩm lấy ra khỏi cơ thể được đưa ngay vào dung dịch cố định (formol đậm trung tính 10%, formol 10%, Bouin...) với tỷ lệ thể tích dung dịch cố định khuyến cáo nhiều gấp 20-30 lần thể tích bệnh phẩm. Thời gian cố định từ 2-24 giờ tùy theo mảnh bệnh phẩm to hay nhỏ.

- Sau khi cố định, bệnh phẩm được thực hiện qua các khâu kỹ thuật sau:
  - + Chuyển bệnh phẩm
  - + Vùi parafin
  - + Đúc khối parafin
  - + Cắt mảnh và dán mảnh

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 90 phút.**

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

#### **4.1.1. Quy trình nhuộm thủ công**

- Cắt và dán mảnh
- + Cắt mảnh với độ dày 2-4 $\mu$ m. Lấy các lát cắt đạt tiêu chuẩn (mỏng đều, không rách, không xước, không nhăn và lấy hết mặt bệnh phẩm).

+ Dùng que tăm, đưa nhẹ nhàng các lát cắt vào phiến kính (có mã số của bệnh phẩm) đã nhúng qua albumin, đặt lên bàn hơ hoặc thả các lát cắt vào khay nước ấm, để mảnh cắt dãn đều rồi vớt mảnh cắt, đặt lên phiến kính đã được tráng Albumin.

+ Dựng tiêu bản trên giá đựng tiêu bản.

+ Đưa tiêu bản vào tủ ấm 37°C.

- *Nhuộm tiêu bản*

+ Cố định bệnh phẩm 30 phút ở 70 °C

+ Ngâm vào 3 bể xylen, mỗi bể 5 phút

+ Ngâm vào 3 bể cồn ( 80°, 90°, 96° ) mỗi bể 5 phút

+ Rửa nước 5 phút

+ Nhỏ dung dịch Fuchsin phủ kín bệnh phẩm

+ Hơ nóng cho bốc hơi 3 lần ( không được sôi ), để nguội

+ Rửa nước

+ Tẩy màu bằng dung dịch cồn acid cho đến khi phai hết màu đỏ

+ Rửa nước

+ Nhỏ dung dịch xanh methylene phủ kín bệnh phẩm trong 1 phút

+ Rửa nước

+ Khử nước bằng cồn rồi qua xylen và găm lamen

#### 4.1.2. Quy trình nhuộm tự động

- Tiêu bản sau khi được cắt ở độ dày 2-4 micromet sẽ được cố định trong tủ ấm và tiến hành quy trình nhuộm.

- Chuẩn bị các bình hóa chất cho máy và bộ kit nhuộm

- Tiêu bản được mã hóa và dán barcode để máy có thể nhận biết được

- Cho tiêu bản vào buồng nhuộm và thực hiện quy trình nhuộm tự động

#### 4.2. Nhận định kết quả

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

#### 4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### 5. NHŨNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Chú ý hạn sử dụng hóa chất

- Thường xuyên kiểm tra hệ thống rửa của máy

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

### **63. CHUẨN BỊ MẪU MÔ VÀ ĐỌC TỐN THƯƠNG TRÊN KÍNH HIỂN VI ĐIỆN TỬ QUÉT**

#### **1. ĐẠI CƯƠNG**

##### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Chuẩn bị mô y sinh học và vi sinh vật để soi trên kính hiển vi điện tử quét, quan sát cấu trúc siêu vi thể bề mặt mẫu.

##### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Kỹ thuật này dùng để quan sát bề mặt mẫu kích thước cỡ nanomet dùng trong chẩn đoán, nghiên cứu và soi đặc điểm hình dạng cấu trúc bên ngoài mô.

Nguyên lý của phương pháp là các mô sẽ được cố định, làm khô, mạ phủ bằng kim loại nặng để chùm điện tử electron có thể quét trên bề mặt mẫu. Việc tạo ảnh của mẫu vật được thực hiện thông qua ghi nhận và phân tích các bức xạ phát ra từ tương tác của chùm điện tử với bề mặt mẫu vật.

#### **2. CHUẨN BỊ**

##### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 02
- Kỹ thuật viên: 02

##### **2.2. Vật tư, phương tiện, hóa chất**

- Chai, lọ thủy tinh có nắp đựng hóa chất và mẫu (Số lượng lọ phụ thuộc vào số lượng mẫu)

- Dung dịch khử khoáng (đối với các mẫu mô xương, răng)
- Dung dịch glutaraldehyde
- Dung dịch đệm cacodylat
- Dung dịch axit Osmic
- Bộ dụng cụ tiểu phẫu (Gồm dao, kéo, nia, kẹp có máu và không máu)
- Effpendof 0,5ml
- Cồn 96° (để pha các nồng độ khác nhau)
- Cồn tuyệt đối
- Nước cát
- Giấy lọc
- Băng dính cacbon
- Kính phòng hộ: 03 chiếc
- Acetone
- T-Butyl
- Isoamyl acetate

- Ống hút nhựa
- Xilanh 5ml
- Găng tay, khẩu trang, kính bảo vệ mắt và quần áo bảo hộ: 03 bộ.
- Dung dịch khử trùng (Cồn 96°) dùng làm sạch dụng cụ,
- Kim loại mạ phủ: Vàng, Platinum, Palladium hoặc Chromium...

### **2.3. Trang thiết bị**

- Hệ thống kính hiển vi điện tử quét,
- Máy mạ phủ
- Máy bóc bay hơi
- Máy làm khô mẫu ở điểm tối hạn
- Máy kiểm tra độ pH dung dịch
- Tủ lạnh, hộp cách nhiệt chứa đá khô hoặc đá lạnh để lưu giữ và vận chuyển mẫu bệnh phẩm.
- Điều hòa nhiệt độ.
- Tủ hút phòng thí nghiệm.
- Kính soi nồng
- Cân vi lượng.
- Vòi nước chảy, các dụng cụ
- Chai thủy tinh có nắp để đựng bệnh phẩm đã pha còn dư lại để đem huỷ.
- Bình có chứa dung dịch cố định để lưu bệnh phẩm xét nghiệm thêm.

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

#### *Với mẫu mô y sinh học tươi*

- Lấy bệnh phẩm: Tiến hành như quy trình thường quy giải phẫu bệnh.
- Việc lấy mẫu được thực hiện bởi các khoa lâm sàng, phòng thí nghiệm, nhà nghiên cứu và gửi bệnh phẩm về các phòng nghiên cứu siêu cấu trúc.

- Thu thập mẫu bệnh phẩm:
- + Đo chiều dài mảnh sinh thiết
- + Vẽ hoặc chụp lại hình ảnh mẫu
- + Mẫu có kích thước 0,5 x 0,5 x 0,5 cm.
- + Cố định ngay trong lọ đựng 3-5ml dung dịch glutaraldehyde 2,5% .

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm:

- Có ghi đầy đủ thông tin theo quy định (họ tên người bệnh, tuổi, giới, tên khoa phòng yêu cầu xét nghiệm),
- Có ghi ngày vào viện, chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian phuơng pháp, vị trí, lấy mẫu bệnh phẩm, số lượng bệnh phẩm).

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên người yêu cầu xét nghiệm.
- Có phần mô tả đại thể:
  - + Loại mô xét nghiệm
  - + Vùng lấy bệnh phẩm
  - + Số lượng bệnh phẩm lấy xét nghiệm
  - + Màu sắc bệnh phẩm
  - + Kích thước bệnh phẩm
  - + Đặc điểm hình thái diện cắt

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm mô bệnh học, giải phẫu bệnh.

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Chuẩn bị mẫu, hóa chất và chất đúc**

##### **4.1.1. Chuẩn bị mẫu**

###### **- Lấy mẫu từ mô y sinh học:**

Lấy mẫu từ mô tươi tốt hơn mô đã được cố định thường quy. Cần nhanh chóng lấy mẫu ngay khi bệnh phẩm được lấy ra khỏi cơ thể.

Đặt bệnh phẩm lên thớt nhựa cứng hoặc thớt thuỷ tinh sạch.

Nhỏ vài giọt dung dịch bảo quản glutaraldehyde 2,5% lên vùng khác của tấm thớt, đặt các lát cắt mô lên phía trên và phủ lên trên với vài giọt dung dịch glutaraldehyde 2,5%.

Pha nhỏ các lát cắt thành những khối 1mm<sup>3</sup> bằng dao sắc và nhúng bệnh phẩm vào dung dịch glutaraldehyde 2,5% lạnh (4°C).

Lấy 3-5 mảnh mô là đủ. Nếu bệnh phẩm có nhiều vùng tổn thương khác nhau trên đại thể, cần lấy riêng và đưa đến phòng xét nghiệm hiển vi điện tử trong những lô riêng biệt.

Mô có thể được giữ trong dung dịch cố định dùng cho hiển vi điện tử trong nhiều ngày ở 4°C (không quá 30 ngày) trước khi đưa đến phòng xét nghiệm hiển vi điện tử.

###### **- Lấy mẫu y sinh học từ mô được cố định bảo quản**

Mô đã được cố định bảo quản trong formol trung tính 10% và các dung dịch bảo quản khác.

Cắt bỏ lát mỏng 1mm từ bờ của bệnh phẩm nơi tiếp xúc trực tiếp với dung dịch cố định, cho vào trong bình nước ngâm rửa dưới vòi nước sạch liên tục 48h.

Sau đó tiến hành như đối với mô tươi.

- **Các mẫu xương:** được khử khoáng bằng dung dịch ethylen diamin tetra acetic (EDTA) 5%, thời gian khử khoáng từ 15 đến 20 ngày (thường sử dụng 25 - 30 ml dung dịch EDTA 5% cho một gam xương).

Tiến hành khử khoáng như sau: Dùng một lớp gạc bọc các mẫu xương, lấy một sợi chỉ buộc và treo mẫu lơ lửng trong lọ dung dịch để mẫu được tiếp xúc đều với dung dịch khử khoáng. Hàng ngày lắc đều dung dịch khử khoáng từ 1 đến 2 lần. Sau mỗi tuần thay dung dịch mới. Cuối tuần thứ 2 kiểm tra kết quả khử khoáng bằng các phương pháp sau:

+ Phương pháp cơ học: Dùng kim khâu xuyên vào cạnh mẫu xương, khi kim xuyên qua mà có cảm giác mềm tay là quá trình khử khoáng đã hoàn thành.

+ Phương pháp hóa học: Lấy 1 ml dung dịch amoni oxalat  $\text{NH}_4\text{C}_2\text{O}_4$  5% hay natri oxalat  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  5%; cho một trong hai dung dịch vào dung dịch khử khoáng, nếu có tủa là sự khử khoáng chưa hoàn thành.

#### **4.1.2. Chuẩn bị dung dịch để rửa và cố định mẫu**

- Chuẩn bị đậm cacodylate 0,2M và 0,3M
- Chuẩn bị dung dịch cố định glutaraldehyde 2,5%
- Chuẩn bị dung dịch axit Osmic 1%
- Dung dịch cồn các nồng độ: 50°, 70°, 80°, 85°, 90°, 95°
- Chuẩn bị các dung dịch khác

#### **4.2. Tiến hành xử lý mẫu cho nghiên cứu trên kính hiển vi điện tử quét**

1. Rửa lại mẫu bằng đậm cacodylat 0,3M, 2 lần x 10 phút/lần.
  2. Cố định mẫu trong glutaraldehyd 2,5% trong 12 giờ (để qua đêm), ở 40°C;
  3. Rửa mẫu bằng đậm cacodylat 0,1M, 2 lần x 10 phút/lần;
  4. Cố định bổ sung bằng axit osmic 1% trong 4-6 giờ), ở 40°C;
  5. Rửa lại mẫu bằng đậm cacodylat 0,1M, 2 lần x 10 phút/lần.
  6. Khử nước các mẫu theo qui trình:
    - Cồn ethanol 50°, 2 lần x 15 phút/lần;
    - Cồn ethanol 70°, 2 lần x 15 phút/lần;
    - Cồn ethanol 80°, 2 lần x 15 phút/lần;
    - Cồn ethanol 90°, 2 lần x 15 phút/lần;
    - Cồn ethanol 95°, 2 lần x 15 phút/lần;
    - Cồn ethanol 100°, 2 lần x 15 phút/lần.
  7. Làm khô mẫu:
- Tùy thuộc vào loại mẫu mà áp dụng các phương pháp làm khô khác nhau như sau:

- Làm khô tự nhiên (đối với các mẫu mô có bề mặt tương đối rắn chắc: xương, răng, tóc, móng...) bằng cách khử cồn trong các mẫu xương bằng ether:

- + Cồn ethanol 100°, ether nguyên chất (tỉ lệ 1/1) x 20 phút/lần x 1 lần;

- + Ether nguyên chất x 20 phút/lần x 1 lần;

- + Làm khô mẫu trong không khí.

- Làm khô bằng bốc bay (đối với các mẫu mô mềm) bằng cách khử cồn ethanol trong các mẫu mô bằng T – Butyl:

- + Ngâm các mẫu mô trong cồn T - Butyl x 30 phút/lần x 3 lần. Sau lần 3 để trong ngăn đá tủ lạnh 30 phút đến 1 giờ để cồn T - Butyl chuyển dạng tinh thể.

- + Bốc bay cồn T - Butyl trong 2-5h.

- Làm khô tại điểm tối hạn (là phương pháp tối ưu nhất để bảo tồn bề mặt mẫu) được thực hiện bằng máy làm khô tại điểm tối hạn với các bước chính sau:

- + Ngâm các mẫu trong isoamyl acetate;

- + Thay thế isoamyl acetate bằng CO<sub>2</sub> lỏng;

- + Làm bay hơi CO<sub>2</sub> lỏng ở điểm tối hạn.

### 8. Mạ phủ mẫu:

Gắn mẫu trên đế mang mẫu của kính hiển vi điện tử quét bằng băng dính cacbon, hướng bề mặt quan sát lên trên.

Mạ phủ mẫu bằng vàng/Palladium dày 40-60nm trong thời gian 45 - 60 giây, hoặc có thể mạ phủ mẫu bằng cacbon và sau đó là đồng trên máy mạ phủ mẫu.

### 9. Soi trên kính HVĐT quét.

Đưa mẫu vào máy, vận hành, soi và chụp ảnh theo quy trình và mục đích cần đánh giá, nghiên cứu.

### 4.3. Nhận định kết quả

Kết quả được Bác sĩ Giải phẫu bệnh đọc trên kính hiển vi điện tử quét

### 4.4. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định.

## 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ

### 5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Pha mẫu gây tổn thương, bầm rập mẫu; Sử dụng lưỡi dao sắc, cắt gọn 1 thì, không cưa, kéo mẫu. Dùng nĩa chuyên dụng giữ mẫu.

- Có định nhầm vào dung dịch khác: loại bỏ và lấy lại bệnh phẩm mới

- Không kịp thời cố định ngày trong dung dịch glutaraldehyd, thời gian cố định không đủ. Bệnh phẩm dính vào thành lọ đựng mẫu, không được ngâm trong dung dịch cố định làm hỏng bệnh phẩm: nên cho lượng dung dịch đủ quy định vào lọ trước

khi pha và thả bệnh phẩm ngập trong dung dịch, sau đó đậy nắp và lắc đều lọ đựng mẫu.

### **5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật**

- Mạ phủ nhám mặt cắt và vùng định quan sát: Mạ phủ lại

### **5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật**

+ Tiêu bản nhăn, rách: Có thể do: Chất đúc không đạt yêu cầu, tủ ám không bảo đảm nhiệt độ, do bản thân mẫu

+ Tiêu bản bị quá nhạt hoặc quá đậm: Kiểm tra lại hóa chất và thời gian nhuộm

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. **Vi Huyền Trác** (1976), *Các kỹ thuật hiển vi học*, Nhà xuất bản y học, Hà Nội.
2. **Jeol – Serving Advanced Technology**, A guide to Scanning Microscope Observation
3. **Murtey, M. D., & Ramasamy, P.** (2016). Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy – Life Sciences. InTech. doi: 10.5772/61720
4. **Chris G. Jones** (2012), Scanning Electron Microscopy: Preparation and Imaging for SEM, Methods Mol Biol. 2012;915:1-20. doi: 10.1007/978-1-61779-977-8\_1.

## **64. CHUẨN BỊ MẪU MÔ VÀ ĐỌC TỐN THƯƠNG TRÊN KÍNH HIỂN VI ĐIỆN TỬ TRUYỀN QUA**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Chuẩn bị tiêu bản mô y sinh học để soi trên kính hiển vi điện tử truyền qua, quan sát cấu trúc siêu vi thể.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Kỹ thuật này dùng để quan sát cấu trúc ở cấp độ siêu vi thể kích thước cỡ nanomet các mẫu mô y sinh học, dùng trong chẩn đoán, nghiên cứu và đánh giá đặc điểm cấu trúc mô.

Nguyên lý của phương pháp là các mô sẽ được cố định, cắt lát và nhuộm để chùm điện tử electron có thể bắn xuyên qua các lát cắt ở mức siêu mỏng, mức độ cản điện tử tại các vị trí sẽ khác nhau cho ra hình ảnh mẫu.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện**

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 02
- Kỹ thuật viên: 02

#### **2.2. Vật tư, phương tiện, hóa chất**

- Chai, lọ, cốc thủy tinh đựng hóa chất và mẫu (Số lượng phụ thuộc vào số mẫu)
- Xylen,
- Dung dịch khử khoáng (đối với các mẫu mô xương, răng)
- Dung dịch Glutaraldehyde 2,5%.
- Dung dịch đệm cacodylat
- Dung dịch axit Osmic
- Bộ dụng cụ tiêm phẫu (Gồm dao, kéo, nĩa, kẹp có máu và không máu)
- Eppendorf 0,5ml
- Bình phun nước 500 ml.
- Cồn 96° (để pha các nồng độ khác nhau)
- Cồn tuyệt đối
- Nước cắt
- Giấy lọc
- Parafin dạng băng cuộn
- Lam kính, lamen sạch.
- Keo gắn lamen
- Lưới đồng

- Nia gấp lưới đồng (chuyên dụng)
- Propylen oxit
- Bô chất đúc epon hoặc colodion
- Khuôn đúc block
- Formvar (làm màng lưới đồng)
- Chloroform
- Ethanol
- Xanh Toludin 1%
- Hóa chất nhuộm tương phản:
  - + Dung dịch kim loại nặng: dung dịch Uranyl acetat 1%, dung dịch chì citrat.
  - + Dung dịch NaOH.
  - Ống hút nhựa (pipet nhựa)
  - Xilanh 5ml
  - Đĩa petri kích thước 10cm.
  - Đầu lọc thuốc nhuộm siêu cấu trúc
  - Giá đựng tiêu bản, nhãn dán, bút ghi nhãn (bút chì và bút mực)
  - Kính phòng hộ, găng tay các loại, mặt nạ phẫu thuật, áo choàng phẫu thuật.
  - Găng tay, khẩu trang, kính bảo vệ mắt và quần áo bảo hộ: 02 bộ.
  - Dung dịch khử trùng, vệ sinh,

### **2.3. Trang thiết bị**

- Hệ thống kính hiển vi điện tử truyền qua,
- Tủ lạnh, hộp cách nhiệt chứa đá khô hoặc đá lạnh để lưu giữ và vận chuyển mẫu bệnh phẩm.
- Máy rửa siêu âm (rửa lưới đồng)
- Tủ ám; Máy kiểm tra độ pH dung dịch
- Máy Gọt block;
- Máy cắt dao thủy tinh;
- Máy cắt lát siêu mỏng (ultramicrotome), có dao kim cương và dao thủy tinh
- Kính hiển vi quang học;
- Điều hòa nhiệt độ.
- Tủ hút phòng thí nghiệm.
- Kính hiển vi soi nỗi
- Cân vi lượng.
- Vòi nước chảy, các dụng cụ
- Chai thuỷ tinh có nắp để đựng bệnh phẩm đã pha còn dư lại để đem huỷ.
- Bình có chứa dung dịch cố định để lưu bệnh phẩm xét nghiệm thêm

## 2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

### *Với mẫu mô y sinh học tươi*

- Lấy bệnh phẩm: Tiến hành như quy trình thường quy giải phẫu bệnh.

Việc lấy mẫu được thực hiện bởi các khoa lâm sàng, phòng thí nghiệm, nhà nghiên cứu và gửi bệnh phẩm về các phòng nghiên cứu siêu cấu trúc.

- Thu thập mẫu bệnh phẩm:

- + Đo chiều dài mảnh sinh thiết
- + Vẽ hoặc chụp lại hình ảnh mẫu
- + Mẫu có kích thước  $0,5 \times 0,5 \times 0,5$  cm.
- + Cố định ngay trong lọ đựng 3-4ml dung dịch glutaraldehyde 2,5% có đệm.

*Với mẫu mô đã đúc paraffin:* Sử dụng mẫu đã đúc trong block khối nén. Khử nén trong tủ âm ở  $56^{\circ}\text{C}$  và Xylen. Sau đó cố định ngay trong lọ đựng glutaraldehyd 2,5% có đệm.

### *Với mẫu y sinh học đã qua cố định bảo quản:*

- Lấy bệnh phẩm ra khỏi dung dịch cố định bảo quản, cắt bỏ phía ngoài mô, khoảng 1mm từ bờ ngoài. Tiến hành ngâm rửa mẫu trong bình dưới vòi nước sạch chảy liên tục 48h.

- Sau đó tiến hành như với mô tươi.

## 2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm:

- Có ghi đầy đủ thông tin theo quy định (họ tên người bệnh, tuổi, giới, tên khoa phòng yêu cầu xét nghiệm),

- Có ghi ngày vào viện, chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian phương pháp, vị trí, lấy mẫu bệnh phẩm, số lượng bệnh phẩm).

- Có ghi rõ yêu cầu xét nghiệm, tên người yêu cầu xét nghiệm.

- Có phần mô tả đại thể:

- + Loại mô xét nghiệm
- + Vùng lấy bệnh phẩm
- + Số lượng bệnh phẩm lấy xét nghiệm
- + Màu sắc bệnh phẩm
- + Kích thước bệnh phẩm
- + Đặc điểm hình thái diện cắt

## 3. AN TOÀN

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm mô bệnh học, giải phẫu bệnh.

## 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 4.1. Chuẩn bị mẫu, hóa chất và chất đúc

#### 4.1.1. Chuẩn bị mẫu

##### - Lấy mẫu từ mô tươi:

Lấy mẫu từ mô tươi tốt hơn mô đã được cố định thường quy. Cần nhanh chóng lấy mẫu ngay khi bệnh phẩm được lấy ra khỏi cơ thể.

Đặt bệnh phẩm lên thớt nhựa cứng hoặc thớt thuỷ tinh sạch.

Nhỏ vài giọt dung dịch bảo quản glutaraldehyde 2,5% lên vùng khác của tấm thớt, đặt các lát cắt mô lên phía trên và phủ lên trên với vài giọt dung dịch glutaraldehyde 2,5%.

Pha nhỏ các lát cắt thành những khối  $1\text{mm}^3$  bằng dao sắc và nhúng bệnh phẩm vào dung dịch glutaraldehyde 2,5% lạnh ( $4^\circ\text{C}$ ).

Lấy 5-15 mảnh mô là đủ. Nếu bệnh phẩm có nhiều vùng tổn thương khác nhau trên đại thể, cần lấy riêng và đưa đến phòng xét nghiệm hiển vi điện tử trong những lọ riêng biệt.

Mô có thể được giữ trong dung dịch cố định dùng cho hiển vi điện tử trong nhiều ngày ở  $4^\circ\text{C}$  (không quá 30 ngày) trước khi đưa đến phòng xét nghiệm hiển vi điện tử.

##### - Lấy mẫu từ mô được cố định thường quy

Mô cố định thường qui là mô được cố định trong formol trung tính 10% có thể có nhiều lỗi gây ra do cố định, nhưng những hình thái cần đánh giá trên kính hiển vi điện tử để chẩn đoán vẫn còn được bảo tồn (như các cầu liên bào, hạt chế tiết thần kinh, hạt sắc tố, các bào quan, màng, nhân tế bào...). Cách tiến hành lấy mẫu như sau:

Cắt bỏ lát mỏng 1mm từ bờ của bệnh phẩm nơi tiếp xúc trực tiếp với dung dịch cố định.

Sau đó tiến hành như đối với mô tươi.

**- Các mẫu xương:** được khử khoáng bằng dung dịch ethylen diamin tetra acetic (EDTA) 5%, thời gian khử khoáng từ 15 đến 20 ngày (thường sử dụng 25 - 30 ml dung dịch EDTA 5% cho một gam xương).

Tiến hành khử khoáng như sau: Dùng một lớp gạc bọc các mẫu xương, lấy một sợi chỉ buộc và treo mẫu lơ lửng trong lọ dung dịch để mẫu được tiếp xúc đều với dung dịch khử khoáng. Hàng ngày lắc đều dung dịch khử khoáng từ 1 đến 2 lần. Sau mỗi tuần thay dung dịch mới. Cuối tuần thứ 2 kiểm tra kết quả khử khoáng bằng các phương pháp sau:

+ Phương pháp cơ học: Dùng kim khâu xuyên vào cạnh mẫu xương, khi kim xuyên qua mà có cảm giác mềm tay là quá trình khử khoáng đã hoàn thành.

+ Phương pháp hoá học: Lấy 1 ml dung dịch amoni oxalat  $\text{NH}_4\text{C}_2\text{O}_4$  5% hay natri oxalat  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  5%; cho một trong hai dung dịch vào dung dịch khử khoáng, nếu có tủa là sự khử khoáng chưa hoàn thành.

#### - Các mẫu mô đã được xử lý và đúc paraffin

##### *Khử paraffin: Khử paraffin bằng xylen*

- + Xylen lần 1: Đέ qua đêm
- + Xylen lần 2: 30 phút
- + Xylen lần 3: 30 phút

##### *Hydrat hóa mẫu*

- + Cồn tuyệt đối lần 1: 10 phút
- + Cồn tuyệt đối lần 2: 15 phút
- + Cồn 95°: 10 phút
- + Cồn 90°: 10 phút
- + Cồn 80°: 10 phút
- + Cồn 70°: 10 phút
- + Đệm Cacodylat 0,3M (pH 7,2-7,4): 04 lần, mỗi lần 10 phút

#### 4.1.2. Chuẩn bị dung dịch để rửa và cố định mẫu

- Chuẩn bị đệm Cacodylate 0,2M và 0,3M
- Chuẩn bị dung dịch cố định Glutaraldehyde 2,5%
- Chuẩn bị dung dịch Axit Osmic 1%
- Dung dịch cồn các nồng độ: 30,50, 70, 80, 85, 90, 95%
- Chuẩn bị các dung dịch khác.

#### 4.1.3 Chuẩn bị chất đúc Epoxy

- \* EPON 812..... 48g
- \* DDSA ..... 19g
- \* MNA..... 33g
- \* DMP-30 ..... 2g

Cách pha như sau:

1. Cho các phần EPON 812, DDSA và MNA vào một cốc thủy tinh rồi khuấy đều.
2. Tiếp tục cho thêm DMP-30 vào rồi lắc kỹ trong 5-10 phút

#### 4.2. Tiến hành xử lý mẫu mô nghiên cứu trên kính HVĐTTQ

1. Mẫu mô có kích thước 1mm x 1mm x 1mm.
2. Rửa mẫu bằng đệm Cacodylat 0,1M 2 lần x 10 phút/lần;
3. Cố định mẫu trong Glutaraldehyde 2,5 % trong 2-4 giờ;
4. Rửa mẫu bằng đệm Cacodylat 0,1M 2 lần x 10 phút/lần;
5. Cố định mẫu bằng axit Osmic 1% trong đệm cocadylat trong 2 giờ;

6. Rửa lại mẫu bằng đệm cacodylat 0,1M 2 lần x 10 phút/lần;
  7. Khử nước bằng cồn ethanol theo qui trình:
    - Cồn ethanol 50° x 10 phút/lần x 2 lần,
    - Cồn ethanol 70° x 10 phút/lần x 2 lần,
    - Cồn ethanol 80° x 10 phút/lần x 2 lần
    - Cồn ethanol 90° x 10 phút/lần x 2 lần,
    - Cồn ethanol 95° x 10 phút/lần x 2 lần,
    - Cồn ethanol 100° x 10 phút/lần x 2 lần.
  8. Khử cồn ethanol theo qui trình:
    - Chuyển qua propylen oxide, 3 lần x 10 phút/lần;
    - Chuyển mẫu vào hỗn hợp propylen oxide + epon tỷ lệ 2/1 để trong 30 phút;
    - Chuyển mẫu vào hỗn hợp propylen oxide + epon tỷ lệ 1/1 để trong 1 giờ;
    - Chuyển mẫu vào hỗn hợp propylen oxide + epon tỷ lệ 1/2 để trong 1 giờ;
    - Chuyển mẫu vào epon trong 2 giờ (hoặc qua đêm)
  9. Đúc mẫu bằng chất đúc epoxy, để tủ âm 35°C trong 24 giờ, sau đó 45°C trong 24 giờ và 60°C trong 24 giờ.
  10. Làm tiêu bản bán mỏng
- Mục đích:
- Định hướng cho cắt siêu mỏng;
  - Sử dụng để nghiên cứu vi thể khi nhuộm hóa mô hay nhuộm miễn dịch sau khi tẩy epoxy.
- Cắt tiêu bản bán mỏng*
- Gọt thô: các mẫu đúc trong block epon được gọt bằng máy hoặc tay, sau đó tạo dáng một cách chính xác trên máy cắt siêu mỏng bằng lưỡi dao thủy tinh. Khác với khi gọt tinh để cắt siêu mỏng, gọt để cắt bán mỏng sao cho sau khi cắt, trên tiêu bản bán mỏng ở rìa ngoài là epoxy để có thể soi được toàn bộ bề mặt của mẫu (cả trong và ngoài)
- Cắt bán mỏng trên máy cắt siêu mỏng:*
- + Đặt block gọt thô lên máy siêu cắt và cắt bán mỏng (dày từ 0,5-2 micromet) bằng lưỡi dao thủy tinh hoặc kim cương.
  - + Dùng một mũi kim tiêm hoặc một búi chải lông mi câu các lát cắt bán mỏng lên và đặt chúng lần lượt vào giọt nước cắt trước đó đã nhỏ lên tấm lam kính sạch.
  - + Lam kính được chuyển vào đặt lên tấm sấy (70-90°) cho tới khi giọt nước bay hơi hết hoàn toàn.
- Nhuộm tiêu bản bán mỏng*
- Dung dịch nhuộm: xanh toluidin 1% hoặc xanh metylen 1%

### Kỹ thuật nhuộm:

- Nhỏ một giọt dung dịch thuốc nhuộm lên lát cắt;
- Đặt tiêu bản lên tấm sấy cho tới khi các mép lát cắt dính thuốc nhuộm bắt đầu khô.
- Rửa nhẹ nhàng lam kính bằng một bình có vòi phun nước cất;
- Đặt tiêu bản lên tấm sấy để làm khô trước khi kiểm tra trên kính HVQH.

*Chú ý:* Không được phun nước rửa trực tiếp lên các lát cắt vì chúng có thể bong ra khỏi lam. Nếu muốn có nhiều lát cắt để quan sát thì thu lấy những dải dài các lát cắt dính nối tiếp.

### 11. Làm tiêu bản siêu cấu trúc

#### - Chuẩn bị lưới

+ Lựa chọn lưới đỡ mẫu (chất liệu, kích thước mắt lưới) tùy theo mục đích nghiên cứu. Để nghiên cứu siêu cấu trúc mô UBQ thường sử dụng lưới đồng loại 200 mắt lưới.

+ Làm sạch lưới: Trước khi sử dụng, tất cả các lưới phải được rửa sạch bằng siêu âm trong nước hoặc ethanol và tiếp đó trong acetone. Sau khi để lưới nằm ổn định ở đáy một chiếc cốc nhỏ và rót đồ chất lỏng đi, cốc được lật úp trên một tờ giấy lọc và đặt vào sấy ở 60°C cho tới khi thật sự khô.

#### +Tạo màng đỡ của lưới bằng màng formvar:

- Rửa sạch một lam kính bằng xà phòng và nước. Làm khô lam kính;
- Nhúng lam kính vào trong một cốc thủy tinh chứa dung dịch Formvar 0,5% trong chloroform hay trong ethylene dichloride (W/V). Nhúng lam ngập nhiều nhất là khoảng  $\frac{3}{4}$  độ dài của nó mà không ngập hẳn trong dung dịch;
- Sau 30 giây tiếp theo rút lam ra khỏi cốc và để khô trong không khí;
- Dùng lưới dao lam rạch các đường thẳng theo các mép của lam kính và thổi nhẹ lên mặt lam và màng trước khi nhúng vào nước;
- Làm nổi màng trên mặt nước sạch bằng cách nhúng từ từ mép ngắn của lam kính theo góc 30-45° vào trong cốc (đã đổ gần đầy nước cất 2 lần). Đẩy gần lam kính vào trong nước cho đến khi màng formvar tách hoàn toàn khỏi lam và nổi trên mặt nước;
- Đặt nhẹ nhàng lần lượt lưới đồng lên trên màng (mặt có viền bóng lên trên), bắt đầu từ 1 trong 4 góc để dễ dàng quan sát phần diện tích màng đã đặt lưới;
- Lấy một mẫu giấy thấm với kích thước thích hợp đặt trên các lưới và án nhẹ lên nó. Dùng kẹp kéo giấy có dính lưới cùng với màng

Formvar ra khỏi mặt nước và lật ngược tấm giấy từ dưới lên trên, đặt chúng trên giấy lọc và để khô qua đêm.

Như vậy đã có lưới phủ màng Formvar thích hợp để giữ mẫu cho quan sát trong kính hiển vi điện tử.

- Cắt lát mẫu siêu mỏng trên máy cắt siêu mỏng ultramicrotome

+ *Gọt tinh*: Sau khi xác định được những vùng block mẫu đúc đáng quan tâm kiểm tra các lát cắt dày, có thể tiếp tục gọt thêm block mẫu để loại bỏ những phần mẫu không phù hợp. Thao tác này gọi là gọt tinh. Mục đích chung của việc gọt tinh là tạo ra được một chóp cụt với các mặt bên nghiêng từ 45° đến 60°. Đỉnh hình tháp cụt có dạng hình vuông, hình chữ nhật hoặc hình thang

+ *Vót lát cắt*:

Các lát cắt được vót thành từng đám từ 2 đến 4 lát bằng 1 que gạt lông mịn. Đặt các lát cắt nằm ở trung tâm lưới.

Vót các lát cắt lên lưới bằng cách luồn nhẹ lưới dưới dải lát cắt theo một góc 45° so với mặt nước thu được những dải lát cắt lên mặt lưới. Nâng nhẹ nhàng các dải lát cắt ra khỏi nước.

Có thể vót các lát cắt lên lưới bằng cách đưa lưới xuống áp trực tiếp vào lát cắt từ phía trên, phương pháp này các lát cắt thường bị dồn cụm lại, chồng lên nhau và gấp nếp, không phẳng.

Chú ý: các màng chất dẻo hoặc cacbon thường có xu hướng không dính với các lát cắt nên cần làm cho màng ưa nước bằng cách đặt màng dưới sự phóng điện trong thiết bị bóc bay chấn không giữ các lưới có phủ màng bằng cách để qua đêm trong tủ lạnh.

- Nhuộm tương phản mẫu bằng các dung dịch kim loại nặng: uranyl acetat, chì citrat,....

+ *Dung dịch nhuộm*: Dung dịch uranyl acetat 1%; Dung dịch chì citrat.

+ *Tiến hành nhuộm*

- Đặt giấy lọc vào đáy của đĩa petri và làm ướt bằng một lượng nước cất nhỏ;
- Đặt giấy parafin lên trên miếng giấy lọc ướt;
- Nhỏ các giọt thuốc nhuộm uranyl acetat lên trên bề mặt giấy parafin;
- Đặt các lưới đỡ mẫu nổi riêng rẽ trên các giọt thuốc nhuộm sao cho mặt có dính lát cắt hướng xuống dưới và đậy nắp đĩa petri lại, che sáng; để 15 phút;
- Rửa lưới bằng cách nhẹ nhàng nhúng vào trong một số cốc đựng nước cất, khoảng 15-20 lần nhúng/trong một cốc.

(Sau khi rửa có thể để khô và bảo quản riêng cho đến khi nhuộm chì hoặc nhuộm chì luôn)

- Chuyển lưỡi tới một giọt thuốc nhuộm chì citrate để 30 giây đến 15 phút
  - Lấy lưỡi ra khỏi giọt chì citrat sao cho còn giữ lại được giọt dung dịch trên lát cắt và nhúng trực tiếp 25 lần vào cốc đựng NaOH 1N;
  - Tiếp tục nhúng lưỡi trực tiếp vào cốc đựng nước cất 25 lần;
  - Đặt lưỡi trên giấy lọc và để khô trước khi kiểm tra trên TEM.
- **Kết quả:** *Hình ảnh trắng đen thể hiện mức độ cản điện tử khác nhau*
- + Vật chất ít, khói lượng riêng thấp (không bào): màu trắng hơn
  - + Vật chất nhiều (nhân, màng tế bào, melanin, ...): màu đen

#### **4.3. Nhận định kết quả**

Kết quả được Bác sĩ Giải phẫu bệnh đọc và đánh giá trên kính hiển vi điện tử truyền qua.

#### **4.4. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định.

### **5. NHŨNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

#### **5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật**

- Pha mẫu gây tổn thương, bầm rập mẫu; Sử dụng lưỡi dao sắc, cắt gọn 1 thì, không cưa, kéo mẫu. Dùng nĩa chuyên dụng giữ mẫu.
- Cố định nhầm vào dung dịch khác, loại bỏ và lấy lại bệnh phẩm mới
- Không kịp thời cố định ngay trong dung dịch glutaraldehyd, thời gian cố định không đủ. Bệnh phẩm dính vào thành lọ đựng mẫu, không được ngâm trong dung dịch cố định làm hỏng bệnh phẩm: nên cho lượng dung dịch đủ quy định vào lọ trước khi pha và thả bệnh phẩm ngập trong dung dịch, sau đó đậy nắp và lắc đều lọ đựng mẫu.

#### **5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật**

- Cắt quá dày hoặc quá mỏng mẫu: Đặt chế độ cắt chuẩn và cắt lại
- Cố định bở sung không đủ: cố định lại đúng quy trình.

#### **5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật**

- + Tiêu bản nhăn, rách: Có thể do: Chất đúc không đạt yêu cầu, tủ ám không bảo đảm nhiệt độ, do bản thân mẫu
- + Tiêu bản bị quá nhạt hoặc quá đậm: Kiểm tra lại hóa chất và thời gian nhuộm

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. **Vị Huyền Trác** (1976), *Các kỹ thuật hiển vi học*, Nhà xuất bản y học, Hà Nội.

2. **Nguyễn Kim Giao** (2004), *Hiện vi điện tử truyền qua*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội.
3. **Edna B. Prophet, Bob Mill, Jacquelyn B. Arrington, Leslie H. Sabin, M. D** (1992), Laboratory Methods in Histotechnology, Prepared by the Armed Forces institute of Pathology Washington, D. C; Published by the Ameican Registry of Pathology Washington, D. C.
4. **Parastou Tizro, Cecilia Choi, and Negar Khanlou** (2019), Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy: Methods and Protocols; Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 1897:417-424, January 2019. DOI:10.1007/978-1-4939-8935-5\_33.

**PHẦN III. CÁC QUY TRÌNH  
HOÁ MIỄN DỊCH VÀ LAI TẠI CHỖ**

## 65. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH CHO MỘT DẤU ẨN

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả và hướng dẫn cách thực hiện xét nghiệm và chẩn đoán bằng kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch trên mẫu mô bệnh học.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Hoá mô miễn dịch (HMMD) là sự kết hợp của hai chuyên ngành miễn dịch học và mô học, trong đó có việc ứng dụng các nguyên lý và các kỹ thuật của miễn dịch học để nghiên cứu tế bào và mô. Kỹ thuật hoá mô miễn dịch được sử dụng không chỉ để xác định xem một mô có biểu hiện (hay không biểu hiện) một kháng nguyên riêng biệt mà còn xác định tình trạng kháng nguyên của các tế bào riêng biệt trong mô đó và vị trí của các kháng nguyên này trong cấu trúc tế bào. Hoá mô miễn dịch giúp chẩn đoán phân biệt về bản chất và nguồn gốc của tế bào, bản chất của mô u thông qua sự hiện diện của một số kháng nguyên đặc hiệu, đặc biệt trong trường hợp các mô kém biệt hoá hoặc không biệt hoá trên mô học. Trong một số trường hợp, HMMD giúp cho việc chẩn đoán phân biệt giữa u lành và u ác, chẳng hạn như sử dụng một số dấu ấn miễn dịch trong chẩn đoán phân biệt các u lympho ác tính với các tổn thương khác của hạch. Hoá mô miễn dịch còn giúp xác định các dấu hiệu của thành phần tế bào ở mức sinh học phân tử, qua đó người ta có thể tìm thấy mối liên quan giữa tình trạng của tế bào và mô với các rối loạn về quá trình phát triển như quá trình phát sinh, phát triển của mô ung thư (các dấu hiệu liên quan đến gen ung thư, yếu tố phát triển bì, yếu tố tăng sinh...) hoặc các rối loạn khác như rối loạn chuyển hoá, rối loạn do viêm, nhiễm trùng gây ra.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### 2.2. Hóa chất, Vật tư:

- Lam kính có tráng chất gắn Silan (3-aminopropyltriethoxy-silane) hoặc lam kính tích điện dương.
- Dung dịch  $H_2O_2$  3%.
- Các kháng thể (dấu ẩn) mua của các hãng cung cấp (theo bộ, kể cả chứng). Mỗi loại kháng thể có cách thức pha loãng khác nhau theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
  - Hematoxylin để nhuộm nhân tế bào.
  - Dung dịch đệm: Đệm TBS (tris buffer Saline) hoặc đệm PBS, pH 7,2.
  - Bề nhuộm.

- Giá đựng tiêu bản (đứng và nằm ngang).
- Kẹp không mấu, kéo.
- Giấy lọc.
- Lam kính, lamen
- Lưỡi dao cắt lát mỏng.
- Kính phòng hộ, găng tay các loại.

### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy đo độ pH điện tử.
- Máy chuyền, xử lý bệnh phẩm tự động.
- Máy nhuộm hóa mô miễn dịch tự động
- Máy đúc khối parafin.
- Bàn hơi.
- Máy cắt lát mỏng (microtome).
- Thiết bị bọc lộ kháng nguyên: lò vi sóng hoặc nồi áp suất... hoặc sử dụng proteinase K\*.
- Tủ ám có điều chỉnh nhiệt độ 37<sup>0</sup> và 56<sup>0</sup>.
- Tủ lạnh.
- Điều hòa nhiệt độ.
- Tủ hút phòng thí nghiệm.
- Kính hiển vi 2 mắt để kiểm tra kết quả nhuộm.

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Bệnh phẩm là khối nén có chứa bệnh phẩm của bệnh nhân đã qua quá trình cố định – chuyền – đúc.

- Thường nên kèm theo tiêu bản nhuộm Hematoxyline – Eosin.
- Nếu mẫu mô không kèm theo tiêu bản nhuộm bằng phương pháp Hematoxylin -Eosin cần cắt nhuộm 1 tiêu bản trước.

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 150 – 300 phút

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

## **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### 4.1. Các bước thực hiện

\* Chuẩn bị tiêu bản nhuộm:

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh đọc lại tiêu bản Hematoxylin: Chọn khối nền phù hợp cho nhuộm hoá mô miến dịch; xem xét lại các dấu ấn cần nhuộm để chỉ định đầy đủ dấu ấn.

- Kỹ thuật viên cắt bệnh phẩm lên các lam kính chuyên dụng nhuộm hoá mô miến dịch, cắt các mẫu chứng kèm theo.

\* Tiến hành kỹ thuật:

- Sấy khô các phiến kính có lát cắt ở tủ ấm  $37^{\circ}\text{C}$  hoặc  $56^{\circ}\text{C}$ : 12 giờ

- Khử parafin: 10 phút;

- Nhúng nước cắt : 5 phút;

- Khử peroxidase nội sinh bằng dung dịch  $\text{H}_2\text{O}_2$  3%: 5 phút;

- Rửa các lam kính có lát cắt bằng nước cắt: 5 phút

- Bóc lộ kháng nguyên bằng thiết bị bóc lộ kháng nguyên như đun cách thuỷ trong nồi áp suất hoặc trong lò vi sóng hoặc sử dụng proteinase K\*.

- Rửa nước cắt: 5 phút;

- Rửa các lam kính bằng dung dịch TBS (Qua 2 bể, mỗi bể 3 phút): 6 phút;

- Ủ với kháng thể thứ nhất (primary antibody): 60 phút;

- Rửa các lam kính bằng dung dịch TBS (Qua 2 bể, mỗi bể 3 phút): 6 phút;

- Ủ với kháng thể thứ hai có gắn với biotin (Biotinylated secondary antibody): 30 phút;

- Rửa các lam kính bằng dung dịch TBS (Qua 2 bể, mỗi bể 3 phút): 6 phút;

- Ủ với phức hợp ABC hoặc streptavidin peroxidase: 30 phút;

- Rửa các lam kính bằng dung dịch TBS (Qua 2 bể, mỗi bể 3 phút): 6 phút;

- Phủ dung dịch tạo màu DAB (Diamino benzidin) hoặc EAC (3-amino-9-ethylcarbazole): 10 phút;

- Rửa các lam kính bằng dung dịch TBS (Qua 2 bể, mỗi bể 3 phút): 6 phút;

- Nhuộm nhân: bằng Hematoxylin: 1 phút;

- Rửa nước chảy;

- Nếu dùng DAB thì tiếp tục khử nước bằng cồn rồi qua xylen.

- Gắn lamen

\* Kết quả nhuộm:

- + Dương tính: có sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể trên tế bào và mô, được hiển thị bằng màu vàng nâu (nếu dùng DAB) hoặc màu đỏ (nếu dùng EAC).

- + Âm tính: không có sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể trên

tế bào và mô, không được hiển thị bằng màu vàng nâu (nếu dùng DAB) hoặc màu đỏ (nếu dùng EAC).

+ Nhân tế bào bắt màu xanh tím của Hematoxylin.

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

#### **KHÔNG CÓ TÍN HIỆU HOẶC TÍN HIỆU YẾU**

<b>Nguyên nhân</b>	<b>Cách khắc phục</b>
Khử paraffin không hết	Tăng thời gian khử paraffin hoặc thay thế dung dịch khử paraffin mới
Nhiệt độ ủ không chính xác	Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa hoặc tăng thời gian
Thời gian ủ với kháng thể 1 quá ngắn	Tăng thời gian ủ với kháng thể 1
Thời gian cố định quá dài	Kiểm tra lại quy trình cố định bệnh phẩm, bệnh phẩm cần được cố định trong khoảng 6-72 giờ

#### **TÍN HIỆU KHÔNG ĐỒNG ĐỀU GIỮA CÁC VÙNG TRÊN BỆNH PHẨM**

<b>Nguyên nhân</b>	<b>Cách khắc phục</b>
Tồn tại nhiều vùng khác nhau trên bệnh phẩm	Tăng thời gian cố định
Probe phân bố không đồng đều do có bọt khí	Thực hiện lại phản ứng và đảm bảo không có bọt khí
Kích thước bệnh phẩm quá lớn	Tăng thể tích dung dịch khi bơm

#### **NHUỘM NỀN CAO**

<b>Nguyên nhân</b>	<b>Cách khắc phục</b>
Quá trình rửa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra lại pH của dung dịch rửa (7,2-7,5)</li> <li>- Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa</li> </ul>

Thời gian ủ với kháng thể - Giảm thời gian ủ quá lâu

# MẤT HAY TIÊU BIẾN BỆNH PHẨM

<b>Nguyên nhân</b>	<b>Cách khắc phục</b>
Sấy tiêu bản không đúng	Kiểm tra lại nhiệt độ tủ sấy
Bộc lộ quá mức	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra lại nhiệt độ bộc lộ</li> <li>- Giảm thời gian bộc lộ</li> </ul>

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
  - Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
  2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
  3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 66. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH TỰ ĐỘNG CHO MỖI MỘT DẤU ÂN BẰNG MÁY

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán bằng phương pháp xét nghiệm hóa mô miễn dịch tự động bằng máy trên mẫu mô bệnh học. HMMD được sử dụng để xác định một mô có biểu hiện (hay không biểu hiện) một kháng nguyên riêng biệt và xác định tình trạng kháng nguyên của các tế bào riêng biệt trong mô đó và vị trí của các kháng nguyên trong cấu trúc tế bào.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Hoá mô miễn dịch (HMMD) là sự kết hợp của hai chuyên ngành miễn dịch học và mô học, trong đó có việc ứng dụng các nguyên lý và các kỹ thuật của miễn dịch học để nghiên cứu tế bào và mô. Kỹ thuật hoá mô miễn dịch được sử dụng không chỉ để xác định xem một mô có biểu hiện (hay không biểu hiện) một kháng nguyên riêng biệt mà còn xác định tình trạng kháng nguyên của các tế bào riêng biệt trong mô đó và vị trí của các kháng nguyên này trong cấu trúc tế bào. Hoá mô miễn dịch giúp chẩn đoán phân biệt về bản chất và nguồn gốc của tế bào, bản chất của mô u thông qua sự hiện diện của một số kháng nguyên đặc hiệu, đặc biệt trong trường hợp các mô kém biệt hoá hoặc không biệt hoá trên mô học. Trong một số trường hợp, HMMD giúp cho việc chẩn đoán phân biệt giữa u lành và u ác, chẳng hạn như sử dụng một số dấu ấn miễn dịch trong chẩn đoán phân biệt các u lympho ác tính với các tổn thương khác của hạch. Hoá mô miễn dịch còn giúp xác định các dấu hiệu của thành phần tế bào ở mức sinh học phân tử, qua đó người ta có thể tìm thấy mối liên quan giữa tình trạng của tế bào và mô với các rối loạn về quá trình phát triển như quá trình phát sinh, phát triển của mô ung thư (các dấu hiệu liên quan đến gen ung thư, yếu tố phát triển bì, yếu tố tăng sinh...) hoặc các rối loạn khác như rối loạn chuyển hoá, rối loạn do viêm, nhiễm trùng gây ra.

HMMD là một phương pháp nhuộm đặc biệt trong đó các kháng thể được sử dụng nhằm xác định sự hiện diện của các kháng nguyên đặc hiệu trong và/ hoặc trên bề mặt tế bào và mô.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý.

#### 2.2. Hóa chất, Vật tư:

- Dung dịch khử paraffin
- Dung dịch dầu khoáng phủ mẫu mô
- Dung dịch bọc lô kháng nguyên
- Dung dịch rửa các bước

- Kháng thể 1: Gắn với kháng nguyên mô, kháng thể 1 là kháng thể dùng luôn hay phải pha loãng tùy thuộc vào nhà sản xuất

- Bộ kit hiện màu
- Hematoxylin - dung dịch nhuộm nhân
- Dung dịch làm xanh nhân
- Keo gắn lamen
- Lamen
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Pipet, đầu côn
- Giá đựng kháng thể

### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy nhuộm hóa mô miễn dịch
- Máy cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- KHV quang học
- Tủ lạnh

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Mẫu bệnh phẩm là các khối nén chứa bệnh phẩm cần xét nghiệm. Nên đi kèm tiêu bản nhuộm Hematoxylin – Eosin để đánh giá (nếu không có cần cắt nhuộm bổ sung).

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh đọc tiêu bản Hematoxylin – Eosin, đánh giá lựa chọn khối nén phù hợp cho xét nghiệm, đánh giá lại và bổ sung các dấu ấn cần nhuộm.

- Mẫu bệnh phẩm được cắt mỏng, gắn lên lam kính chống bong (lam kính tráng silan hoặc lam kính tích điện dương).

- Trên tiêu bản phải có mẫu chứng dương và chứng âm thích hợp cho từng loại dấu ấn sinh học.

- Khối nén chứa u có chứa mẫu mô phải được bảo quản tốt còn đủ mô.

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm, các dấu ấn sinh học cần khảo sát.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 3-5 ngày làm việc,**

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh, phải có phòng thực hiện kỹ thuật hóa mô miễn dịch riêng, phòng phải có hệ thống thông khí tốt, hệ thống lạnh ổn định từ 23-26°C.

### 3. AN TOÀN

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm

### 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

#### 4.1. Các bước thực hiện

a. Kiểm tra hồ sơ

- Đổi chiểu mã số bệnh nhân trên lam kính và trên phiếu chỉ định

b. Thực hiện kỹ thuật

- Khối block bệnh phẩm được cắt lát mỏng 3-5 µm và dán lên lam kính hóa mô tích điện (hoặc lam tráng silan), và một lam kính sạch nhuộm HE.

- Để lam kính trong tủ âm 60-65°C trong 40-45 phút hoặc trong tủ 37°C qua đêm (12h)

- Cài đặt chương trình chạy máy nhuộm hóa mô tự động:

- B1: Chọn thời gian và nhiệt độ sấy tiêu bản;

- B2: Chọn nhiệt độ khử paraffin;

- B3: Khử protein nội sinh;

- B4: chọn mức thời gian bôi lộ kháng nguyên (tùy thuộc vào loại kháng thể nhuộm);

- B5: Chọn nhiệt độ ủ kháng thể (35-42 độ C), tùy thuộc vào từng loại kháng thể;

- B6: Chọn bước kháng thể 1 nhỏ tự động hoặc nhỏ tay, nếu chọn nhỏ tay, nếu chọn nhỏ tay thì máy sẽ bắt đầu nhuộm tiêu bản và thông báo cho người dụng đến giai đoạn nhỏ tay, mở các buồng ủ tiêu bản, nhỏ tay kháng thể, sau đó đóng buồng ủ và giữ nút trong vài giây để thông báo cho máy rằng kháng thể đã được cho vào tiêu bản.

Nếu sử dụng kháng thể hoàn toàn tự động: chọn kháng thể thích hợp trong danh sách và thời gian ủ tương ứng

- B7: Sử dụng bộ hiện màu phức hợp kháng nguyên – kháng thể;

- B8: Nhuộm nhân hematoxylin;

- B9: Làm xanh nhân;

- B10: Rửa sạch tiêu bản sau đó loại nước, làm trong và gắn lamen.

#### 4.2. Nhận định kết quả

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

#### 4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

## **KHÔNG CÓ TÍN HIỆU HOẶC TÍN HIỆU YẾU**

<b>Nguyên nhân</b>	<b>Cách khắc phục</b>
Khử paraffin không hết	Tăng thời gian khử paraffin hoặc thay thế dung dịch khử paraffin mới
Nhiệt độ ủ không chính xác	Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa hoặc tăng thời gian
Thời gian ủ với kháng thể 1 quá ngắn	Tăng thời gian ủ với kháng thể 1
Thời gian cố định quá dài	Kiểm tra lại quy trình cố định bệnh phẩm, bệnh phẩm cần được cố định trong khoảng 6-72 giờ

## **TÍN HIỆU KHÔNG ĐỒNG ĐỀU GIỮA CÁC VÙNG TRÊN BỆNH PHẨM**

<b>Nguyên nhân</b>	<b>Cách khắc phục</b>
Tồn tại nhiều vùng khác nhau trên bệnh phẩm	Tăng thời gian cố định
Probe phân bố không đồng đều do có bọt khí	Thực hiện lại phản ứng và đảm bảo không có bọt khí
Kích thước bệnh phẩm quá lớn	Tăng thể tích dung dịch khi bơm

## **NHUỘM NỀN CAO**

<b>Nguyên nhân</b>	<b>Cách khắc phục</b>
Quá trình rửa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra lại pH của dung dịch rửa (7,2-7,5)</li> <li>- Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa</li> </ul>
Thời gian ủ với kháng thể quá lâu	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Giảm thời gian ủ</li> </ul>

## **MẤT HAY TIÊU BIỂN BỆNH PHẨM**

<b>Nguyên nhân</b>	<b>Cách khắc phục</b>
Sấy tiêu bản không đúng	Kiểm tra lại nhiệt độ tủ sấy
Bộc lô quá mức	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra lại nhiệt độ bộc lô</li> <li>- Giảm thời gian bộc lô</li> </ul>

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 67. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH CHO MỐI DẤU ẨN TRONG ĐIỀU TRỊ ĐÍCH

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này mô tả và hướng dẫn các bước thực hiện kỹ thuật nhuộm hoá mô miễn dịch cho một dấu ẩn phục vụ điều trị đích (một số dấu ẩn hiện nay như HER2, ALK, BRAF,...) và cách đánh giá, chẩn đoán cho các dấu ẩn này.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Hóa mô miễn dịch là phương pháp xác định những kháng nguyên đặc hiệu có trong mô hoặc tế bào, dựa trên sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể. Kết hợp phản ứng miễn dịch và hoá chất để làm hiện rõ các kháng nguyên tại bào tương, màng tế bào, nhân của tế bào. Có 2 cách để quan sát được phác hợp này: miễn dịch huỳnh quang (gắn với một chất phát huỳnh quang và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang) và miễn dịch men (gắn với một loại men (peroxidase hoặc Alkaline phosphatase) và gắn với chất màu (chromogen)) có thể quan sát dưới kính hiển vi quang học.

Điều trị đích là một bước tiến mới hiện nay, nâng cao hiệu quả, chất lượng trong điều trị ung thư. Một số đột biến sinh học có thể phát hiện bằng nhuộm hoá mô miễn dịch là điều kiện để lựa chọn phác đồ điều trị. Đây là phương pháp phổ thông và chi phí thấp. Khác với nhuộm hoá mô miễn dịch chẩn đoán, nhuộm các dấu ẩn để có cơ sở lựa chọn phác đồ điều trị đòi hỏi tỉ mỉ, cẩn thận và các hoá chất có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, phân tích kết quả tỉ mỉ và theo hướng dẫn.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Nhân lực

Bác sĩ giải phẫu bệnh:	01
Kỹ thuật y:	02
Hộ lý:	01
Nhân viên văn phòng:	01
Nhân viên vệ sinh:	01

#### 2.2. Vật tư, hoá chất

##### 2.2.1. Hoá chất

- Kháng thể 1;
- Bộ DAB bao gồm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kháng thể 2;
- Bộ kit khuếch đại tín hiệu;
- Dung dịch nhuộm nhân tế bào;
- Hoá chất làm xanh nhân;
- Dung dịch khử parafin;

- Dung dịch dầu phủ tiêu bản;
- Dung dịch rửa tiêu bản;
- Hoá chất xử lí tế bào và bóc lộ kháng nguyên.
- Gel gắn lamelle.
- Hoá chất nhuộm hematoxylin – Eosin.

#### 2.2.2. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường.
- Lam kính chuyên dụng cho kỹ thuật hóa mô miễn dịch.
- Lamelle.
- Bút chì.
- Que tăm bệnh phẩm.
- Khay đá.
- Giá để tiêu bản.
- Khăn sạch.
- Găng tay.
- Nhãn in .
- Nước cát.

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Kính hiển vi quang học 1 đầu và nhiều đầu có gắn camera (nếu có);
- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu);
- Hệ thống nhuộm hóa mô;
- Máy nhuộm tiêu bản Hematoxylin Eosin;
- Máy gắn lamelle tự động;
- Bệ dàn tiêu bản;
- Tủ lạnh;
- Tủ ám;
- Máy in nhãn;
- Máy lọc nước RO 2 lần
- Pipet định mức 1000 microlit
- Pipet định mức 200 microlit
- Pipet định mức 50 microlit
- Các dụng cụ và thuốc tẩy trùng để làm sạch dụng cụ;

- Dụng cụ băng thủy tinh hoặc băng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại);
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Hệ thống lưu trữ tiêu bản, khói nến.
- Máy tính, máy in;
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm,...) và lưu trữ bệnh phẩm.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:**

- Bệnh phẩm là các mẫu nến có vùng cần nhuộm hoá mô để đánh giá.
- Khối nến bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
  - + Bệnh phẩm được cố định ngay sau khi mổ trong formalin trung tính 10% với thời gian tối ưu là 6h-14h, nhằm đảm bảo chất lượng Nucleic acid trong tế bào được giữ nguyên trạng thái, đồng thời không bị tiêu hủy do enzyme nội sinh.
  - + Các quy trình mô bệnh học tạo ra khối nến phải đảm bảo đúng thời gian và kĩ thuật.
  - + Mô u đủ số lượng để nhuộm ( $>100$  tế bào).

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, yêu cầu xét nghiệm.
  - + Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, loại mẫu.
  - + Có ghi rõ tiền sử bệnh lý, phác đồ điều trị bổ trợ, thời gian điều trị, đánh giá đáp ứng trên lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh (nếu có), tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
  - + Thời gian thực hiện xét nghiệm giải phẫu bệnh, điều kiện lưu trữ. Ghi ngày giờ nhận, người bàn giao và người nhận.
  - Đôi chiểu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm,...

#### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

Thời gian thực hiện kỹ thuật: 8 giờ;

Thời gian thực hiện xét nghiệm: 5 ngày.

#### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật**

Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

### **3. AN TOÀN:**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm theo quy định Bộ Y tế

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Chuẩn bị bệnh phẩm**

- Khối nến bệnh phẩm sau khi cố định được cắt 1 lát với độ dày  $3\mu\text{m}$ , sau đó được gắn lên tiêu bản tích điện dương chuyên dụng cho kỹ thuật hoá mô miễn dịch,

trên lam có mã số riêng. Mỗi mẫu phẩm cắt 2 tiêu bản (nhằm đảm bảo tiết kiệm tối đa bệnh phẩm và đảm bảo tính liên tục của mô trên 2 tiêu bản). Hai tiêu bản này bao gồm:

- + 1 tiêu bản nhuộm hoá mô miễn dịch chính.
- + 1 tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin.
- Mẫu phẩm chuẩn bị làm chứng âm và chứng dương cắt 2 tiêu bản:
  - + 1 tiêu bản chứng âm.
  - + 1 tiêu bản chứng dương.
- Tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin sẽ được nhuộm HE theo quy trình nhuộm. Các tiêu bản còn lại được bảo quản trong tủ lạnh trong các hộp đựng tiêu bản có đánh số.
  - Tiêu bản được các Bác sĩ Giải phẫu bệnh đánh giá lại bằng kính hiển vi quang học: Đánh giá chất lượng tiêu bản, chất lượng mô, đánh số số lượng và chất lượng u nhằm đảm bảo cho nhuộm hoá mô miễn dịch.
    - + Nếu mẫu mô đạt, tiến hành các bước tiếp theo.
    - + Nếu mẫu mô không đạt, chọn mẫu mô khác của bệnh nhân và thực hiện lại các bước trên.

#### **4.2. Chuẩn bị hóa chất**

- Dung dịch loại paraffin: theo tỉ lệ 1 dung dịch: 9 nước cát 2 lần (hoặc nước đã khử ion)
  - Dung dịch dầu bao phủ lên tiêu bản mô ngăn hóa chất bốc hơi, tạo điều kiện thuận lợi cho các phản ứng xảy ra: dùng trực tiếp.
  - Dung dịch rửa tiêu bản Buffer: Pha dung dịch đậm đặc với nước cát 2 lần theo tỉ lệ 1 dung dịch rửa đậm đặc: 9 nước cát 2 lần.
    - Dung dịch bọc lô kháng nguyên: sử dụng trực tiếp.
    - Các kháng thể 1 cần để nhuộm: ALK, PDL1, BRAF,... (nếu hóa chất đậm đặc cần pha loãng theo tỉ lệ quy định của nhà sản xuất)
      - Bộ kít phát hiện DAB
      - Dung dịch nhuộm nhân tế bào.
      - Hóa chất làm xanh nhân.
      - Chứng âm và chứng dương của bộ kit.
        - + Chứng âm: Kháng thể đơn dòng được sản xuất từ thỏ, không bắt đặc hiệu với các kháng nguyên trên mẫu mô. Được sử dụng thay cho kháng thể sơ cấp. Giúp kiểm soát chất lượng kết quả nhuộm, đánh giá mức độ nhuộm nền của xét nghiệm.
        - Bộ kít khuếch đại tín hiệu: Tăng cường độ tạo màu khi quan sát dưới kính hiển vi quang học.
        - Ethanol hay thuốc thử alcol.

- Nước khử ion hay nước cất.
- Xylene.
- Gel gắn lamelle
- Các nhãn mã vạch (thích hợp cho chứng thuốc thử âm và kháng thể được xét nghiệm)

#### **4.2. Các bước thực hiện**

- Bước 1: Tẩy paraffin trên tiêu bản nhuộm bằng dung dịch tẩy chuyên dụng.
- Bước 2: Bộc lộ kháng nguyên bằng dung dịch bộc lộ, thời gian ủ: 92 phút.
- Bước 3: Khử protein nội sinh bằng Peroxydase.
- Bước 4: Kháng thể 1: theo thời gian quy định của từng phương pháp nhuộm.
- Bước 5: Dùng chất tăng sự kết nối kháng thể 1 và kháng thể 2: 12 phút
- Bước 6; Kháng thể 2: 12 phút
- Bước 7: Chất khuếch đại tín hiệu: 8 phút
- Bước 8: Dung dịch nhuộm nhân tế bào: 12 phút
- Bước 9: Dung dịch làm xanh nhân: 4 phút
- Giữa các bước phải rửa tiêu bản bằng dung dịch rửa. Trong quá trình ủ hóa chất đều phủ dung dịch dầu khoáng lên tiêu bản để chống bay hơi.
- Bước 10: Khử nước, gắn lá kính.
- Bước 11: Sắp xếp tiêu bản đã nhuộm phù hợp tên tuổi, mã số của giấy chỉ định, gửi bác sĩ Giải phẫu bệnh đọc và phân tích kết quả.

#### **4.2. Nhận định kết quả và báo cáo**

##### **4.2.1. Đọc kết quả**

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.
- Đánh giá tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin nhằm đánh giá vùng u và vùng lành.
- Đánh giá tiêu bản chứng âm, dương, chứng nội (in-house control):
  - + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm chính.
  - + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.
- Đánh giá tiêu bản mẫu phẩm nhuộm: Các tiêu chí đánh giá gồm:
  - + Tế bào dương tính hay âm tính, vị trí dương tính (bào tương, màng tế bào hay nhân).
  - + Tỉ lệ tế bào dương tính (tế bào u hay tế bào ở môi trường. Tuỳ theo từng dấu ấn hoặc từng loại mô mà đánh giá theo các chỉ số khác nhau.

- Đưa ra kết luận dấu ấn miễn dịch là dương tính hay âm tính, mất bộc lộ hay bộc lộ tùy từng tiêu chí đánh giá của mỗi loại dấu ấn hoặc mỗi loại cơ quan của 1 dấu ấn.

#### 4.2.2. Báo cáo, trả kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

Lưu khói nến và tiêu bản theo quy định của cơ sở.

### 5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ

#### KHÔNG CÓ TÍN HIỆU HOẶC TÍN HIỆU YẾU

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Khử paraffin không hết	Tăng thời gian khử paraffin hoặc thay thế dung dịch khử paraffin mới
Nhiệt độ ủ không chính xác	Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa hoặc tăng thời gian
Thời gian ủ với kháng thể 1 quá ngắn	Tăng thời gian ủ với kháng thể 1
Thời gian cố định quá dài	Kiểm tra lại quy trình cố định bệnh phẩm, bệnh phẩm cần được cố định trong khoảng 6-72 giờ

#### TÍN HIỆU KHÔNG ĐỒNG ĐỀU GIỮA CÁC VÙNG TRÊN BỆNH PHẨM

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Tồn tại nhiều vùng khác nhau trên bệnh phẩm	Tăng thời gian cố định
Probe phân bố không đồng đều do có bọt khí	Thực hiện lại phản ứng và đảm bảo không có bọt khí
Kích thước bệnh phẩm quá lớn	Tăng thể tích dung dịch khi bơm

#### NHUỘM NỀN CAO

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Quá trình rửa	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kiểm tra lại pH của dung dịch rửa (7,2-7,5)</li> <li>Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa</li> </ul>
Thời gian ủ với kháng thể quá lâu	<ul style="list-style-type: none"> <li>Giảm thời gian ủ</li> </ul>

#### MẤT HAY TIÊU BIỂN BỆNH PHẨM

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Sấy tiêu bản không đúng	Kiểm tra lại nhiệt độ tủ sấy
Bộc lộ quá mức	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Kiểm tra lại nhiệt độ bộc lộ</li> <li>· Giảm thời gian bộc lộ</li> </ul>

### Chú ý:

- Nếu bệnh phẩm không được cố định trong dung dịch formol đậm trung tính 10% thì khả năng bộc lộ kháng nguyên rất thấp.
- Thời gian cố định quá lâu có thể làm mất tính kháng nguyên của mô, do đó, thời gian cố định tối đa là 6 giờ (bệnh phẩm sinh thiết nhỏ), 48 giờ (bệnh phẩm lớn).
- Cần pha kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tìm một nồng độ thích hợp nhất để tránh âm tính giả hoặc dương tính giả.
- Luôn kiểm tra hạn sử dụng của các kháng thể, nhất là với các kháng thể đã sử dụng còn dư từ lần nhuộm trước.
- Tuân thủ quy trình kiểm tra chất lượng.

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.
3. Freida Carson: Histotechnology, 3rd edition, 2017.

## **68. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH DẤU ẨN ALK**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Quy trình này mô tả và hướng dẫn các bước thực hiện kỹ thuật nhuộm hoá mô miễn dịch dấu ẩn ALK và cách đánh giá, chẩn đoán cho các dấu ẩn này.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Hóa mô miễn dịch là phương pháp xác định những kháng nguyên đặc hiệu có trong mô hoặc tế bào, dựa trên sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể. Kết hợp phản ứng miễn dịch và hoá chất để làm hiện rõ các kháng nguyên tại bào tương, màng tế bào, nhân của tế bào. Có 2 cách để quan sát được phức hợp này: miễn dịch huỳnh quang (gắn với một chất phát huỳnh quang và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang) và miễn dịch men (gắn với một loại men (peroxidase hoặc Alkaline phosphatase) và gắn với chất màu (chromogen)) có thể quan sát dưới kính hiển vi quang học.

ALK là viết tắt của anaplastic lymphoma kinase. ALK là một loại gen tồn tại trong tất cả chúng ta. Gen ALK tạo ra một protein tham gia vào sự phát triển của tế bào. Những thay đổi trong gen ALK tự nhiên có thể gây ung thư. Đột biến ALK gặp trong khoảng 5% bệnh nhân ung thư phổi không tế bào nhỏ và thuốc úc chế ALK mang lại giá trị đáng kể với các bệnh nhân ALK dương tính.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Nhân lực**

Bác sĩ giải phẫu bệnh:	01
Kỹ thuật y:	02
Hộ lý:	01
Nhân viên văn phòng:	01
Nhân viên vệ sinh:	01

#### **2.2. Vật tư, hoá chất**

##### **2.2.1. Hoá chất**

- Kháng thể đơn dòng ALK (D5F3);
- Bộ DAB bao gồm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kháng thể 2;
- Bộ kit khuếch đại tín hiệu;
- Dung dịch nhuộm nhân tế bào;
- Hoá chất làm xanh nhân;
- Dung dịch khử parafin;
- Dung dịch dầu phủ tiêu bản;
- Dung dịch rửa tiêu bản;
- Hoá chất xử lí tế bào và bọc lộ kháng nguyên.

- Gel gắn lamelle.
- Hoá chất nhuộm hematoxylin – Eosin.

#### 2.2.2. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường.
- Lam kính chuyên dụng cho kỹ thuật hóa mô miễn dịch.
- Lamelle.
- Bút chì.
- Que tăm bệnh phẩm.
- Khay đá.
- Giá đế tiêu bản.
- Khăn sạch.
- Găng tay.
- Nhãn in .
- Nước cát.

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Kính hiển vi quang học 1 đầu và nhiều đầu có gắn camera (nếu có);
- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu);
- Hệ thống nhuộm hóa mô;
- Máy nhuộm tiêu bản Hematoxylin Eosin;
- Máy gắn lamelle tự động;
- Bệ dàn tiêu bản;
- Tủ lạnh;
- Tủ âm;
- Máy in nhãn;
- Máy lọc nước RO 2 lần
- Pipet định mức 1000 microlit
- Pipet định mức 200 microlit
- Pipet định mức 50 microlit
- Các dụng cụ và thuốc tẩy trùng để làm sạch dụng cụ;
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại);
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Hệ thống lưu trữ tiêu bản, khói nến.

- Máy tính, máy in;
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm,...) và lưu trữ bệnh phẩm.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:**

- Bệnh phẩm là các mẫu nến có vùng cần nhuộm hoá mô để đánh giá.
- Khối nến bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
  - + Bệnh phẩm được cố định ngay sau khi mổ trong formalin trung tính 10% với thời gian tối ưu là 6h-14h, nhằm đảm bảo chất lượng Nucleic acid trong tế bào được giữ nguyên trạng thái, đồng thời không bị tiêu hủy do enzyme nội sinh.
  - + Các quy trình mô bệnh học tạo ra khối nến phải đảm bảo đúng thời gian và kỹ thuật.
  - + Mô u đủ số lượng để nhuộm ( $>100$  tế bào).

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, yêu cầu xét nghiệm.
  - + Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, loại mẫu.
  - + Có ghi rõ tiền sử bệnh lý, phác đồ điều trị bổ trợ, thời gian điều trị, đánh giá đáp ứng trên lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh (nếu có), tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
  - + Thời gian thực hiện xét nghiệm giải phẫu bệnh, điều kiện lưu trữ. Ghi ngày giờ nhận, người bàn giao và người nhận.
  - Đôi chiểu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm,...

#### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

- Thời gian thực hiện kỹ thuật: 8 giờ;  
Thời gian thực hiện xét nghiệm: 5 ngày.

#### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật**

Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

### **3. AN TOÀN:**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm theo quy định Bộ Y tế

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Chuẩn bị bệnh phẩm**

- Khối nến bệnh phẩm sau khi cố định được cắt 1 lát với độ dày  $3\mu\text{m}$ , sau đó được gắn lên tiêu bản tích điện dương chuyên dụng cho kỹ thuật hoá mô miễn dịch, trên lam có mã số riêng. Mỗi mẫu phẩm cắt 2 tiêu bản (nhằm đảm bảo tiết kiệm tối đa bệnh phẩm và đảm bảo tính liên tục của mô trên 2 tiêu bản). Hai tiêu bản này bao gồm:

- + 1 tiêu bản nhuộm hoá mô miễn dịch chính.

- + 1 tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin.
  - Mẫu phẩm chuẩn bị làm chứng âm và chứng dương cắt 2 tiêu bản:
    - + 1 tiêu bản chứng âm.
    - + 1 tiêu bản chứng dương.
    - Tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin sẽ được nhuộm HE theo quy trình nhuộm. Các tiêu bản còn lại được bảo quản trong tủ lạnh trong các hộp đựng tiêu bản có đánh số.
    - Tiêu bản được các Bác sĩ Giải phẫu bệnh đánh giá lại bằng kính hiển vi quang học: Đánh giá chất lượng tiêu bản, chất lượng mô, đánh số số lượng và chất lượng u nhằm đảm bảo cho nhuộm hoá mô miễn dịch.
      - + Nếu mẫu mô đạt, tiến hành các bước tiếp theo.
      - + Nếu mẫu mô không đạt, chọn mẫu mô khác của bệnh nhân và thực hiện lại các bước trên.
- 4.2. Chuẩn bị hóa chất**
- Dung dịch loại paraffin: theo tỉ lệ 1 dung dịch:9 nước cát 2 lần (hoặc nước đã khử ion)
    - Dung dịch dầu bao phủ lên tiêu bản mô ngăn hóa chất bốc hơi, tạo điều kiện thuận lợi cho các phản ứng xảy ra: dùng trực tiếp.
    - Dung dịch rửa tiêu bản Buffer: Pha dung dịch đậm đặc với nước cát 2 lần theo tỉ lệ 1 dung dịch rửa đậm đặc: 9 nước cát 2 lần.
      - Dung dịch bọc lô kháng nguyên: sử dụng trực tiếp.
      - Kháng thể ALK D5F3;
      - Bộ kít phát hiện DAB
      - Dung dịch nhuộm nhân tế bào.
      - Hóa chất làm xanh nhân.
      - Chứng âm và chứng dương của bộ kit.
      - + Chứng âm: Kháng thể đơn dòng được sản xuất từ thỏ, không bắt đặc hiệu với các kháng nguyên trên mẫu mô. Được sử dụng thay cho kháng thể sơ cấp. Giúp kiểm soát chất lượng kết quả nhuộm, đánh giá mức độ nhuộm nền của xét nghiệm.
      - Bộ kít khuếch đại tín hiệu: Tăng cường độ tạo màu khi quan sát dưới kính hiển vi quang học.
        - Ethanol hay thuốc thử alcol.
        - Nước khử ion hay nước cát.
        - Xylene.
        - Gel gắn lamelle
        - Các nhãn mã vạch (thích hợp cho chứng thuốc thử âm và kháng thể được xét nghiệm)

## 4.2. Các bước thực hiện

Bước 1: Tẩy paraffin trên tiêu bản nhuộm bằng dung dịch tẩy chuyên dụng.

Bước 2: Bóc lộ kháng nguyên bằng dung dịch bóc lộ, thời gian ủ: 92 phút.

Bước 3: Khử protein nội sinh bằng Peroxydase.

Bước 4: Kháng thể 1: theo thời gian quy định của từng phương pháp nhuộm.

Bước 5: Dùng chất tăng sự kết nối kháng thể 1 và kháng thể 2: 12 phút

Bước 6: Kháng thể 2: 12 phút

Bước 7: Chất khuếch đại tín hiệu: 8 phút

Bước 8: Dung dịch nhuộm nhân tế bào: 12 phút

Bước 9: Dung dịch làm xanh nhân: 4 phút

Giữa các bước phải rửa tiêu bản bằng dung dịch rửa. Trong quá trình ủ hóa chất đều phủ dung dịch dầu khoáng lên tiêu bản để chống bay hơi.

Bước 10: Khử nước, gắn lá kính.

Bước 11: Sắp xếp tiêu bản đã nhuộm phù hợp tên tuổi, mã số của giấy chỉ định, gửi bác sĩ Giải phẫu bệnh đọc và phân tích kết quả.

## 4.2. Nhận định kết quả và báo cáo

### 4.2.1. Đọc kết quả

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.

- Đánh giá tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin nhằm đánh giá vùng u và vùng lành.

  - Đánh giá tiêu bản chứng âm, dương, chứng nội (in-house control):

    - + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm chính.

  - + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.

    - Đánh giá tiêu bản mẫu phẩm nhuộm: Các tiêu chí đánh giá gồm:

      - + Tế bào dương tính hay âm tính, vị trí dương tính (bào tương, màng tế bào).

        - + Tỉ lệ tế bào dương tính: tính phần trăm.

        - Kết luận ALK dương tính với khi tế bào u bộc lộ màng và/hoặc bào tương với bất kể tỉ lệ nào.

### 4.2.2. Báo cáo, trả kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

Lưu khói nến và tiêu bản theo quy định của cơ sở.

## 5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ

## **KHÔNG CÓ TÍN HIỆU HOẶC TÍN HIỆU YẾU**

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Khử paraffin không hết	Tăng thời gian khử paraffin hoặc thay thế dung dịch khử paraffin mới
Nhiệt độ ủ không chính xác	Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa hoặc tăng thời gian
Thời gian ủ với kháng thể 1 quá ngắn	Tăng thời gian ủ với kháng thể 1
Thời gian cố định quá dài	Kiểm tra lại quy trình cố định bệnh phẩm, bệnh phẩm cần được cố định trong khoảng 6-72 giờ

## **TÍN HIỆU KHÔNG ĐỒNG ĐỀU GIỮA CÁC VÙNG TRÊN BỆNH PHẨM**

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Tồn tại nhiều vùng khác nhau trên bệnh phẩm	Tăng thời gian cố định
Probe phân bố không đồng đều do có bọt khí	Thực hiện lại phản ứng và đảm bảo không có bọt khí
Kích thước bệnh phẩm quá lớn	Tăng thể tích dung dịch khi bơm

## **NHUỘM NỀN CAO**

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Quá trình rửa	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Kiểm tra lại pH của dung dịch rửa (7,2-7,5)</li> <li>· Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa</li> </ul>
Thời gian ủ với kháng thể quá lâu	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Giảm thời gian ủ</li> </ul>

## **MẤT HAY TIÊU BIỂN BỆNH PHẨM**

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Sấy tiêu bản không đúng	Kiểm tra lại nhiệt độ tủ sấy
Bộc lô quá mức	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Kiểm tra lại nhiệt độ bộc lô</li> <li>· Giảm thời gian bộc lô</li> </ul>

### **Chú ý:**

- Nếu bệnh phẩm không được cố định trong dung dịch formol đậm trung tính 10% thì khả năng bộc lô kháng nguyên rất thấp.

- Thời gian cố định quá lâu có thể làm mất tính kháng nguyên của mô, do đó, thời gian cố định tối đa là 6 giờ (bệnh phẩm sinh thiết nhỏ), 48 giờ (bệnh phẩm lớn).
- Cần pha kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tìm một nồng độ thích hợp nhất để tránh âm tính giả hoặc dương tính giả.
- Luôn kiểm tra hạn sử dụng của các kháng thể, nhất là với các kháng thể đã sử dụng còn dư từ lần nhuộm trước.
- Tuân thủ quy trình kiểm tra chất lượng.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.
3. Freida Carson: Histotechnology, 3rd edition, 2017.

## **69. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH CHO MỐI DẤU ẨN TRONG ĐIỀU TRỊ MIỄN DỊCH**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Quy trình này mô tả và hướng dẫn các bước thực hiện kỹ thuật nhuộm hoá mô miễn dịch cho một dấu ẩn phục vụ điều trị miễn dịch (một số dấu ẩn hiện nay như PD-L1, CTLA-4, LAG-3,...) và cách đánh giá, chẩn đoán cho các dấu ẩn này.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Hóa mô miễn dịch là phương pháp xác định những kháng nguyên đặc hiệu có trong mô hoặc tế bào, dựa trên sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể. Kết hợp phản ứng miễn dịch và hoá chất để làm hiện rõ các kháng nguyên tại bào tương, màng tế bào, nhân của tế bào. Có 2 cách để quan sát được phác hợp này: miễn dịch huỳnh quang (gắn với một chất phát huỳnh quang và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang) và miễn dịch men (gắn với một loại men (peroxidase hoặc Alkaline phosphatase) và gắn với chất màu (chromogen)) có thể quan sát dưới kính hiển vi quang học.

Điều trị miễn dịch là một bước tiến mới hiện nay, nâng cao hiệu quả, chất lượng trong điều trị ung thư. Các dấu ẩn miễn dịch (như PD-L1, CTLA-4, LAG-3...) được phát hiện bằng nhuộm hoá mô miễn dịch là điều kiện để lựa chọn phác đồ điều trị. Đây là phương pháp phổ thông và chi phí thấp. Khác với nhuộm hoá mô miễn dịch chẩn đoán, nhuộm các dấu ẩn để có cơ sở lựa chọn phác đồ điều trị đòi hỏi tỉ mỉ, cẩn thận và các hoá chất có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, phân tích kết quả tỉ mỉ và theo hướng dẫn.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Nhân lực**

Bác sĩ giải phẫu bệnh:	01
Kỹ thuật y:	02
Hộ lý:	01
Nhân viên văn phòng:	01
Nhân viên vệ sinh:	01

#### **2.2. Vật tư, hoá chất**

##### **2.2.1. Hoá chất**

- Kháng thể 1;
- Bộ DAB bao gồm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kháng thể 2;
- Bộ kit khuếch đại tín hiệu;
- Dung dịch nhuộm nhân tế bào;
- Hoá chất làm xanh nhân;
- Dung dịch khử parafin;

- Dung dịch dầu phủ tiêu bản;
- Dung dịch rửa tiêu bản;
- Hoá chất xử lí tế bào và bóc lộ kháng nguyên.
- Gel gắn lamelle.
- Hoá chất nhuộm hematoxylin – Eosin.

#### 2.2.2. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường.
- Lam kính chuyên dụng cho kỹ thuật hóa mô miễn dịch.
- Lamelle.
- Bút chì.
- Que tăm bệnh phẩm.
- Khay đá.
- Giá để tiêu bản.
- Khăn sạch.
- Găng tay.
- Nhãn in .
- Nước cát.

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Kính hiển vi quang học 1 đầu và nhiều đầu có gắn camera (nếu có);
- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu);
- Hệ thống nhuộm hóa mô;
- Máy nhuộm tiêu bản Hematoxylin Eosin;
- Máy gắn lamelle tự động;
- Bệ dàn tiêu bản;
- Tủ lạnh;
- Tủ ám;
- Máy in nhãn;
- Máy lọc nước RO 2 lần
- Pipet định mức 1000 microlit
- Pipet định mức 200 microlit
- Pipet định mức 50 microlit
- Các dụng cụ và thuốc tẩy trùng để làm sạch dụng cụ;

- Dụng cụ băng thủy tinh hoặc băng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại);
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Hệ thống lưu trữ tiêu bản, khói nến.
- Máy tính, máy in;
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm,...) và lưu trữ bệnh phẩm.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:**

- Bệnh phẩm là các mẫu nến có vùng cần nhuộm hoá mô để đánh giá.
- Khối nến bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
  - + Bệnh phẩm được cố định ngay sau khi mổ trong formalin trung tính 10% với thời gian tối ưu là 6h-14h, nhằm đảm bảo chất lượng Nucleic acid trong tế bào được giữ nguyên trạng thái, đồng thời không bị tiêu hủy do enzyme nội sinh.
  - + Các quy trình mô bệnh học tạo ra khối nến phải đảm bảo đúng thời gian và kĩ thuật.
  - + Mô u đủ số lượng để nhuộm ( $>100$  tế bào).

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, yêu cầu xét nghiệm.
  - + Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, loại mẫu.
  - + Có ghi rõ tiền sử bệnh lý, phác đồ điều trị bổ trợ, thời gian điều trị, đánh giá đáp ứng trên lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh (nếu có), tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
  - + Thời gian thực hiện xét nghiệm giải phẫu bệnh, điều kiện lưu trữ. Ghi ngày giờ nhận, người bàn giao và người nhận.
  - Đôi chiểu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm,...

#### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

Thời gian thực hiện kỹ thuật: 8 giờ;

Thời gian thực hiện xét nghiệm: 5 ngày.

#### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật**

Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

### **3. AN TOÀN:**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm theo quy định Bộ Y tế

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Chuẩn bị bệnh phẩm**

- Khối nến bệnh phẩm sau khi cố định được cắt 1 lát với độ dày  $3\mu\text{m}$ , sau đó được gắn lên tiêu bản tích điện dương chuyên dụng cho kỹ thuật hoá mô miễn dịch,

trên lam có mã số riêng. Mỗi mẫu phẩm cắt 2 tiêu bản (nhằm đảm bảo tiết kiệm tối đa bệnh phẩm và đảm bảo tính liên tục của mô trên 2 tiêu bản). Hai tiêu bản này bao gồm:

- + 1 tiêu bản nhuộm hoá mô miễn dịch chính.
- + 1 tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin.
- Mẫu phẩm chuẩn bị làm chứng âm và chứng dương cắt 2 tiêu bản:
  - + 1 tiêu bản chứng âm.
  - + 1 tiêu bản chứng dương.
- Tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin sẽ được nhuộm HE theo quy trình nhuộm. Các tiêu bản còn lại được bảo quản trong tủ lạnh trong các hộp đựng tiêu bản có đánh số.
  - Tiêu bản được các Bác sĩ Giải phẫu bệnh đánh giá lại bằng kính hiển vi quang học: Đánh giá chất lượng tiêu bản, chất lượng mô, đánh số số lượng và chất lượng u nhằm đảm bảo cho nhuộm hoá mô miễn dịch.
    - + Nếu mẫu mô đạt, tiến hành các bước tiếp theo.
    - + Nếu mẫu mô không đạt, chọn mẫu mô khác của bệnh nhân và thực hiện lại các bước trên.

#### **4.2. Chuẩn bị hóa chất**

- Dung dịch loại paraffin: theo tỉ lệ 1 dung dịch: 9 nước cát 2 lần (hoặc nước đã khử ion)
  - Dung dịch dầu bao phủ lên tiêu bản mô ngăn hóa chất bốc hơi, tạo điều kiện thuận lợi cho các phản ứng xảy ra: dùng trực tiếp.
  - Dung dịch rửa tiêu bản Buffer: Pha dung dịch đậm đặc với nước cát 2 lần theo tỉ lệ 1 dung dịch rửa đậm đặc: 9 nước cát 2 lần.
    - Dung dịch bọc lô kháng nguyên: sử dụng trực tiếp.
    - Các kháng thể 1 cần để nhuộm: ALK, PDL1, BRAF,... (nếu hóa chất đậm đặc cần pha loãng theo tỉ lệ quy định của nhà sản xuất)
      - Bộ kít phát hiện DAB
      - Dung dịch nhuộm nhân tế bào.
      - Hóa chất làm xanh nhân.
      - Chứng âm và chứng dương của bộ kit.
        - + Chứng âm: Kháng thể đơn dòng được sản xuất từ thỏ, không bắt đặc hiệu với các kháng nguyên trên mẫu mô. Được sử dụng thay cho kháng thể sơ cấp. Giúp kiểm soát chất lượng kết quả nhuộm, đánh giá mức độ nhuộm nền của xét nghiệm.
        - Bộ kít khuếch đại tín hiệu: Tăng cường độ tạo màu khi quan sát dưới kính hiển vi quang học.
        - Ethanol hay thuốc thử alcol.

- Nước khử ion hay nước cất.
- Xylene.
- Gel gắn lamelle
- Các nhãn mă vạch (thích hợp cho chứng thuốc thử âm và kháng thể được xét nghiệm)

#### **4.2. Các bước thực hiện**

- Bước 1: Tẩy paraffin trên tiêu bản nhuộm bằng dung dịch tẩy chuyên dụng.
- Bước 2: Bóc lộ kháng nguyên bằng dung dịch bóc lộ, thời gian ủ: 92 phút.
- Bước 3: Khử protein nội sinh bằng Peroxydase.
- Bước 4: Kháng thể 1: theo thời gian quy định của từng phương pháp nhuộm.
- Bước 5: Dùng chất tăng sự kết nối kháng thể 1 và kháng thể 2: 12 phút
- Bước 6; Kháng thể 2: 12 phút
- Bước 7: Chất khuếch đại tín hiệu: 8 phút
- Bước 8: Dung dịch nhuộm nhân tế bào: 12 phút
- Bước 9: Dung dịch làm xanh nhân: 4 phút
- Giữa các bước phải rửa tiêu bản bằng dung dịch rửa. Trong quá trình ủ hóa chất đều phủ dung dịch dầu khoáng lên tiêu bản để chống bay hơi.
- Bước 10: Khử nước, gắn lá kính.
- Bước 11: Sắp xếp tiêu bản đã nhuộm phù hợp tên tuổi, mã số của giấy chỉ định, gửi bác sĩ Giải phẫu bệnh đọc và phân tích kết quả.

#### **4.2. Nhận định kết quả và báo cáo**

##### **4.2.1. Đọc kết quả**

- Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.
- Đánh giá tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin nhằm đánh giá vùng u và vùng lành.
- Đánh giá tiêu bản chứng âm, dương, chứng nội (in-house control):
  - + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm chính.
  - + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.
- Đánh giá tiêu bản mẫu phẩm nhuộm: Các tiêu chí đánh giá gồm:
  - + Tế bào dương tính hay âm tính, vị trí dương tính (bào tương, màng tế bào hay nhân).
  - + Tỉ lệ tế bào dương tính (tế bào u hay tế bào ở môi trường. Tuỳ theo từng dấu ấn hoặc từng loại mô mà đánh giá theo các chỉ số khác nhau.

- Đưa ra kết luận dấu ấn miễn dịch là dương tính hay âm tính, mất bộc lộ hay bộc lộ tùy từng tiêu chí đánh giá của mỗi loại dấu ấn hoặc mỗi loại cơ quan của 1 dấu ấn.

#### 4.2.2. Báo cáo, trả kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

Lưu khối nến và tiêu bản theo quy định của cơ sở.

### 5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ

#### KHÔNG CÓ TÍN HIỆU HOẶC TÍN HIỆU YẾU

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Khử paraffin không hết	Tăng thời gian khử paraffin hoặc thay thế dung dịch khử paraffin mới
Nhiệt độ ủ không chính xác	Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa hoặc tăng thời gian
Thời gian ủ với kháng thể 1 quá ngắn	Tăng thời gian ủ với kháng thể 1
Thời gian cố định quá dài	Kiểm tra lại quy trình cố định bệnh phẩm, bệnh phẩm cần được cố định trong khoảng 6-72 giờ

#### TÍN HIỆU KHÔNG ĐỒNG ĐỀU GIỮA CÁC VÙNG TRÊN BỆNH PHẨM

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Tồn tại nhiều vùng khác nhau trên bệnh phẩm	Tăng thời gian cố định
Probe phân bố không đồng đều do có bọt khí	Thực hiện lại phản ứng và đảm bảo không có bọt khí
Kích thước bệnh phẩm quá lớn	Tăng thể tích dung dịch khi bơm

#### NHUỘM NỀN CAO

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Quá trình rửa	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kiểm tra lại pH của dung dịch rửa (7,2-7,5)</li> <li>Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa</li> </ul>
Thời gian ủ với kháng thể quá lâu	<ul style="list-style-type: none"> <li>Giảm thời gian ủ</li> </ul>

#### MẤT HAY TIÊU BIỂN BỆNH PHẨM

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Sấy tiêu bản không đúng	Kiểm tra lại nhiệt độ tủ sấy
Bộc lộ quá mức	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Kiểm tra lại nhiệt độ bộc lộ</li> <li>· Giảm thời gian bộc lộ</li> </ul>

### Chú ý:

- Nếu bệnh phẩm không được cố định trong dung dịch formol đậm trung tính 10% thì khả năng bộc lộ kháng nguyên rất thấp.
- Thời gian cố định quá lâu có thể làm mất tính kháng nguyên của mô, do đó, thời gian cố định tối đa là 6 giờ (bệnh phẩm sinh thiết nhỏ), 48 giờ (bệnh phẩm lớn).
- Cần pha kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tìm một nồng độ thích hợp nhất để tránh âm tính giả hoặc dương tính giả.
- Luôn kiểm tra hạn sử dụng của các kháng thể, nhất là với các kháng thể đã sử dụng còn dư từ lần nhuộm trước.
- Tuân thủ quy trình kiểm tra chất lượng.

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.
3. Freida Carson: Histotechnology, 3rd edition, 2017.

## 70. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH DẤU ÁN PD-L1 TRONG ĐIỀU TRỊ MIỄN DỊCH

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này mô tả và hướng dẫn các bước thực hiện kỹ thuật nhuộm hoá mô miễn dịch cho dấu án PD-L1 phục vụ điều trị miễn dịch và cách đánh giá, chẩn đoán cho dấu án này.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Hóa mô miễn dịch là phương pháp xác định những kháng nguyên đặc hiệu có trong mô hoặc tế bào, dựa trên sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể. Kết hợp phản ứng miễn dịch và hoá chất để làm hiện rõ các kháng nguyên tại bào tương, màng tế bào, nhân của tế bào. Có 2 cách để quan sát được phác hợp này: miễn dịch huỳnh quang (gắn với một chất phát huỳnh quang và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang) và miễn dịch men (gắn với một loại men (peroxidase hoặc Alkaline phosphatase) và gắn với chất màu (chromogen)) có thể quan sát dưới kính hiển vi quang học.

- PD-L1 là một protein xuyên màng, có mặt tại màng tế bào ung thư; trong khi đó thụ thể PD-1 có mặt trên bề mặt các tế bào miễn dịch như: tế bào T, tế bào B, tế bào giết tự nhiên (Natural Killer), đại thực bào. Khi PD-L1 gắn với thụ thể PD-1 gây ra hiện tượng bất hoạt động của tế bào T và hoạt động miễn dịch của tế bào T bị ức chế. Vì thế khi dùng kháng thể (antibody) ức chế PD-1 hoặc PD-L1 sẽ gây ra hiện tượng ức chế liên kết trực PD-1/PD-L1 (checkpoint inhibitors), từ đó hệ miễn dịch của tế bào T được kích hoạt và tấn công tế bào ung thư. Khi xét nghiệm thấy PD-L1 tăng cao ở những tế bào ung thư, thì có chỉ định bất hoạt PD-1 hoặc PD-L1 để kích hoạt hệ thống miễn dịch tế bào T, tế bào miễn dịch T sẽ tìm và tiêu diệt tế bào ung thư. Hiện nay có nhiều thuốc được dùng để bất hoạt PD-1 nằm trong liệu pháp miễn dịch. PD-L1 có thể phát hiện bằng nhuộm hoá mô miễn dịch.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Nhân lực

Bác sĩ Giải phẫu bệnh:	01
Kỹ thuật viên Giải phẫu bệnh:	02
Hộ lý:	01
Nhân viên văn phòng:	01
Nhân viên vệ sinh:	01

#### 2.2. Vật tư, hoá chất

##### 2.2.1. Hoá chất

- Kháng thể đơn dòng PD-L1;
- Bộ DAB bao gồm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kháng thể 2;
- Bộ kit khuếch đại tín hiệu;

- Dung dịch nhuộm nhân tế bào;
- Hoá chất làm xanh nhân;
- Dung dịch khử parafin;
- Dung dịch dầu phủ tiêu bản;
- Dung dịch rửa tiêu bản;
- Hoá chất xử lí tế bào và bọc lộ kháng nguyên.
- Gel gắn lamelle.
- Hoá chất nhuộm hematoxylin – Eosin.

#### 2.2.2. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường.
- Lam kính chuyên dụng cho kỹ thuật hóa mô miễn dịch.
- Lamelle.
- Bút chì.
- Que tăm bệnh phẩm.
- Khay đá.
- Giá để tiêu bản.
- Khăn sạch.
- Găng tay.
- Nhẫn in .
- Nước cát.

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Kính hiển vi quang học 1 đầu và nhiều đầu có gắn camera (nếu có);
- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu);
- Hệ thống nhuộm hóa mô;
- Máy nhuộm tiêu bản Hematoxylin Eosin;
- Máy gắn lamelle tự động;
- Bệ dàn tiêu bản;
- Tủ lạnh;
- Tủ ám;
- Máy in nhẫn;
- Máy lọc nước RO 2 lần
- Pipet định mức 1000 microlit

- Pipet định mức 200 microlit
- Pipet định mức 50 microlit
- Các dụng cụ và thuốc tẩy trùng để làm sạch dụng cụ;
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại);
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Hệ thống lưu trữ tiêu bản, khói nến.
- Máy tính, máy in;
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm,...) và lưu trữ bệnh phẩm.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:**

- Bệnh phẩm là các mẫu nến có vùng cần nhuộm hoá mô để đánh giá.
- Khối nến bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
  - + Bệnh phẩm được cố định ngay sau khi mổ trong formalin trung tính 10% với thời gian tối ưu là 6h-14h, nhằm đảm bảo chất lượng Nucleic acid trong tế bào được giữ nguyên trạng thái, đồng thời không bị tiêu hủy do enzyme nội sinh.
  - + Các quy trình mô bệnh học tạo ra khối nến phải đảm bảo đúng thời gian và kỹ thuật.
  - + Mô u đủ số lượng để nhuộm (>100 tế bào).

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, yêu cầu xét nghiệm.
  - + Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, loại mẫu.
  - + Có ghi rõ tiền sử bệnh lý, phác đồ điều trị bổ trợ, thời gian điều trị, đánh giá đáp ứng trên lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh (nếu có), tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
  - + Thời gian thực hiện xét nghiệm giải phẫu bệnh, điều kiện lưu trữ. Ghi ngày giờ nhận, người bàn giao và người nhận.
  - Đôi chiểu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm,...

#### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

- Thời gian thực hiện kỹ thuật: 8 giờ;  
 Thời gian thực hiện xét nghiệm: 5 ngày.

#### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật**

Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

#### **3. AN TOÀN:**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm theo quy định Bộ Y tế

#### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Chuẩn bị bệnh phẩm**

- Khối nén bệnh phẩm sau khi cố định được cắt 1 lát với độ dày  $3\mu\text{m}$ , sau đó được gắn lên tiêu bản tích điện dương chuyên dụng cho kỹ thuật hoá mô miễn dịch, trên lam có mã số riêng. Mỗi mẫu phẩm cắt 2 tiêu bản (nhằm đảm bảo tiết kiệm tối đa bệnh phẩm và đảm bảo tính liên tục của mô trên 2 tiêu bản). Hai tiêu bản này bao gồm:

- + 1 tiêu bản nhuộm hoá mô miễn dịch chính.

- + 1 tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin.

- Mẫu phẩm chuẩn bị làm chứng âm và chứng dương cắt 2 tiêu bản:

- + 1 tiêu bản chứng âm.

- + 1 tiêu bản chứng dương.

- Tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin sẽ được nhuộm HE theo quy trình nhuộm. Các tiêu bản còn lại được bảo quản trong tủ lạnh trong các hộp đựng tiêu bản có đánh số.

- Tiêu bản được các Bác sĩ Giải phẫu bệnh đánh giá lại bằng kính hiển vi quang học: Đánh giá chất lượng tiêu bản, chất lượng mô, đánh số số lượng và chất lượng u nhằm đảm bảo cho nhuộm hoá mô miễn dịch.

- + Nếu mẫu mô đạt, tiến hành các bước tiếp theo.

- + Nếu mẫu mô không đạt, chọn mẫu mô khác của bệnh nhân và thực hiện lại các bước trên.

#### **4.2. Chuẩn bị hóa chất**

- Dung dịch loại paraffin: theo tỉ lệ 1 dung dịch: 9 nước cắt 2 lần (hoặc nước đã khử ion)

- Dung dịch dầu bao phủ lên tiêu bản mô ngăn hóa chất bốc hơi, tạo điều kiện thuận lợi cho các phản ứng xảy ra: dùng trực tiếp.

- Dung dịch rửa tiêu bản Buffer: Pha dung dịch đậm đặc với nước cắt 2 lần theo tỉ lệ 1 dung dịch rửa đậm đặc: 9 nước cắt 2 lần.

- Dung dịch bộc lộ kháng nguyên: sử dụng trực tiếp.

- Kháng thể 1 PDL1 (nếu hóa chất đậm đặc cần pha loãng theo tỉ lệ quy định của nhà sản xuất).

- Bộ kít phát hiện DAB

- Dung dịch nhuộm nhân tế bào.

- Hóa chất làm xanh nhân.

- Chứng âm và chứng dương của bộ kit.

- + Chứng âm: Kháng thể đơn dòng được sản xuất từ thỏ, không bắt đặc hiệu với các kháng nguyên trên mẫu mô. Được sử dụng thay cho kháng thể sơ cấp. Giúp kiểm soát chất lượng kết quả nhuộm, đánh giá mức độ nhuộm nền của xét nghiệm.

- Bộ kít khuếch đại tín hiệu: Tăng cường độ tạo màu khi quan sát dưới kính hiển vi quang học.

- Ethanol hay thuốc thử alcol.

- Nước khử ion hay nước cất.

- Xylene.

- Gel gắn lamelle

- Các nhãn mã vạch (thích hợp cho chứng thuốc thử âm và kháng thể được xét nghiệm)

#### **4.2. Các bước thực hiện**

Bước 1: Tẩy paraffin trên tiêu bản nhuộm bằng dung dịch tẩy chuyên dụng.

Bước 2: Bọc lộ kháng nguyên bằng dung dịch bọc lộ, thời gian ủ: 92 phút.

Bước 3: Khử protein nội sinh bằng Peroxidase.

Bước 4: Kháng thể 1 PD-L1: ủ 50 phút.

Bước 5: Dùng chất tăng sự kết nối kháng thể 1 và kháng thể 2: 12 phút

Bước 6; Kháng thể 2: 12 phút

Bước 7: Chất khuếch đại tín hiệu: 8 phút

Bước 8: Dung dịch nhuộm nhân tế bào: 12 phút

Bước 9: Dung dịch làm xanh nhân: 4 phút

Giữa các bước phải rửa tiêu bản bằng dung dịch rửa. Trong quá trình ủ hóa chất đều phủ dung dịch dầu khoáng lên tiêu bản để chống bay hơi.

Bước 10: Khử nước, gắn lá kính.

Bước 11: Sắp xếp tiêu bản đã nhuộm phù hợp tên tuổi, mã số của giấy chỉ định, gửi bác sĩ Giải phẫu bệnh đọc và phân tích kết quả.

#### **4.2. Nhận định kết quả và báo cáo**

##### **4.2.1. Đọc kết quả**

- Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.

- Đánh giá tiêu bản nhuộm Hematoxylin Eosin nhằm đánh giá vùng u và vùng lành.

- Đánh giá tiêu bản chứng âm, dương, chứng nội (in-house control):

- + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm chính.

- + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.

- Đánh giá tiêu bản mẫu phẩm nhuộm: Các tiêu chí đánh giá gồm:

- + Tế bào u có bọc lộ: khi màng bào tương bắt màu nâu nhạt của thuốc nhuộm một phần hoặc toàn bộ.

+ Tế bào miễn dịch có bộc lộ: gồm lympho bào và đại thực bào trong vùng đệm bào trong và xung quanh u. Trong đó màng tế bào hoặc tế bào chất bắt màu toàn bộ hoặc một phần.

+ Tuỳ vào từng cơ quan PD-L1 được đánh giá bằng chỉ số TC, IC, CPS hoặc TPS theo hướng dẫn Quốc tế:

$$CPS = [(Tổng số tế bào u, lympho, đại thực bào bắt màu)/(Tổng số tế bào u)] \times 100.$$

$$TPS = [Số tế bào u bắt màu]/(Tổng số tế bào u)] \times 100\%.$$

- Tuỳ theo từng cơ quan hoặc từng loại hoá chất có các khuyến cáo khác nhau về trong việc đánh giá PD-L1 là dương tính hay âm tính

#### 4.2.2. Báo cáo, trả kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở;

Lưu khố nến và tiêu bản theo quy định của cơ sở.

### 5. SAI SÓT VÀ HƯỚNG XỬ TRÍ

#### KHÔNG CÓ TÍN HIỆU HOẶC TÍN HIỆU YẾU

##### Nguyên nhân

##### Cách khắc phục

**Khử paraffin không hết** Tăng thời gian khử paraffin hoặc thay thế dung dịch khử paraffin mới

**Nhiệt độ ủ không chính xác** Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa hoặc tăng thời gian

**Thời gian ủ với kháng thể 1 quá ngắn** Tăng thời gian ủ với kháng thể 1

**Thời gian cố định quá dài** Kiểm tra lại quy trình cố định bệnh phẩm, bệnh phẩm cần được cố định trong khoảng 6-72 giờ

#### TÍN HIỆU KHÔNG ĐỒNG ĐỀU GIỮA CÁC VÙNG TRÊN BỆNH PHẨM

##### Nguyên nhân

##### Cách khắc phục

**Tồn tại nhiều vùng khác nhau trên bệnh phẩm** Tăng thời gian cố định

**Probe phân bố không đồng đều do có bọt khí** Thực hiện lại phản ứng và đảm bảo không có bọt khí

**Kích thước bệnh phẩm quá lớn** Tăng thể tích dung dịch khi bơm

#### NHUỘM NỀN CAO

##### Nguyên nhân

##### Cách khắc phục

**Quá trình rửa** - Kiểm tra lại pH của dung dịch rửa (7,2-7,5)

- Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa

- Giảm thời gian ủ

**Thời gian ủ với kháng thể lâu**

#### MẤT HAY TIÊU BIỂN BỆNH PHẨM

##### Nguyên nhân

##### Cách khắc phục

**Sấy tiêu bản không đúng** Kiểm tra lại nhiệt độ tủ sấy

**Bộc lộ quá mức** - Kiểm tra lại nhiệt độ bộc lộ

- Giảm thời gian bóc lộ

### **Chú ý:**

- Nếu bệnh phẩm không được cố định trong dung dịch formol đậm trung tính 10% thì khả năng bóc lộ kháng nguyên rất thấp.
- Thời gian cố định quá lâu có thể làm mất tính kháng nguyên của mô, do đó, thời gian cố định tối đa là 6 giờ (bệnh phẩm sinh thiết nhỏ), 48 giờ (bệnh phẩm lớn).
- Cần pha kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tìm một nồng độ thích hợp nhất để tránh âm tính giả hoặc dương tính giả.
- Luôn kiểm tra hạn sử dụng của các kháng thể, nhất là với các kháng thể đã sử dụng còn dư từ lần nhuộm trước.
- Tuân thủ quy trình kiểm tra chất lượng.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 201

## 71. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MÔ MIỄN DỊCH ĐỒNG THỜI TỪ HAI DẤU ẨN TRỞ LÊN TRÊN CÙNG MỘT PHIẾN ĐỒ HOẶC MỘT TIÊU BẢN

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

- Xét nghiệm hóa miễn dịch giúp xác định nguồn gốc của tế bào ung thư, phân loại, tiên lượng bệnh ung thư, tiên đoán đáp ứng điều trị và đặc biệt là xác định chính xác các “đích điều trị” nhằm giúp cho lâm sàng chọn lựa đúng thuốc, đúng phác đồ cho mỗi loại ung thư. Tuy nhiên trong thực hành có nhiều trường hợp tế bào u lây được rất ít vì vị trí khó tiếp cận hoặc do kỹ thuật ít xâm lấn; không còn đủ số lượng do đã thực hiện nhiều xét nghiệm khác hoặc u phát hiện sớm nên kích thước nhỏ. Vì vậy, với sự phát triển của các kỹ thuật hiện đại thì kỹ thuật nhuộm đồng thời hai hoặc nhiều dấu ẩn (Coctail, Multiplex) đã ra đời nhằm đáp ứng nhu cầu thực hành lâm sàng.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Định nghĩa:** Nhuộm hóa miễn dịch (Immunochemistry) bao gồm cả Hóa mô miễn dịch (Immunohistochemistry - IHC) và Hóa tế bào miễn dịch (Immunocytochemistry - ICC) là một kỹ thuật được sử dụng để xác định sự hiện diện và phân bố của các protein hoặc các phân tử khác trong các mẫu sinh học. Kỹ thuật này dựa vào các kháng thể đặc hiệu để gắn kết với các kháng nguyên đích trong mô, sau đó sử dụng các chất nhuộm màu có thể quan sát được.

- **Nguyên lý:** Hóa mô miễn dịch là phương pháp xác định những kháng nguyên đặc hiệu có trong mô hoặc tế bào, dựa trên sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể, có thể gắn kết trực tiếp hoặc gián tiếp. Kháng thể thứ nhất sẽ được gắn kết với phức hợp màu giúp quan sát được dưới kính hiển vi quang học. Kháng thể thứ 2 trôi đi được gắn kết với phức hợp màu giúp quan sát được dưới kính hiển vi quang học nhưng không trùng màu sắc với phức hợp màu đã gắn ở kháng thể trước đó.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01

Kỹ thuật y: 02

#### 2.2. Vật tư

- *Vật tư :*

STT	Tên dụng cụ, vật tư	Đơn vị tính
1	Lam kính	Cái
2	Lá kính dán tiêu bản (lamen)	Cái
3	Nhăn dán	Cái
4	Bể nhuộm bằng thủy tinh	Cái

<b>STT</b>	<b>Tên dụng cụ, vật tư</b>	<b>Đơn vị tính</b>
5	Bề thuỷ tinh đựng cồn, xylen	Cái
6	Giá đựng tiêu bản	Cái
7	Cốc đong	Cái
8	Găng tay	Cái
9	Khẩu trang	Cái
10	Kính bảo hộ	Cái
11	Lưỡi dao cắt lát mỏng	Cái
12	Ông hút (Pipette) tự động	Cái

**- Hóa chất, sinh phẩm:**

<b>STT</b>	<b>Hóa chất, sinh phẩm</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Điều kiện bảo quản</b>
1	Bộ kit DAB theo máy	ml	2-8 độ C
2	Các loại kháng thể	ml	2-8 độ C
3	Dung dịch EZ Prep	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
4	Dung dịch LCS	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
5	Dung dịch CC1	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
6	Dung dịch SSC	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
7	Dung dịch Reaction buffer	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
8	Dung dịch CC2	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
9	Dung dịch Option	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
10	Bộ nhuộm H&E (nếu cần)	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo

**2.3. Trang thiết bị**

<b>STT</b>	<b>Tên thiết bị</b>	<b>Đơn vị tính</b>
1	Máy nhuộm hóa miễn dịch tự động	Cái
2	Bàn sấy tiêu bản	Cái

3	Kính hiển vi để kiểm tra kết quả Cái nhuộm	
4	Tủ âm 37°C	Cái
5	Tủ hút phòng thí nghiệm	Cái
6	Máy cắt lát mỏng (microtome)	Cái
7	Tủ lạnh lưu kháng thể	Cái
8	Bề nhuộm	Cái
9	Bề căng mô	Cái
10	Bàn làm lạnh	Cái

#### 2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm đã được cắt lọc, xử lý mô và vùi trong khối paraffin. Với tiêu bản tế bào: phiến đồ chưa nhuộm bằng phương pháp nào khác hoặc mẫu tiêu bản đã nhuộm với phương pháp nhuộm tế bào học khác.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: còn đủ tế bào u, đảm bảo chất lượng (cố định đúng dung dịch cố định, đủ thể tích, đảm bảo chất lượng hóa chất, quy trình xử lý). Với tiêu bản tế bào đã nhuộm bằng phương pháp khác thì đã xử lý ngâm trong xylen để loại bỏ lá kính và tẩy rửa màu nhuộm trong cồn 96.

- Vật liệu nội kiểm: Mẫu bệnh phẩm làm mô chứng đã được BS GPB tuyển chọn để cố định, cắt lọc, xử lý mô và vùi trong khối paraffin theo quy trình chọn mẫu nội kiểm.

- Thông tin nhận diện mẫu bệnh phẩm: Mã số tiêu bản, số thứ tự block (nếu có), tên vị trí lấy mẫu, số lượng mẫu trên nhãn.

#### 1.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Ghi đầy đủ thông tin bệnh nhân.

- Ghi đầy đủ thông tin lâm sàng và các dấu ấn, chỉ định nhuộm từ bác sĩ giải phẫu bệnh hoặc bác sĩ lâm sàng.

- Đã được vị trí nhận mẫu xác nhận và có đầy đủ các mã số cho từng dấu ấn.

#### 1.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:

Khoảng 3-6 giờ tùy thuộc từng loại dấu ấn khác nhau.

#### 1.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:

Phòng hóa mô miễn dịch – Khoa Giải phẫu bệnh

### 3. AN TOÀN

- Quy định về an toàn cho người thực hiện và dự phòng nguy cơ trước, trong và sau phơi nhiễm (Theo quy định của khoa).

- Quy định hiệu chuẩn vật tư, thiết bị (Định kỳ theo quy định hiệu chuẩn vật tư, thiết bị của khoa).

- Quy định về an toàn điện và phòng tránh cháy nổ (Theo quy định của khoa).

- Quy định về an toàn hóa chất: có bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất (có thể xây dựng quy định riêng nếu cần).

- Quy định về an toàn sinh học: đảm bảo an toàn sinh học.

- Quy định kiểm soát môi trường: yếu tố vi khí hậu: nhiệt độ không quá 30 độ C, độ ẩm không quá 70%, ánh sáng: tránh ánh nắng trực tiếp chiếu vào máy và kháng thê, tiếng ồn không vượt quá 55dBA…

#### 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

##### 4.1. Các bước thực hiện

STT	Các bước thực hiện	Diễn giải	Thời gian thực hiện	Người thực hiện	Người phối hợp
1	Nhận mẫu	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nhận giấy chỉ định từ vị trí nhận mẫu. Sắp xếp giấy chỉ định theo thứ tự mã số từ nhỏ tới lớn.</li> <li>- Kiểm tra hệ thống LIS các ca nhuộm trước để tránh nhuộm trùng .</li> <li>- Tìm mẫu (block, tiêu bản) theo yêu cầu trên giấy chỉ định nhuộm.</li> <li>- Chọn biểu tượng hệ thống nhuộm trên máy vi tính. Bật nút nguồn của máy hoá miễn dịch.</li> <li>- Tìm mẫu chứng các kháng thê. Kiểm tra và dán nhãn lên tiêu bản chuyên dụng cho nhuộm hoá mô miễn dịch.</li> </ul>	15 phút	KTV GPB	KTV GPB
2	Chuẩn bị trước khi nhuộm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra, đổi chiều lại giấy chỉ định và các tiêu bản đã soạn để đảm bảo đã đúng và đủ dấu ấn, mô chứng đã đúng.</li> <li>- Lập danh sách kháng thê cần chuẩn bị hoặc pha loãng.</li> </ul>	3 giờ	KTV GPB	KTV GPB

3	Nhuộm bằng máy hóa miễn dịch tự động	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cắt mỏng đẹp từ block mô chứng và block mô bệnh với độ dày lát cắt 3-4um, vót lên tiêu bản nhuộm hóa miễn dịch và tiêu bản H&amp;E (với mẫu mô học). Sử dụng nước cát trong buồng vót mô ở nhiệt độ 37-40 độ C.</li> <li>- Đẽ ráo. Ủ ở 37 độ C qua đêm. Hoặc sấy 60 độ C tối thiểu 2 giờ 30 phút nếu cần nhuộm khẩn.</li> <li>- Đẽ các tiêu bản có cùng kháng thể gần nhau và theo thứ tự.</li> <li>- Kiểm tra các hoá chất cơ bản, bộ kit, kháng thể và thùng chứa nước thải trên máy nhuộm.</li> <li>- Chuẩn bị máy nhuộm: Nhấn nút “Ready”, ấn mở các vị trí nhuộm, kiểm tra các vị trí nhuộm, đảm bảo đã rửa sạch hóa chất cũ</li> <li>- Cho tiêu bản đã dán nhãn vào máy theo thứ tự. Kiểm tra để đảm bảo tiêu bản đã nằm chắc chắn trong 4 mẫu giữ tiêu bản bằng cách di chuyển tiêu bản đảm bảo tiêu bản chạm 4 mẫu. Đóng máy. Chọn "Running", ấn nút OK. Theo dõi để chắc chắn máy đã chạy ổn ở tất cả các vị trí.</li> </ul>	3-6 giờ	KTV GPB	KTV GPB
4	Pha kháng thể	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pha kháng thể nhỏ tay (nếu có) theo thứ tự trong danh sách. Pha theo tỷ lệ pha kháng thể nhà sản xuất khuyến cáo (có ghi trên lọ kháng thể) với dung dịch pha loãng kháng thể. Lưu trữ trong tủ lạnh 2-8 độ C.</li> </ul>	30 phút	KTV GPB	KTV GPB

5	Lưu thông tin nhuộm	- Nhập đầy đủ thông tin ca bệnh vào hệ thống quản lý những ca đã/ đang nhuộm. Viết ngày nhuộm lên phiếu chỉ định.	10 phút	KTV GPB	KTV GPB	
6	Nhỏ kháng thể lên tiêu bản	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Khi máy báo nhỏ kháng thể (titration) thì ấn nút để mở vị trí chứa tiêu bản, nhỏ kháng thể lên tiêu bản, luôn luôn chú ý kiểm tra giữa kháng thể và dấu ấn trên nhãn tiêu bản.</li> <li>- Án nút vị trí chứa tiêu bản 1 lần nữa để đóng, tiếp tục ấn giữ nút để tiếp tục nhuộm.</li> <li>- Khi máy báo tiêu bản đã nhuộm xong, lấy ra rửa sạch.</li> </ul>	15 phút	KTV GPB	KTV GPB	
7	Rửa, hoàn thiện tiêu bản (Nếu tiêu bản đã được nhuộm tương phản, bỏ qua bước 8,9)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Để khô, vạch phân chia mô chứng bằng bút lông xanh, đánh dấu vị trí chứng bằng bút lông đỏ ở mặt sau của tiêu bản (mặt không có mô).</li> <li>- Dán lamell.</li> </ul>				
8	Lọc Hematoxylin	Lọc Hematoxylin. Thay cồn 99,5 <sup>0</sup>	5 Phút	KTV GPB	KTV GPB	
9	Nhuộm Hematoxylin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Khi máy báo tiêu bản đã nhuộm xong, lấy ra rửa sạch.</li> <li>- Rửa lại bằng nước cất.</li> <li>- Nhuộm Hematoxylin trong 1 phút</li> <li>- Rửa nước. Tẩy Hematoxylin thừa bằng acid cồn 0,5%</li> <li>- Rửa nước. Nhúng qua dung dịch NH<sub>4</sub>OH 1% hoặc bluing reagent trong 15 giây</li> </ul>	3 phút	KTV GPB	KTV GPB	

		- Rửa nước. rửa qua cồn 99,5 <sup>0</sup> trong 30 giây.		
		- Đέ khô, vạch phân chia mô chứng bằng bút lông xanh, đánh dấu vị trí chứng bằng bút lông đỏ ở mặt sau của tiêu bản (mặt không có mô).		
		- Dán lamell		
		- Kiểm tra mẫu chứng		
10	Viết mã GPB lên tiêu bản và xếp lam cho BS GPB	- Sắp xếp các tiêu bản H&E (nếu có) đối chứng và tiêu bản hóa miến dịch theo giấy chỉ định từng ca. Kiểm tra, đổi chiều lại 1 lần nữa các tiêu bản với yêu cầu trên giấy chỉ định. Ghi rõ ngày chuyển tiêu bản lên giấy.	30 phút	KTV GPB KTV GPB

#### 4.2. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả QC (chạy song song mẫu mô chứng): Trong khi tiến hành nhuộm, việc kiểm tra chất lượng là hết sức quan trọng, để đảm bảo loại trừ các khả năng dương tính giả và âm tính giả. Phải có các mảnh cắt chứng dương tính và âm tính được nhuộm kèm theo. Giới hạn ngưỡng kết quả nội kiểm: chỉ có màu xanh tím của Hematoxylin nhuộm nhân tế bào và hành động khắc phục khi QC không đạt: nhuộm lại. QC đạt yêu cầu sẽ được BS GPB đọc kết quả xét nghiệm.

- Đọc kết quả và nhận định kết quả (BS GPB):
- + Đọc kết quả (có thể là bán định lượng, định tính) dựa trên kết quả quan sát của BS GPB.

+ Nhận định kết quả:

Âm tính: không có sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể trên tế bào và mô, không được hiển thị bằng màu.

Dương tính: có sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể trên tế bào và mô, được hiển thị bằng màu. Tùy vào bộ hóa chất gắn màu thì màu sắc phức hợp hiển thị khác nhau (thường dùng là vàng nâu hoặc đỏ tương ứng với 2 kháng thể). Dương tính có thể xảy ra với 1 hoặc 2 hoặc nhiều kháng thể khác nhau.

#### 4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu.
- Kết quả được ghi vào phiếu xét nghiệm, in bảng giấy hoặc trả bảng điện tử (có chữ ký của BS đọc kết quả)

- Lưu hồ sơ giấy chỉ định nhuộm theo quy định của khoa.

## 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

### 5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Nếu bệnh phẩm không được cố định trong dung dịch formol đậm trung tính 10% thì khả năng bộc lộ kháng nguyên rất thấp.

- Thời gian cố định quá lâu có thể làm mất tính kháng nguyên của mô, do đó, thời gian cố định tối đa là 6 giờ (bệnh phẩm sinh thiết nhỏ), 48 giờ (bệnh phẩm lớn).

- Việc loại bỏ nhẹ nhàng lá kính đối với tiêu bản tế bào học đã nhuộm bằng phương pháp khác rất quan trọng. Không được cố gắng cạy lá kính vì có thể làm bong tróc màng tế bào. Cần ngâm trong xylen để lá kính tự bong khoảng 4-12 giờ.

### 5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Cần pha kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tìm một nồng độ thích hợp nhất để tránh âm tính giả hoặc dương tính giả.

- Luôn kiểm tra hạn sử dụng của các kháng thể, nhất là với các kháng thể đã sử dụng còn dư từ lần nhuộm trước.

- Luôn kiểm tra đối chiếu kháng thể (trường hợp kháng thể nhỏ tay) và tên kháng thể trên nhãn tiêu bản tránh nhầm lẫn kháng thể.

### 5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Nếu mô chứng và mô bệnh âm tính giả, phải kiểm tra lại hạn dùng, nồng độ của toàn bộ hóa chất, kháng thể, nhiệt độ quá nóng, mô quá khô.

- Mô bị nhuộm nền do sử dụng nồng độ quá cao, mô cố định xấu, có nhiều hoại tử hoặc mẫu mô còn nhiều biotin nội sinh và peroxidase nội sinh.

- Lát cắt bị bong tróc, mất tính toàn vẹn sau nhuộm: cần thực hiện lại quy trình.

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.

- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Y tế (2014). Thông tư số 50/2014/TT-BYT ngày 26 tháng 12 năm 2014 quy định việc phân loại phẫu thuật, thủ thuật và định mức nhân lực trong từng ca phẫu thuật, thủ thuật.

Bộ Y tế (2017). Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh - Tế bào học. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

## 72. XÉT NGHIỆM HÓA TẾ BÀO MIỄN DỊCH TRÊN PHIÊN ĐỒ HOẶC MỘT TIÊU BẢN CHO MỘT DẤU ẨN

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Xét nghiệm hóa tế bào miễn dịch để xác định nguồn gốc của tế bào ung thư, hỗ trợ phân loại điều trị nhằm giúp cho lâm sàng chọn lựa đúng phác đồ xử trí cho mỗi loại ung thư

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- **Định nghĩa:** Nhuộm hóa tế bào miễn dịch (Immunocytochemistry – ICC) là một kỹ thuật được sử dụng để xác định sự hiện diện và phân bố của các protein hoặc các phân tử khác trong các mẫu/ phiến đồ tế bào học. Kỹ thuật này dựa vào các kháng thể đặc hiệu để gắn kết với các kháng nguyên đích, sau đó sử dụng các chất nhuộm màu có thể quan sát được.

- **Nguyên lý:** Hóa tế bào miễn dịch là phương pháp xác định những kháng nguyên đặc hiệu có trong tế bào, dựa trên sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể, có thể gắn kết trực tiếp hoặc gián tiếp.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện

Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01

Kỹ thuật y : 02

#### 2.2. Vật tư

##### - *Vật tư:*

STT	Tên dụng cụ, vật tư	Đơn vị tính
1	Lam kính	Cái
2	Lá kính dán tiêu bản (lamen)	Cái
3	Nhãn dán	Cái
4	Bề nhuộm bằng thủy tinh	Cái
5	Bề thủy tinh đựng cồn, xylen	Cái
6	Giá đựng tiêu bản	Cái
7	Cốc đong	Cái
8	Găng tay	Cái
9	Khẩu trang	Cái
10	Kính bảo hộ	Cái

<b>STT</b>	<b>Tên dụng cụ, vật tư</b>	<b>Đơn vị tính</b>
11	Lưỡi dao cắt lát mỏng	Cái
12	Óng hút (Pipette) tự động	Cái

**- Hóa chất, sinh phẩm :**

<b>STT</b>	<b>Hóa chất, sinh phẩm</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Điều kiện bảo quản</b>
1	Bộ kit DAB theo máy	ml	2-8 độ C
2	Các loại kháng thể	ml	2-8 độ C
3	Dung dịch EZ Prep	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
4	Dung dịch LCS	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
5	Dung dịch CC1	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
6	Dung dịch SSC	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
7	Dung dịch Reaction buffer	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
8	Dung dịch CC2	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
9	Dung dịch Option	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
10	Bộ nhuộm H&E (GPB-QTKT-04) (nếu cần)	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo

**2.3. Trang thiết bị**

<b>STT</b>	<b>Tên thiết bị</b>	<b>Đơn vị tính</b>
1	Máy nhuộm hóa miễn dịch tự động	Cái
2	Bàn sấy tiêu bản	Cái
3	Kính hiển vi để kiểm tra kết quả nhuộm	Cái
4	Tủ âm 37°C	Cái
5	Tủ hút phòng thí nghiệm	Cái
6	Máy cắt lát mỏng (microtome)	Cái
7	Tủ lạnh lưu kháng thể	Cái

8	Bề nhuộm	Cái
9	Bề căng mô	Cái
10	Bàn làm lạnh	Cái

#### 2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: phiến đồ chưa nhuộm bằng phương pháp nào khác hoặc mẫu tiêu bản đã nhuộm với phương pháp nhuộm tế bào học khác.
- Tiêu chuẩn mẫu: còn đủ tế bào u, đảm bảo chất lượng (cố định đúng dung dịch cố định tế bào học, với tiêu bản đã nhuộm bằng phương pháp khác thì đã xử lý ngâm trong xylen để loại bỏ lá kính)
- Vật liệu nội kiểm: Mẫu mô chứng đã được bác sĩ Giải phẫu bệnh tuyển chọn để cố định, cắt lọc, xử lý mô và vùi trong khối paraffin theo quy trình.
- Thông tin nhận diện mẫu bệnh phẩm: Mã số tiêu bản.

#### 2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Ghi đầy đủ thông tin bệnh nhân
- Ghi đầy đủ thông tin lâm sàng và các dấu ấn, chỉ định nhuộm HTBMD từ bác sĩ giải phẫu bệnh hoặc bác sĩ lâm sàng.
- Đã được vị trí nhận mẫu xác nhận và có đầy đủ các mã số cho từng dấu ấn.

#### 2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:

Khoảng 3-6 giờ tùy thuộc từng loại dấu ấn khác nhau.

#### 2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:

Phòng hóa miễn dịch – Khoa Giải phẫu bệnh

### 3. AN TOÀN

- Quy định về an toàn cho người thực hiện và dự phòng nguy cơ trước, trong và sau phơi nhiễm (Theo quy định của khoa).
- Quy định hiệu chuẩn vật tư, thiết bị (Định kỳ theo quy định hiệu chuẩn vật tư, thiết bị của khoa).
- Quy định về an toàn điện và phòng tránh cháy nổ (Theo quy định của khoa).
- Quy định về an toàn hóa chất: có bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất (có thể xây dựng quy định riêng nếu cần).
- Quy định về an toàn sinh học: đảm bảo an toàn sinh học.
- Quy định kiểm soát môi trường: yếu tố vi khí hậu: nhiệt độ không quá 30 độ C, độ ẩm không quá 70%, ánh sáng: tránh ánh nắng trực tiếp chiếu vào máy và kháng thể, tiếng ồn không vượt quá 55dBA...

### 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

#### 4.1. Chuẩn bị:

### **Chuẩn bị mẫu:**

- Tìm lại tiêu bản tế bào học tương ứng với mẫu của bệnh nhân được yêu cầu.
- Mẫu chưa nhuộm (nếu có).

### **Chuẩn bị hóa chất, vật tư, thiết bị:**

- Bật hệ thống máy tính và phần mềm, hệ thống máy nhuộm.
- Kiểm tra, đổi chiều lại giấy chỉ định và các tiêu bản đã soạn để đảm bảo đã đúng và đủ dấu ấn, mô chứng đã đúng.
- Lập danh sách kháng thể cần chuẩn bị hoặc pha loãng.
- Cắt mỏng đẹp từ block mô chứng được chọn với độ dày lát cắt 3-4um, vót lên tiêu bản cần nhuộm ở vị trí còn trống. Sử dụng nước cất trong buồng vót mô ở nhiệt độ 37-40 độ C.
- Để ráo. Ủ ở 37 độ C qua đêm. Hoặc sấy 60 độ C tối thiểu 2 giờ 30 phút nếu cần nhuộm khẩn.
- Để các tiêu bản có cùng kháng thể gần nhau và theo thứ tự.
- Kiểm tra các hóa chất cơ bản, bộ kit, kháng thể và thùng chứa nước thải trên máy nhuộm.
- Chuẩn bị máy nhuộm: Nhấn nút “Ready”, án mở các vị trí nhuộm, kiểm tra các vị trí nhuộm, đảm bảo đã rửa sạch hóa chất cũ.

### **4.2. Các bước nhuộm:**

STT	Các bước thực hiện	Diễn giải	Thời gian thực hiện	Người thực hiện	Người phối hợp
1	Nhuộm bằng máy hóa miễn dịch tự động	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cho tiêu bản đã dán nhãn vào máy theo thứ tự. Kiểm tra để đảm bảo tiêu bản đã nằm chắc chắn trong 4 máu giữ tiêu bản bằng cách di chuyển tiêu bản đảm bảo tiêu bản chạm 4 máu. Đóng máy. Chọn "Running", án nút OK. Theo dõi để chắc chắn máy đã chạy ổn ở tất cả các vị trí.</li> </ul>	3-6 giờ	KTV GPB	KTV GPB
2	Pha kháng thể	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pha kháng thể nhỏ tay (nếu có) theo thứ tự trong danh sách. Pha theo tỷ lệ pha kháng thể nhà sản xuất khuyến cáo (có ghi trên lọ</li> </ul>	30 phút	KTV GPB	KTV GPB

kháng thể) với dung dịch pha loãng kháng thể. Lưu trữ trong tủ lạnh 2-8 độ C.

3	Lưu thông tin nhuộm	- Nhập đầy đủ thông tin ca bệnh vào hệ thống quản lý những ca đã/ đang nhuộm. Viết ngày nhuộm lên phiếu chỉ định.	10 phút	KTV GPB	KTV GPB	
4	Nhỏ kháng thể lên tiêu bản	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Khi máy báo nhỏ kháng thể (titration) thì ấn nút để mở vị trí chứa tiêu bản, nhỏ kháng thể lên tiêu bản, luôn luôn chú ý kiểm tra giữa kháng thể và dấu ấn trên nhãn tiêu bản.</li> <li>- Án nút vị trí chứa tiêu bản 1 lần nữa để đóng, tiếp tục ấn giữ nút để tiếp tục nhuộm.</li> <li>- Khi máy báo tiêu bản đã nhuộm xong, lấy ra rửa sạch.</li> </ul>	15 phút	KTV GPB	KTV GPB	
5	Rửa, hoàn thiện tiêu bản (Nếu tiêu bản đã được nhuộm tương phản, bỏ qua bước 8,9)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Để khô, vạch phân chia mô chứng bằng bút lông xanh, đánh dấu vị trí chứng bằng bút lông đỏ ở mặt sau của tiêu bản (mặt không có mô).</li> <li>- Dán lamell.</li> </ul>				
6	Lọc Hematoxylin	Lọc Hematoxylin. Thay cồn 99,5°	5 Phút	KTV GPB	KTV GPB	
7	Nhuộm Hematoxylin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Khi máy báo tiêu bản đã nhuộm xong, lấy ra rửa sạch</li> <li>- Rửa lại bằng nước cát.</li> <li>- Nhuộm Hematoxylin trong 1 phút</li> <li>- Rửa nước. Tẩy Hematoxylin thừa bằng acid cồn 0,5%</li> </ul>	3 phút	KTV GPB	KTV GPB	

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rửa nước. Nhúng qua dung dịch NH<sub>4</sub>OH 1% hoặc bluing reagent trong 15 giây</li> <li>- Rửa nước. rửa qua cồn 99,5° trong 30 giây.</li> <li>- Để khô, vạch phân chia mô chứng bằng bút lông xanh, đánh dấu vị trí chứng bằng bút lông đỏ ở mặt sau của tiêu bản (mặt không có mô).</li> <li>- Dán lamell</li> <li>- Kiểm tra mẫu chứng</li> <li>- Sắp xếp các tiêu bản theo giấy chỉ định từng ca. Ghi rõ ngày chuyển tiêu bản lên giấy.</li> </ul>		
8	Viết mã GPB lên tiêu bản và xếp lam cho BS GPB		30 phút	KTV GPB KTV GPB

#### 4.3. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả QC (chạy song song kèm mẫu mô chứng): Trong khi tiến hành nhuộm HTBMD, việc kiểm tra chất lượng là hết sức quan trọng, để đảm bảo loại trừ các khả năng dương tính giả và âm tính giả. Phải có các mảnh cắt chứng dương tính và âm tính được nhuộm kèm theo. Giới hạn ngưỡng kết quả nội kiểm: chỉ có màu xanh tím của Hematoxylin nhuộm nhân tế bào và hành động khắc phục khi QC không đạt: nhuộm lại. QC đạt yêu cầu sẽ được BS GPB đọc kết quả xét nghiệm.

- Đọc kết quả và nhận định kết quả (BS GPB):

+ Đọc kết quả (có thể là bán định lượng, định tính) dựa trên kết quả quan sát của BS GPB.

+ Nhận định kết quả:

Âm tính: không có sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể trên tế bào, không được hiển thị bằng màu vàng nâu.

Dương tính: có sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể trên tế bào, được hiển thị bằng màu vàng nâu.

#### 4.4. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi biểu mẫu.

- Kết quả được ghi vào phiếu xét nghiệm, in bảng giấy hoặc trả bảng điện tử (có chữ ký của BS đọc kết quả)

- Lưu hồ sơ giấy chỉ định nhuộm HTBMD theo quy định của khoa.

### 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

### **5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật**

Việc loại bỏ nhẹ nhàng lá kính đối với tiêu bản tế bào học đã nhuộm bằng phương pháp khác rất quan trọng. Không được cô găng cạy lá kính vì có thể làm bong tróc mảnh tế bào. Cần ngâm xylen từ 4-12 giờ để lá kính tự bong.

### **5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật**

- Cần pha kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tìm một nồng độ thích hợp nhất để tránh âm tính giả hoặc dương tính giả.

- Luôn kiểm tra hạn sử dụng của các kháng thể, nhất là với các kháng thể đã sử dụng còn dư từ lần nhuộm trước.

- Luôn kiểm tra đối chiếu kháng thể (trường hợp kháng thể nhỏ tay) và tên kháng thể trên nhãn tiêu bản tránh nhầm lẫn kháng thể

### **5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật**

- Nếu lát mô chứng âm tính giả, phải kiểm tra lại hạn dùng, nồng độ của toàn bộ hóa chất, kháng thể, nhiệt độ quá nóng, mô quá khô.

## **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

- Lát mô chứng bắt màu đúng ở chứng dương.
- Tuân thủ nghiêm ngặt quy trình nhuộm về nồng độ, thời gian của dung dịch.
- Thực hiện nội kiểm chất lượng: Theo quy định nội kiểm chất lượng.
- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù (Nếu có).

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Bộ Y tế (2024). Thông tư số 23/2024/TT-BYT ngày 26 tháng 12 năm 2014 quy định việc phân loại phẫu thuật, thủ thuật và định mức nhân lực trong từng ca phẫu thuật, thủ thuật.

Bộ Y tế (2017). Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh - Tế bào học. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Bộ Y tế (2013). Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25 tháng 12 năm 2013, Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành giải phẫu bệnh tế bào học.

### **73. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN HÓA MIỄN DỊCH ĐỒNG THỜI TỪ HAI DẤU ẨN TRỞ LÊN TRÊN CÙNG MỘT PHIÊN ĐỒ HOẶC TIÊU BẢN**

#### **1. ĐẠI CƯƠNG**

##### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

- Xét nghiệm hóa miễn dịch giúp xác định nguồn gốc của tế bào ung thư, phân loại, tiên lượng bệnh ung thư, tiên đoán đáp ứng điều trị và đặc biệt là xác định chính xác các “đích điều trị” nhằm giúp cho lâm sàng chọn lựa đúng thuốc, đúng phác đồ cho mỗi loại ung thư. Tuy nhiên trong thực hành có nhiều trường hợp tế bào u lấy được rất ít vì vị trí khó tiếp cận hoặc do kỹ thuật ít xâm lấn; không còn đủ số lượng do đã thực hiện nhiều xét nghiệm khác hoặc u phát hiện sớm nên kích thước nhỏ. Vì vậy, với sự phát triển của các kỹ thuật hiện đại thì kỹ thuật nhuộm đồng thời hai hoặc nhiều dấu ẩn (Coctail, Multiplex) đã ra đời nhằm đáp ứng nhu cầu thực hành lâm sàng.

##### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

- **Định nghĩa:** Nhuộm hóa miễn dịch (Immunohistochemistry) bao gồm cả Hóa mô miễn dịch (Immunohistochemistry - IHC) và Hóa tế bào miễn dịch (Immunocytochemistry - ICC) là một kỹ thuật được sử dụng để xác định sự hiện diện và phân bố của các protein hoặc các phân tử khác trong các mẫu sinh học. Kỹ thuật này dựa vào các kháng thể đặc hiệu để gắn kết với các kháng nguyên đích trong mô, sau đó sử dụng các chất nhuộm màu có thể quan sát được.

- **Nguyên lý:** Hóa mô miễn dịch là phương pháp xác định những kháng nguyên đặc hiệu có trong mô hoặc tế bào, dựa trên sự kết hợp kháng nguyên - kháng thể, có thể gắn kết trực tiếp hoặc gián tiếp. Kháng thể thứ nhất sẽ được gắn kết với phức hợp màu giúp quan sát được dưới kính hiển vi quang học. Kháng thể thứ 2 trở đi được gắn kết với phức hợp màu giúp quan sát được dưới kính hiển vi quang học nhưng không trùng màu sắc với phức hợp màu đã gắn ở kháng thể trước đó.

#### **2. CHUẨN BỊ**

##### **2.1. Người thực hiện**

Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01

Kỹ thuật y: 02

##### **2.2. Vật tư**

- *Vật tư :*

<b>STT</b>	<b>Tên dụng cụ, vật tư</b>	<b>Đơn vị tính</b>
1	Lam kính	Cái
2	Lá kính dán tiêu bản (lamen)	Cái
3	Nhãn dán	Cái

<b>STT</b>	<b>Tên dụng cụ, vật tư</b>	<b>Đơn vị tính</b>
4	Bề nhuộm bằng thủy tinh	Cái
5	Bề thủy tinh đựng cồn, xylen	Cái
6	Giá đựng tiêu bản	Cái
7	Cốc đong	Cái
8	Găng tay	Cái
9	Khẩu trang	Cái
10	Kính bảo hộ	Cái
11	Lưỡi dao cắt lát mỏng	Cái
12	Óng hút (Pipette) tự động	Cái

**- Hóa chất, sinh phẩm:**

<b>STT</b>	<b>Hóa chất, sinh phẩm</b>	<b>Số lượng</b>	<b>Điều kiện bảo quản</b>
1	Bộ kit DAB theo máy	ml	2-8 độ C
2	Các loại kháng thể	ml	2-8 độ C
3	Dung dịch EZ Prep	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
4	Dung dịch LCS	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
5	Dung dịch CC1	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
6	Dung dịch SSC	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
7	Dung dịch Reaction buffer	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
8	Dung dịch CC2	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
9	Dung dịch Option	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo
10	Bộ nhuộm H&E (nếu cần)	ml	Nhiệt độ phòng, nơi khô ráo

**2.3. Trang thiết bị**

<b>STT</b>	<b>Tên thiết bị</b>	<b>Đơn vị tính</b>
1	Máy nhuộm hóa miễn dịch tự động	Cái

2	Bàn sấy tiêu bản	Cái
3	Kính hiển vi để kiểm tra kết quả nhuộm	Cái
4	Tủ âm 37°C	Cái
5	Tủ hút phòng thí nghiệm	Cái
6	Máy cắt lát mỏng (microtome)	Cái
7	Tủ lạnh lưu kháng thể	Cái
8	Bề nhuộm	Cái
9	Bề căng mô	Cái
10	Bàn làm lạnh	Cái

#### 2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu bệnh phẩm đã được cắt lọc, xử lý mô và vùi trong khối paraffin. Với tiêu bản tế bào: phiến đồ chưa nhuộm bằng phương pháp nào khác hoặc mẫu tiêu bản đã nhuộm với phương pháp nhuộm tế bào học khác.

- Tiêu chuẩn mẫu bệnh phẩm: còn đủ tế bào u, đảm bảo chất lượng (cố định đúng dung dịch cố định, đủ thể tích, đảm bảo chất lượng hóa chất, quy trình xử lý). Với tiêu bản tế bào đã nhuộm bằng phương pháp khác thì đã xử lý ngâm trong xylen để loại bỏ lá kính và tẩy rửa màu nhuộm trong cồn 96.

- Vật liệu nội kiểm: Mẫu bệnh phẩm làm mô chứng đã được BS GPB tuyển chọn để cố định, cắt lọc, xử lý mô và vùi trong khối paraffin theo quy trình chọn mẫu nội kiểm.

- Thông tin nhận diện mẫu bệnh phẩm: Mã số tiêu bản, số thứ tự block (nếu có), tên vị trí lấy mẫu, số lượng mẫu trên nhãn.

#### 1.6. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Ghi đầy đủ thông tin bệnh nhân.

- Ghi đầy đủ thông tin lâm sàng và các dấu ấn, chỉ định nhuộm từ bác sĩ giải phẫu bệnh hoặc bác sĩ lâm sàng.

- Đã được vị trí nhận mẫu xác nhận và có đầy đủ các mã số cho từng dấu ấn.

#### 1.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:

Khoảng 3-6 giờ tùy thuộc từng loại dấu ấn khác nhau.

#### 1.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:

Phòng hóa mô miễn dịch – Khoa Giải phẫu bệnh

### 3. AN TOÀN

- Quy định về an toàn cho người thực hiện và dự phòng nguy cơ trước, trong và sau phơi nhiễm (Theo quy định của khoa).

- Quy định hiệu chuẩn vật tư, thiết bị (Định kỳ theo quy định hiệu chuẩn vật tư, thiết bị của khoa).

- Quy định về an toàn điện và phòng tránh cháy nổ (Theo quy định của khoa).

- Quy định về an toàn hóa chất: có bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất (có thể xây dựng quy định riêng nếu cần).

- Quy định về an toàn sinh học: đảm bảo an toàn sinh học.

- Quy định kiểm soát môi trường: yếu tố vi khí hậu: nhiệt độ không quá 30 độ C, độ ẩm không quá 70%, ánh sáng: tránh ánh nắng trực tiếp chiếu vào máy và kháng thể, tiếng ồn không vượt quá 55dBA...

## 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 4.1. Các bước thực hiện

STT	Các bước thực hiện	Diễn giải	Thời gian thực hiện	Người thực hiện	Người phối hợp
1	Nhận mẫu	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nhận giấy chỉ định từ vị trí nhận mẫu. Sắp xếp giấy chỉ định theo thứ tự mã số từ nhỏ tới lớn.</li> <li>- Kiểm tra hệ thống LIS các ca nhuộm trước để tránh nhuộm trùng.</li> <li>- Tìm mẫu (block, tiêu bản) theo yêu cầu trên giấy chỉ định nhuộm.</li> <li>- Chọn biểu tượng hệ thống nhuộm trên máy vi tính. Bật nút nguồn của máy hoá miễn dịch.</li> <li>- Tìm mẫu chứng các kháng thể.</li> </ul>	15 phút	KTV GPB	KTV GPB
2	Chuẩn bị trước khi nhuộm	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kiểm tra và dán nhãn lên tiêu bản chuyên dụng cho nhuộm hoá mô miễn dịch.</li> <li>Kiểm tra, đổi chiều lại giấy chỉ định và các tiêu bản đã soạn để đảm bảo đã đúng và đủ dấu ấn, mô chứng đã đúng.</li> </ul>	3 giờ	KTV GPB	KTV GPB

3	Nhuộm bằng máy hóa miễn dịch tự động	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lập danh sách kháng thể cần chuẩn bị hoặc pha loãng.</li> <li>- Cắt mỏng đẹp từ block mô chứng và block mô bệnh với độ dày lát cắt 3-4um, vót lên tiêu bản nhuộm hóa miễn dịch và tiêu bản H&amp;E (với mẫu mô học). Sử dụng nước cất trong buồng vót mô ở nhiệt độ 37-40 độ C.</li> <li>- Để ráo. Ủ ở 37 độ C qua đêm. Hoặc sấy 60 độ C tối thiểu 2 giờ 30 phút nếu cần nhuộm khẩn.</li> <li>- Để các tiêu bản có cùng kháng thể gần nhau và theo thứ tự.</li> <li>- Kiểm tra các hoá chất cơ bản, bộ kit, kháng thể và thùng chứa nước thải trên máy nhuộm.</li> <li>- Chuẩn bị máy nhuộm: Nhấn nút “Ready”, ấn mở các vị trí nhuộm, kiểm tra các vị trí nhuộm, đảm bảo đã rửa sạch hóa chất cũ</li> <li>- Cho tiêu bản đã dán nhãn vào máy theo thứ tự. Kiểm tra để đảm bảo tiêu bản đã nằm chắc chắn trong 4 mẫu giữ tiêu bản bằng cách di chuyển tiêu bản đảm bảo tiêu bản chạm 4 mẫu. Đóng máy. Chọn "Running", ấn nút OK. Theo dõi để chắc chắn máy đã chạy ổn ở tất cả các vị trí.</li> </ul>	3-6 giờ	KTV GPB	KTV GPB
4	Pha kháng thể	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pha kháng thể nhỏ tay (nếu có) theo thứ tự trong danh sách. Pha theo tỷ lệ pha kháng thể nhà sản xuất khuyến cáo (có ghi trên lọ kháng thể) với dung dịch pha loãng kháng thể. Lưu trữ trong tủ lạnh 2-8 độ C.</li> </ul>	30 phút	KTV GPB	KTV GPB

5	Lưu thông tin nhuộm	- Nhập đầy đủ thông tin ca bệnh vào hệ thống quản lý những ca đã/ đang nhuộm. Viết ngày nhuộm lên phiếu chỉ định.	10 phút	KTV GPB	KTV GPB	
6	Nhỏ kháng thể lên tiêu bản	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Khi máy báo nhỏ kháng thể (titration) thì ấn nút để mở vị trí chứa tiêu bản, nhỏ kháng thể lên tiêu bản, luôn luôn chú ý kiểm tra giữa kháng thể và dấu ấn trên nhãn tiêu bản.</li> <li>- Án nút vị trí chứa tiêu bản 1 lần nữa để đóng, tiếp tục ấn giữ nút để tiếp tục nhuộm.</li> <li>- Khi máy báo tiêu bản đã nhuộm xong, lấy ra rửa sạch.</li> </ul>	15 phút	KTV GPB	KTV GPB	
7	Rửa, hoàn thiện tiêu bản (Nếu tiêu bản đã được nhuộm tương phản, bỏ qua bước 8,9)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Để khô, vạch phân chia mô chứng bằng bút lông xanh, đánh dấu vị trí chứng bằng bút lông đỏ ở mặt sau của tiêu bản (mặt không có mô).</li> <li>- Dán lamell.</li> </ul>				
8	Lọc Hematoxylin	Lọc Hematoxylin. Thay cồn 99,5 <sup>0</sup>	5 Phút	KTV GPB	KTV GPB	
9	Nhuộm Hematoxylin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Khi máy báo tiêu bản đã nhuộm xong, lấy ra rửa sạch.</li> <li>- Rửa lại bằng nước cất.</li> <li>- Nhuộm Hematoxylin trong 1 phút</li> <li>- Rửa nước. Tẩy Hematoxylin thừa bằng acid cồn 0,5%</li> <li>- Rửa nước. Nhúng qua dung dịch NH<sub>4</sub>OH 1% hoặc bluing reagent trong 15 giây</li> </ul>	3 phút	KTV GPB	KTV GPB	

		- Rửa nước. rửa qua cồn 99,5 <sup>0</sup> trong 30 giây.		
		- Đέ khô, vạch phân chia mô chứng bằng bút lông xanh, đánh dấu vị trí chứng bằng bút lông đỏ ở mặt sau của tiêu bản (mặt không có mô).		
		- Dán lamell		
		- Kiểm tra mẫu chứng		
10	Viết mã GPB lên tiêu bản và xếp lam cho BS GPB	- Sắp xếp các tiêu bản H&E (nếu có) đối chứng và tiêu bản hóa miến dịch theo giấy chỉ định từng ca. Kiểm tra, đổi chiều lại 1 lần nữa các tiêu bản với yêu cầu trên giấy chỉ định. Ghi rõ ngày chuyển tiêu bản lên giấy.	30 phút	KTV GPB KTV GPB

#### 4.2. Nhận định kết quả

- Xem xét kết quả QC (chạy song song mẫu mô chứng): Trong khi tiến hành nhuộm, việc kiểm tra chất lượng là hết sức quan trọng, để đảm bảo loại trừ các khả năng dương tính giả và âm tính giả. Phải có các mảnh cắt chứng dương tính và âm tính được nhuộm kèm theo. Giới hạn ngưỡng kết quả nội kiểm: chỉ có màu xanh tím của Hematoxylin nhuộm nhân tế bào và hành động khắc phục khi QC không đạt: nhuộm lại. QC đạt yêu cầu sẽ được BS GPB đọc kết quả xét nghiệm.

- Đọc kết quả và nhận định kết quả (BS GPB):
- + Đọc kết quả (có thể là bán định lượng, định tính) dựa trên kết quả quan sát của BS GPB.

+ Nhận định kết quả:

Âm tính: không có sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể trên tế bào và mô, không được hiển thị bằng màu.

Dương tính: có sự hiện diện của phức hợp kháng nguyên - kháng thể trên tế bào và mô, được hiển thị bằng màu. Tùy vào bộ hóa chất gắn màu thì màu sắc phức hợp hiển thị khác nhau (thường dùng là vàng nâu hoặc đỏ tương ứng với 2 kháng thể). Dương tính có thể xảy ra với 1 hoặc 2 hoặc nhiều kháng thể khác nhau.

#### 4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình liên quan, ghi vào biểu mẫu.
- Kết quả được ghi vào phiếu xét nghiệm, in bảng giấy hoặc trả bảng điện tử (có chữ ký của BS đọc kết quả)

- Lưu hồ sơ giấy chỉ định nhuộm theo quy định của khoa.

## 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

### 5.2. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Nếu bệnh phẩm không được cố định trong dung dịch formol đậm trung tính 10% thì khả năng bộc lộ kháng nguyên rất thấp.

- Thời gian cố định quá lâu có thể làm mất tính kháng nguyên của mô, do đó, thời gian cố định tối đa là 6 giờ (bệnh phẩm sinh thiết nhỏ), 48 giờ (bệnh phẩm lớn).

- Việc loại bỏ nhẹ nhàng lá kính đối với tiêu bản tế bào học đã nhuộm bằng phương pháp khác rất quan trọng. Không được cố gắng cạy lá kính vì có thể làm bong tróc mảnh tế bào. Cần ngâm trong xylen để lá kính tự bong khoảng 4-12 giờ.

### 5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Cần pha kháng thể theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tìm một nồng độ thích hợp nhất để tránh âm tính giả hoặc dương tính giả.

- Luôn kiểm tra hạn sử dụng của các kháng thể, nhất là với các kháng thể đã sử dụng còn dư từ lần nhuộm trước.

- Luôn kiểm tra đối chiếu kháng thể (trường hợp kháng thể nhỏ tay) và tên kháng thể trên nhãn tiêu bản tránh nhầm lẫn kháng thể.

### 5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Nếu mô chứng và mô bệnh âm tính giả, phải kiểm tra lại hạn dùng, nồng độ của toàn bộ hóa chất, kháng thể, nhiệt độ quá nóng, mô quá khô.

- Mô bị nhuộm nền do sử dụng nồng độ quá cao, mô cố định xấu, có nhiều hoại tử hoặc mẫu mô còn nhiều biotin nội sinh và peroxidase nội sinh.

- Lát cắt bị bong tróc, mất tính toàn vẹn sau nhuộm: cần thực hiện lại quy trình.

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Lát cắt mỏng đều, không trầy xước, đủ mặt cắt, bắt màu đúng ở chứng dương.

- Tuân thủ nghiêm ngặt quy trình nhuộm về nồng độ, thời gian của dung dịch.

- Thực hiện nội kiểm chất lượng: Theo quy định nội kiểm chất lượng.

- Thực hiện ngoại kiểm hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù: Theo quy định ngoại kiểm chất lượng. (Nếu có)

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Y tế (2014). Thông tư số 50/2014/TT-BYT ngày 26 tháng 12 năm 2014 quy định việc phân loại phẫu thuật, thủ thuật và định mức nhân lực trong từng ca phẫu thuật, thủ thuật.

Bộ Y tế (2017). Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh - Tế bào học. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

## 75. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG GIÁN TIẾP PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này giúp phát hiện kháng nguyên trên mẫu mô tươi dựa vào phản ứng kết hợp giữa kháng nguyên có trong mô và kháng thể thứ cấp có gắn chất phát quang.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kháng nguyên (KN) trong mô sẽ phản ứng với kháng thể (KT) sơ cấp đặc hiệu. Sau đó, phức hợp KN-KT kết hợp với KT thứ cấp đã gắn chất màu huỳnh quang (FITC fluorescence isothiocynate) có thể phát sáng màu xanh táo khi quan sát bằng kính hiển vi (KHV) huỳnh quang dưới ánh sáng của tia cực tím (ultraviolet light).

#### Chữ viết tắt

- FITC: Fluorescence isothiocynate
- HE: Hematoxylin Eosin.
- KN: Kháng nguyên
- KT: Kháng thể
- MDHQ: Miễn dịch huỳnh quang.
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- TBS: Dung dịch đệm duy trì pH (Tris-Buffered Saline)

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện: Nhân lực trực tiếp

Bác sĩ Giải phẫu bệnh:	01
Kỹ thuật y:	01
Hộ lý:	01

#### 2.2. Vật tư

##### 2.2.1. Hóa chất

Tên hóa chất	Đơn vị
Dung dịch pha loãng kháng thể	ml
Dung dịch đệm TBS (Wash Buffer) pH 7,4	ml
Dung dịch kháng thể 1	Test
Dung dịch kháng thể 2	Test
Nước cất 2 lần (hoặc nước RO)	ml
Dung dịch rửa (Reaction Bufer)	Test
Dung dịch dầu khoáng nhẹ (Lique coverslip LCS)	Test
Dung dịch rửa tối ưu (Opptional)	Test
Dung dịch rửa thứ cấp (SSC)	Test

Gel phủ mẫu tươi (cryomeric OCT)	ml
Xịt đông lạnh nhanh (ICE-IT)	ml
Nước muối sinh lý NaCl 0,9%	ml
Dung dịch gắn huỳnh quang (Fluorescence mounting medium)	ml
Dung dịch rửa tay	ml
Dung dịch khử khuẩn bề mặt	ml
Khử khuẩn Presept 2,5 gram	viên

#### 2.2.2. Dụng cụ

- Que tăm bệnh phẩm.
- Kẹp không máu các kích cỡ
- Giá để tiêu bản nằm, đứng.
- Bề nhuộm
- Pipet điện tử các loại
- Đầu col các loại
- Hộp nhựa đựng bệnh phẩm không gamma
- Ống bảo quản mẫu nắp vặn vô trùng 2ml
- Hộp nhựa đựng ống Cryo 1,5-2ml, 100 vị trí
- Chai code máy nhuộm đặc biệt (User fillabel reagent)
- Thùng đựng rác thải y tế (màu vàng)
- Thùng đựng rác thông thường (màu xanh).

#### 2.2.3. Vật tư tiêu hao

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính tích điện dương super frost.
- Lá kính (lamelle)
- Pipet nhựa
- Giấy nhôm (Aluminium)
- Bút mờ (dako pen)
- Hộp đựng rác thải sắc nhọn
- Găng tay không bột tan
- Khẩu trang, mũ, quần áo y tế.
- Bút chì, bút dạ dầu.
- Giấy A4
- Giấy in tem chống thấm nước, hóa chất
- Cuộn mực in tem

- Giấy thấm tiêu bản
- Giấy lau tay
- Túi đựng rác thải các loại.

### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy cắt lạnh
- Máy nhuộm đặc biệt
- Máy gắn lamelle tự động
- Kính hiển vi quang học
- Kính hiển vi soi nồng
- Kính hiển vi huỳnh quang
- Tủ hút mùi hóa chất
- Tủ đựng hóa chất chống cháy lan
- Tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất
- Tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2-8°C
- Tủ đông -20°C lưu trữ mẫu đông lạnh
- Máy in tem/nhãn
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm) và lưu trữ bệnh phẩm.
  - Hệ thống máy tính có phần mềm chuyên dụng kết nối kính huỳnh quang
  - Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26°C, đảm bảo an toàn sinh học
  - Phòng tối đọc tiêu bản huỳnh quang
  - Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại)
  - Máy lọc nước RO 2 lần
  - Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:**

- Bệnh phẩm là mẫu mô tươi (ví dụ: thận, da) sau khi sinh thiết và gửi ngay đến khoa GPB.
  - Bác sĩ GPB kiểm tra chất lượng, số lượng mẫu tươi dưới kính hiển vi soi nồng và phân chia mẫu cho nhuộm MDHQ. Mẫu được cố định trong dung dịch Cryomatrix ở nhiệt độ -23°C.
  - Cắt 01 tiêu bản dán trên lam thường theo quy trình cắt lạnh. Nhuộm HE cho mẫu sinh thiết lạnh để xác định hướng và thành phần của bệnh phẩm, đảm bảo mẫu đủ tiêu chuẩn nhuộm MDHQ.
  - Cắt mẫu bệnh và mẫu chứng âm, chứng dương thành các lát cắt mỏng, có độ dày 5µm dán trên lam kính super frost plus đã ghi nhãn. Số lượng và thứ tự các lát cắt theo quy định, tùy thuộc vào loại dấu ấn miễn dịch huỳnh quang.

- Dùng bút dạ dầu khoanh quanh vị trí lát cắt ở mặt dưới lam kính. Để khô 30 phút ở nhiệt độ phòng.

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.

- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, thời gian chỉ định, họ tên, chữ ký bác sĩ yêu cầu.

- Có ghi loại mẫu cần làm xét nghiệm (mẫu tươi), thời gian lấy mẫu và họ tên người lấy mẫu..

- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.

- Đổi chiểu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

Tổng thời gian ước tính: 120 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 24 giờ

- Thời gian nhuộm: 24 giờ

- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 72 giờ.

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật**

Các cơ sở xét nghiệm Giải phẫu bệnh có đầy đủ tiêu chuẩn.

## **3. AN TOÀN:**

Thực hiện quy định an toàn phòng xét nghiệm.

## **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **4.1 Các bước thực hiện**

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Rửa các tiêu bản trong dung dịch đệm TBS pH 7,4.	5 phút
2	Làm ráo tiêu bản, lau viền quanh bệnh phẩm, khoanh bút mờ quanh bệnh phẩm và chứng.	
3	Phủ kháng thể 1 trong phòng tối (máy nhuộm đặc biệt hoặc hộp giữ âm)	40 phút
4	Rửa tiêu bản trong dung dịch đệm TBS pH 7,4 lần 1 (phòng tối).	5 phút
5	Rửa tiêu bản trong dung dịch đệm TBS pH 7,4 lần 2 (phòng tối).	5 phút
6	Phủ tiêu bản với kháng thể 2 gắn FITC trong phòng tối (máy nhuộm đặc biệt hoặc hộp giữ âm)	30 phút

7	Rửa tiêu bản trong dung dịch đệm TBS pH 7,4 lần 1 (phòng tối).	5 phút
8	Rửa tiêu bản trong dung dịch đệm TBS pH 7,4 lần 2 (phòng tối).	5 phút
9	Để tiêu bản khô tự nhiên (phòng tối).	60 phút
10	Gắn lamelle bằng dung dịch gắn huỳnh quang	
11	Đánh giá chất lượng tiêu bản nhuộm	
12	Đặt tiêu bản trên khay bọc giấy nhôm Aluminium.	
13	Hoàn thiện và bàn giao tiêu bản	

#### 4.2. Nhận định kết quả

##### 4.2.1. Phân tích kết quả

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích, chụp ảnh nhuộm MDHQ trên tiêu bản dưới kính hiển vi huỳnh quang và hệ thống phần mềm chuyên dụng.

- Đánh giá tiêu bản nhuộm HE trên kính hiển vi quang học.
- Đánh giá tiêu bản nhuộm chứng âm và chứng dương:
  - + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.
  - + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.
    - + Tiêu chí đánh giá: Lắng đọng miễn dịch hiển thị bằng màu xanh táo sáng tại các vị trí trên mô. Mô nền không lắng đọng miễn dịch hiển thị bằng màu xanh nhạt đồng đều.
    - Đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh theo các tiêu chí:
      - + Loại dấu ấn miễn dịch
      - + Vị trí lắng đọng miễn dịch
      - + Kiểu hình: hạt (granular), đường (linear)
      - + Cường độ: Không (0), vết (0,5+), nhẹ (1+), vừa (2+), mạnh (3+), rất mạnh (4+).

##### 4.2.2. Báo cáo kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm

- Trả kết quả theo các quy trình liên quan. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

- Lưu mẫu tươi, tiêu bản và ảnh chụp MDHQ theo quy trình lưu và hủy bệnh phẩm Giải phẫu bệnh và theo thời gian quy định.

#### 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

##### 5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi

Nguyên nhân

Khắc phục- Phòng ngừa

Nhầm mău của BN này với BN khác	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Không đổi chiếu thông tin mău đang làm và dụng cụ đặt mău khi phẫu tích bệnh phẩm.</li> <li>- Đặt lát cắt của BN không đúng mã GPB.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra và thực hiện lại đúng (nếu có thể)</li> <li>- Thực hiện lần lượt đối với từng ca bệnh, đảm bảo kiểm tra, đổi chiếu thông tin BN ở mỗi bước.</li> </ul>
Sai mã GPB trên hệ thống phần mềm	Đánh nhầm mău GPB khi nhập chỉ định XN	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sửa lại đúng mã GPB</li> <li>- Cẩn thận khi nhập mă.</li> </ul>
Mău chứng âm bị nền	Mău bị khô trong quá trình ủ hoặc bị nhiễm chéo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra và thực hiện lại đúng.</li> <li>- Không để mău bị khô trong suốt quá trình thao tác. Thay đầu côn trước khi hút, pha chế hóa chất.</li> </ul>
Mău chứng dương bị âm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hóa chất hỏng</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra và thực hiện lại đúng.</li> <li>- Tuân thủ điều kiện bảo quản hóa chất, tránh rã đông nhiều lần. Pha lại hóa chất mới</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mău chứng không đạt tiêu chuẩn</li> <li>- Thực hiện không đúng các bước trong quy trình.</li> <li>- Tiêu bản nhuộm mất màu theo thời gian.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra lại mău chứng</li> <li>- Tuân thủ đúng theo quy trình kỹ thuật.</li> <li>- Đọc kết quả càng sớm càng tốt do phức hợp MDHQ sẽ bị mất màu theo thời gian.</li> </ul>

## 5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Nhầm loại dấu ấn (kháng thể)	Không phủ đúng loại kháng thể trên tiêu bản tương ứng với tên dấu ấn.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra và thực hiện lại đúng.</li> <li>- Đổi chiếu loại kháng thể và tên dấu ấn trên tiêu bản ở mỗi bước thực hiện</li> </ul>

Tiêu bản chỉ được nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm	- Còn bọt khí trên tiêu bản khi phủ hóa chất.  - Chỉ dùng lam kính thường  - Tiêu bản bị nghiêng hoặc để hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm.	- Kiểm tra và thực hiện lại đúng.  - Loại bỏ bọt khí  - Cắt mẫu trên lam tích diện dương có chất gắn.  - Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Tiêu bản luôn được để trong hệ thống kín gió.
- Tiêu bản bị mất mô	- Mẫu cắt mất mô do kỹ thuật cắt hoặc do máy cắt, dao cắt.  - Rửa quá mạnh làm bong, trôi bệnh phẩm	- Kiểm tra lại máy cắt, dao cắt  - Đảm bảo cắt hết mặt của bệnh phẩm  - Cắt lại nếu bệnh phẩm bị bong.
- Tiêu bản bị bóng nước	- Tiêu bản nhuộm chưa khô bóng nước	Để khô trước khi gắn lamelle.

### 5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Sai mã GPB trên tiêu bản	Lỗi sao chép thông tin mã (do ghi tay)	Sửa lại cho đúng
Bàn giao tiêu bản thiếu/ không ghi đúng quy trình vào sổ bàn giao	Nhân viên không tuân thủ thiếu/ không ghi đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bàn giao tiêu bản

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
  - + Sử dụng mẫu chứng âm và mẫu chứng dương đã được đánh giá chất lượng
  - + Nhuộm trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.1.
    - + Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
    - + Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
  - Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng (nếu có).

- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị
- Kiểm soát điều kiện môi trường
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/098/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
2. Bancroff JD, Gamble M (2008). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier 6<sup>th</sup> edition.
3. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD (2019). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier, 8th edition.

## 76. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG TRỰC TIẾP PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này giúp phát hiện kháng nguyên trên mẫu mô tươi dựa vào phản ứng kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên trong mô và kháng thể gắn chất phát quang.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kháng nguyên (KN) trong mô sẽ phản ứng với kháng thể (KT) đặc hiệu đã gắn chất màu huỳnh quang (FITC fluorescence isothiocyanate) có thể phát sáng màu xanh táo khi quan sát bằng kính hiển vi (KHV) huỳnh quang dưới ánh sáng của tia cực tím (ultraviolet light).

#### 1.3 Chữ viết tắt

- FITC: Fluorescence isothiocyanate
- HE: Hematoxylin Eosin.
- KN: Kháng nguyên
- KT: Kháng thể
- MDHQ: Miễn dịch huỳnh quang.
- TBS: Dung dịch đệm duy trì pH (Tris-Buffered Saline)

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện: Nhân lực trực tiếp

Bác sĩ Giải phẫu bệnh:	01
Kỹ thuật y:	01
Hộ lý:	01

#### 2.2. Vật tư

##### 2.2.1. Hóa chất

Tên hóa chất	Đơn vị
Dung dịch pha loãng kháng thể	ml
Dung dịch đệm TBS (Wash Buffer) pH 7,4	ml
Dung dịch kháng thể gắn huỳnh quang (FITC)	Test
Nước cất 2 lần (hoặc nước RO)	ml
Dung dịch rửa (Reaction Bufer)	Test
Dung dịch dầu khoáng nhẹ (Lique coverslip LCS)	Test
Dung dịch rửa tối ưu (Opptional)	Test
Dung dịch rửa thứ cấp (SSC)	Test
Gel phủ mẫu tươi (cryomartic OCT)	ml
Xịt đông lạnh nhanh (ICE-IT)	ml

Nước muối sinh lý NaCl 0,9%	
Dung dịch gắn huỳnh quang (Fluorescence mounting medium)	ml
Dung dịch rửa tay	ml
Dung dịch khử khuẩn bề mặt	ml
Khử khuẩn Presept 2,5 gram	viên

### 2.2.2. Dụng cụ

- Que tăm bệnh phẩm.
- Kẹp không máu các kích cỡ
- Giá để tiêu bản nằm, đứng.
- Bề nhuộm
- Pipet điện tử các loại
- Đầu col các loại
- Hộp nhựa đựng bệnh phẩm không gamma
- Ống bảo quản mẫu nắp vặn vô trùng 2ml
- Hộp nhựa đựng ống Cryo 1,5-2ml, 100 vị trí
- Chai code máy nhuộm đặc biệt (User fillabel reagent)
- Thùng đựng rác thải y tế (màu vàng)
- Thùng đựng rác thông thường (màu xanh).

### 2.2.3. Vật tư tiêu hao

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính tích điện dương super frost.
- Lá kính (lamelle)
- Pipet nhựa
- Giấy nhôm (Aluminium)
- Bút mờ (dako pen)
- Hộp đựng rác thải sắc nhọn
- Găng tay không bột tan
- Khẩu trang, mũ, quần áo y tế.
- Bút chì, bút dạ dầu.
- Giấy A4
- Giấy in tem chống thấm nước, hóa chất
- Cuộn mực in tem
- Giấy thấm tiêu bản
- Giấy lau tay

- Túi đựng rác thải các loại.

### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy cắt lạnh
- Máy nhuộm đặc biệt
- Máy gắn lamelle tự động
- Kính hiển vi quang học
- Kính hiển vi soi nỗi
- Kính hiển vi huỳnh quang
- Tủ hút mùi hóa chất
- Tủ đựng hóa chất chống cháy lan
- Tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất
- Tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2-8°C
- Tủ đông -20°C lưu trữ mẫu đông lạnh
- Máy in tem/nhãn
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm) và lưu trữ bệnh phẩm.
  - Hệ thống máy tính có phần mềm chuyên dụng kết nối kính huỳnh quang
  - Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26°C, đảm bảo an toàn sinh học
  - Phòng tối đọc tiêu bản huỳnh quang
  - Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại)
  - Máy lọc nước RO 2 lần
  - Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:**

- Bệnh phẩm là mẫu mô tươi (ví dụ: thận, da) sau khi sinh thiết và gửi ngay đến khoa GPB.
  - Tùy vào loại mô, bác sĩ GPB kiểm tra chất lượng mẫu tươi dưới kính hiển vi soi nỗi (đúng loại mô, đủ độ lớn) và phân chia mẫu cho nhuộm MDHQ. Mẫu được cố định trong dung dịch Cryomatrix ở nhiệt độ -23°C.
  - Cắt 01 tiêu bản dán trên lam thường theo quy trình cắt lạnh. Nhuộm HE cho mẫu sinh thiết lạnh để xác định hướng và thành phần của bệnh phẩm, đảm bảo mẫu đủ tiêu chuẩn nhuộm MDHQ.
    - Cắt mẫu bệnh và mẫu chứng âm, chứng dương thành các lát cắt mỏng, có độ dày 5µm dán trên lam kính super frost plus đã ghi nhãn. Số lượng và thứ tự các lát cắt theo quy định, tùy thuộc vào loại dấu ấn miễn dịch huỳnh quang.
    - Dùng bút dạ dầu khoanh quanh vị trí lát cắt ở mặt dưới lam kính. Để khô 30 phút ở nhiệt độ phòng.

## 2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.
- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, thời gian chỉ định, họ tên, chữ ký bác sĩ yêu cầu.
- Có ghi loại mẫu cần làm xét nghiệm (mẫu tươi), thời gian lấy mẫu và họ tên người lấy mẫu.
- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đổi chiểu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

## 2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:

Tổng thời gian ước tính: 120 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 24 giờ
- Thời gian nhuộm: 24 giờ
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 72 giờ.

## 2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Các cơ sở xét nghiệm Giải phẫu bệnh có đầy đủ tiêu chuẩn.

## 3. AN TOÀN:

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của từng phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.
- Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT
  - Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
  - Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
  - Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

## 4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 4.1. Các bước thực hiện

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Rửa các tiêu bản trong dung dịch đệm TBS pH 7,4.	5 phút
2	Làm ráo tiêu bản, lau viền quanh bệnh phẩm, khoanh bút mờ quanh bệnh phẩm và chứng.	
3	Phủ kháng thể gắn FITC lên mẫu bệnh phẩm trong phòng tối (máy nhuộm đặc biệt hoặc hộp giữ ấm)	40 phút
4	Rửa tiêu bản trong dung dịch đệm TBS pH 7,4 lần 1 (phòng tối).	5 phút

5	Rửa tiêu bản trong dung dịch đệm TBS pH 7,4 lần 2 (phòng tối).	5 phút
6	Để tiêu bản khô tự nhiên (phòng tối).	60 phút
7	Gắn lamelle bằng dung dịch gắn huỳnh quang	
8	Đánh giá chất lượng tiêu bản nhuộm	
9	Đặt tiêu bản trên khay bọc giấy nhôm Aluminium.	
10	Hoàn thiện và bàn giao tiêu bản	

## 4.2. Nhận định kết quả

### 4.2.1. Phân tích kết quả

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích, chụp ảnh nhuộm MDHQ trên tiêu bản dưới kính hiển vi huỳnh quang và hệ thống phần mềm chuyên dụng.

- Đánh giá tiêu bản nhuộm HE trên kính hiển vi quang học.
- Đánh giá tiêu bản nhuộm chứng âm và chứng dương:
  - + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.
  - + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.
  - + Tiêu chí đánh giá: Lắng đọng miễn dịch hiển thị bằng màu xanh táo sáng tại các vị trí trên mô. Mô nền không lắng đọng miễn dịch hiển thị bằng màu xanh nhạt đồng đều.

- Đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh theo các tiêu chí:
  - + Loại dấu ẩn miễn dịch
  - + Vị trí lắng đọng miễn dịch
  - + Kiểu hình: hạt (granular), đường (linear)
  - + Cường độ: Không (0), vết (0,5+), nhẹ (1+), vừa (2+), mạnh (3+), rất mạnh (4+).

### 4.2.2 Báo cáo kết quả xét nghiệm và lưu trữ

- Trả kết quả theo các quy trình liên quan. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

- Lưu mẫu tươi, tiêu bản và ảnh chụp MDHQ theo quy trình lưu và hủy bệnh phẩm Giải phẫu bệnh và theo thời gian quy định.

## 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

### 5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Tên lối	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
---------	-------------	-----------------------

Nhầm mẫm của BN này với BN khác	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Không đổi chiếu thông tin mẫm đang làm và dụng cụ đặt mẫm khi phẫu tích bệnh phẩm.</li> <li>- Đặt lát cắt của BN không đúng mã GPB.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra và thực hiện lại đúng (nếu có thể)</li> <li>- Thực hiện lần lượt đổi với từng ca bệnh, đảm bảo kiểm tra, đổi chiếu thông tin BN ở mỗi bước.</li> </ul>
Sai mã GPB trên hệ thống phần mềm	Đánh nhầm mã GPB khi nhập chỉ định XN	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sửa lại đúng mã GPB</li> <li>- Cẩn thận khi nhập mã.</li> </ul>
Mẫu chứng âm bị nền	Mẫu bị khô trong quá trình ủ hoặc bị nhiễm chéo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra và thực hiện lại đúng.</li> <li>- Không để mẫu bị khô trong suốt quá trình thao tác. Thay đầu côn trước khi hút, pha chế hóa chất.</li> <li>- Kiểm tra và thực hiện lại đúng.</li> </ul>
Mẫu chứng dương bị âm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hóa chất hỏng</li> <li>- Mẫu chứng không đạt tiêu chuẩn</li> <li>- Thực hiện không đúng các bước trong quy trình.</li> <li>- Tiêu bản nhuộm mất màu theo thời gian.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tuân thủ điều kiện bảo quản hóa chất, tránh rã đông nhiều lần. Pha lại hóa chất mới</li> <li>- Kiểm tra lại mẫu chứng</li> <li>- Tuân thủ đúng theo quy trình kỹ thuật.</li> <li>- Đọc kết quả càng sớm càng tốt do phức hợp MDHQ sẽ bị mất màu theo thời gian.</li> </ul>

## 5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Nhầm loại dấu ấn (kháng thể)	Không phủ đúng loại kháng thể trên tiêu bản tương ứng với tên dấu ấn.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra và thực hiện lại đúng.</li> <li>- Đổi chiếu loại kháng thể và tên dấu ấn trên tiêu bản ở mỗi bước thực hiện</li> </ul>

Tiêu bản chỉ được nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Còn bọt khí trên tiêu bản khi phủ hóa chất.</li> <li>- Chỉ dùng lam kính thường</li> <li>- Tiêu bản bị nghiêng hoặc để hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuộc nhuộm.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra và thực hiện lại đúng.</li> <li>- Loại bỏ bọt khí</li> <li>- Cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn.</li> <li>- Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Tiêu bản luôn được để trong hệ thống kín gió.</li> </ul>
- Tiêu bản bị mất mô	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mẫu cắt mất mô do kỹ thuật cắt hoặc do máy cắt, dao cắt.</li> <li>- Rửa quá mạnh làm bong, trôi bệnh phẩm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kiểm tra lại máy cắt, dao cắt</li> <li>- Đảm bảo cắt hết mặt của bệnh phẩm</li> <li>- Cắt lại nếu bệnh phẩm bị bong.</li> </ul>
- Tiêu bản bị bóng nước	- Tiêu bản nhuộm chưa khô	Để khô trước khi gắn lamelle.

### 5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Sai mã GPB trên tiêu bản	Lỗi sao chép thông tin mã (do ghi tay)	Sửa lại cho đúng
Bàn giao tiêu bản thiếu/ không ghi đúng quy trình vào sổ bàn giao	Nhân viên không tuân thủ thiếu/ không ghi đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bàn giao tiêu bản

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
  - + Sử dụng mẫu chứng âm và mẫu chứng dương đã được đánh giá chất lượng
  - + Nhuộm trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.1.
  - + Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
  - + Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.

- Thực hiện ngoại kiêm (nếu có): theo chương trình ngoại kiêm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng.

- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị

- Kiểm soát điều kiện môi trường

- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ Y tế Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tế bào học

2. Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/09/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.

3. Bancroff JD, Gamble M (2008). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier 6<sup>th</sup> edition.

4. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD (2019). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier, 8th edition.

## 77. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG GIÁN TIẾP PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Là kỹ thuật phát hiện kháng thể trong máu bệnh nhân bệnh da bọng nước tự miễn bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp.

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang cũng tương tự kỹ thuật hoá mô miễn dịch: có sự kết hợp giữa kỹ thuật mô bệnh học và kỹ thuật miễn dịch học, nhưng sự khác biệt là: trong miễn dịch huỳnh quang, chất đánh dấu là các kháng nguyên được gắn với một chất nhuộm huỳnh quang (fluorochrome) có đặc tính phát quang dưới kích thích của nguồn sáng là tia cực tím. Trong phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp, trên các mảnh cắt là các kháng nguyên đã biết. Nhỏ lên các mảnh cắt một giọt huyết thanh Người bệnh (đã pha loãng theo yêu cầu của từng trường hợp chẩn đoán). Nếu trong huyết thanh Người bệnh có kháng thể tương ứng với kháng nguyên ở các mảnh cắt thì phức hợp kháng nguyên - kháng thể sẽ hình thành. Phức hợp này có thể phát hiện được nếu nhỏ lên trên đó một giọt globulin kháng globulin huỳnh quang (kháng người). Vì vậy, khi kháng nguyên bắt màu huỳnh quang có nghĩa là trong huyết thanh Người bệnh có kháng thể.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01
- Kỹ thuật y: 01

#### **2.2. Vật tư:**

- Dung dịch đệm photphat PH 7,2.
- Huyết thanh người bệnh.
- Da bìu người bệnh không bị bệnh miễn dịch.
- Kháng kháng thể huỳnh quang

#### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy cắt lạnh đang ở trạng thái hoạt động.
- Dao sắc, thớt nhựa sạch, phẳng.
- Bộ dụng cụ phẫu tích bệnh phẩm.
- Phiến kính, lá kính sạch.
- Bút chì mềm (để ghi tên tuổi người bệnh, mã số tiêu bản trên phiến kính).
- Giấy thấm, gạc sạch.

- Găng tay, khẩu trang, mũ, kính bảo vệ mắt và quần áo bảo hộ.
- Chổi lông mềm.
- Gel cắt lạnh.
- Cồn tuyệt đối.
- Giá đựng tiêu bản (đứng và nằm ngang).
- Kẹp không mấu, kéo.
- Giấy lọc.
- Lam kính, lamen
- Kính hiển vi 2 mắt để kiểm tra kết quả nhuộm.
- Kính phòng hộ, găng tay các loại.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Lấy bệnh phẩm:

Việc lấy mẫu được thực hiện bởi khoa HS-HH-MD và gửi mẫu máu về khoa Giải phẫu bệnh.

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật :** 2 giờ 30 phút.

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Labo giải phẫu bệnh.

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện:**

Mảnh da thân dương vật, của bệnh nhân không bị bệnh miễn dịch (chưa cố định) được tiến hành cắt lạnh theo qui trình cắt lạnh bệnh phẩm.

- Cắt các lát mỏng, có độ dày 4-5 $\mu$ m dàn ra lam.
- Ngâm lam bằng dung dịch đệm photphat PH 7,2 trong 5 phút x 3 lần
- Ly tâm máu Người bệnh lấy huyết thanh
- Kháng huyết thanh pha tỷ lệ 1/10 với PBS PH 7,2.
- Nhỏ lên các mảnh cắt đã được cố định trên phiến kính 1-3 giọt kháng huyết thanh đã pha loãng, để 45 phút trong một hộp ấm, kín, ở nhiệt độ 37°C.
- Đỗ huyết thanh thừa đi rồi tráng kỹ và nhẹ nhàng bằng dung dịch đệm PBS PH 7,2.
- Ngâm bằng dung dịch đệm photphat PH 7,2 trong 5 phút x 3 lần.

- Để ráo nước ở nhiệt độ thường.
- Khi các mảnh cắt còn hơi ẩm, nhỏ lên một giọt kháng kháng thể huỳnh quang IgG pha theo tỉ lệ của hãng để 45 phút trong hộp ẩm, tối màu ở 37°C.
- Đỗ kháng kháng thể huỳnh quang thửa đi, tráng kỹ.
- Ngâm bằng dung dịch đệm photphat PH 7,2 trong 5 phút x 3 lần.
- Để ráo nước ở nhiệt độ thường, khi các mảnh cắt còn hơi ẩm, nhỏ lên một giọt Mouting gắn lamen.
- Kết quả

Kháng thể cần phát hiện có màu xanh lá cây xem có lăng đọng khoảng gian bào, màng đáy lớp thượng bì hay trung bì.

#### **4.2. Nhận định kết quả**

- Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi huỳnh quang bởi Bác sĩ Giải phẫu bệnh, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

- Trả kết quả và các thông tin về bệnh nhân, kết quả xét nghiệm được lưu giữ trong hệ thống phần mềm His bệnh viện.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Tiêu bản cắt ở độ dày 4-5µm
- Tiêu bản bị nhuộm nền: thời gian ủ với kháng thể quá lâu hoặc pha không đúng tỉ lệ...
- Tiêu bản bị âm tính giả: hạn sử dụng hóa chất, thời gian ủ với kháng thể không đủ...
- Khi phủ kháng thể lên bệnh phẩm phải đậy tiêu bản trong buồng kín và tối màu.
- Để hộp kín trong ngăn mát tủ lạnh bảo quản được 1 tuần.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

Đảm bảo chất lượng xét nghiệm, đánh giá của Bác sĩ Giải phẫu bệnh.

- Thực hiện nội kiểm nhuộm MDHQGT: phải có chứng (+) và chứng (-).
- Nếu khi đọc tiêu bản nhuộm MDHQGT chứng (+) và chứng (-) không đạt thì phải nhuộm lại tiêu bản.
  - Kích thước bệnh phẩm trên tiêu bản tương đương bệnh phẩm lúc tươi.
  - Cấu trúc mô và tế bào được giữ nguyên giống bệnh phẩm lúc tươi.
  - Tiêu bản không gấp, không xước rách, không mất mô.
  - Tiêu bản trong, sạch, không thửa thiếu Bôm gắn lamen
  - Không có bọt khí, bọt nước trên tiêu bản.
  - Mã tiêu bản đẹp, bệnh phẩm đặt đúng vị trí tiêu bản

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kỹ thuật xét nghiệm Y học xuất bản năm 1999.
2. Bài giảng Y khoa xuất bản năm 2001.
3. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh chuyên ngành giải phẫu bệnh – Té bào bệnh học – Bộ Y tế năm 2013.

## 78. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG TRỰC TIẾP CHO BỘ 6 KHÁNG THỂ

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Mô tả, hướng dẫn cách thực hiện và chẩn đoán mô bệnh học bằng phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên, bộ 6 kháng thể IgA, IgG, IgM, C3c, C4c, C1q.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang bộ 6 kháng thể bản chất là kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên, cũng tương tự kỹ thuật hoá mô miễn dịch: có sự kết hợp giữa kỹ thuật mô bệnh học với kỹ thuật miễn dịch học, nhưng sự khác biệt là: trong miễn dịch huỳnh quang, chất đánh dấu là các kháng thể được gắn với một chất nhuộm huỳnh quang (fluorochrome) có đặc tính phát quang dưới kích thích của nguồn sáng là tia cực tím. Trong phương pháp miễn dịch huỳnh quang trực tiếp, muốn phát hiện mỗi kháng nguyên lại cần có một kháng thể huỳnh quang tương ứng.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01
- Kỹ thuật y: 01
- Hộ lý: 01

#### 2.2. Hóa chất, Vật tư:

Các hóa chất để thực hiện nhuộm miễn dịch huỳnh quang: Kháng thể huỳnh quang bộ 6 marker IgA, IgG, IgM, C3c, C4c, C1q; keo gắn lamen; dung dịch rửa, bể nhuộm, khuôn nhựa, giá đựng tiêu bản, lam kính, lamen...

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt lạnh.
- Máy đo độ pH điện tử.
- Máy chuyển bệnh phẩm tự động.
- Máy đúc khói parafin.
- Bàn hơ dùng điện.
- Máy cắt lát mỏng (microtome).
- Lưỡi dao cắt lát mỏng.
- Tủ ấm 37<sup>0</sup> và 56<sup>0</sup>.
- Tủ lạnh.
- Điều hòa nhiệt độ.
- Tủ hót phòng thí nghiệm.

- Kính hiển vi quang học kiểm tra mô.
- Kính hiển vi huỳnh quang kết hợp hệ thống máy tính và phần mềm chụp ảnh.
- Kính phòng hộ, găng tay các loại.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

Bệnh phẩm tươi (chưa cố định bởi dung dịch cố định) được tiến hành cắt lạnh theo quy trình cắt lạnh bệnh phẩm.

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 120 phút.**

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Phòng xét nghiệm giải phẫu bệnh.

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện đúng tiêu chuẩn an toàn phòng xét nghiệm.

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện**

- Điều kiện thực hiện kỹ thuật: Trong môi trường ánh sáng yếu.
- Cắt các lát mỏng, có độ dày 5 -6 µm.
- Kháng thể huỳnh quang đã pha theo khuyến cáo của hãng sản xuất.
- Nhỏ lên các mảnh cắt đã được cố định trên phiến kính từ 1-3 giọt kháng thể huỳnh quang đã pha loãng, để 30 phút trong một bể ủ ấm, kín, ở nhiệt độ phòng 25 - 27 °C.
- Đỗ kháng thể huỳnh quang thừa đi rồi tráng kỹ và nhẹ nhàng bằng dung dịch đệm pH 7,2 – 7,6.
  - Ngâm bằng dung dịch đệm pH 7,2 – 7,6 trong 30 phút x 2 lần.
  - Để ráo nước ở nhiệt độ thường.
  - Khi các mảnh cắt còn hơi ẩm, nhỏ lên một giọt glycerin đệm photphat 1%, đầy bằng lá kính. Gắn xung quanh lá kính bằng parafin hoặc bằng bất cứ loại nhựa nào, đảm bảo không làm khô mảnh cắt.

Ví dụ: muốn phát hiện virus dại trong bệnh phẩm mô não người hoặc não súc vật, lấy bệnh phẩm làm phiến đồ hoặc làm các mảnh cắt lạnh và cố định cồn + ete hoặc bằng aceton. Nhỏ lên phiến kính một giọt globulin của kháng huyết thanh kháng virus dại đã đánh dấu bằng thuốc nhuộm huỳnh quang. Trường hợp dương tính, sẽ thấy rõ các tiểu thể Negri trong tế bào thần kinh bắt huỳnh quang màu xanh lục.

- Kết quả: Kháng nguyên cần phát hiện có màu xanh lục.

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi huỳnh quang

bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Mảnh cắt nên được cắt ở độ dày 5-6 $\mu$ m
- Tiêu bản bị nhuộm nền: thời gian ủ với kháng thể quá lâu hoặc pha không đúng tỉ lệ...
- Tiêu bản bị âm tính giả: hạn sử dụng hóa chất, thời gian ủ với kháng thể không đủ...

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

Đảm bảo chất lượng xét nghiệm theo quy định Bộ Y Tế

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Dey P. Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology. Springer; 2018.
2. Robert Lott, Janet Tunnicliffe, Elizabeth Sheppard. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. Version 9.0. College of American Pathologists; 2020.
3. Specimen Collection & Transport Guide. Quest Diagnostic; 2018.

## 79. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG GIÁN TIẾP ĐỊNH LƯỢNG HIỆU GIÁ KHÁNG THỂ

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Là kỹ thuật phát hiện bán định lượng nồng độ kháng thể, giúp chẩn đoán theo dõi và tiên lượng bệnh trong máu bệnh nhân bệnh da bọng nước tự miễn

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang cũng tương tự kỹ thuật hoá mô miễn dịch: có sự kết hợp giữa kỹ thuật mô bệnh học và kỹ thuật miễn dịch học, nhưng sự khác biệt là: trong miễn dịch huỳnh quang, chất đánh dấu là các kháng nguyên được gắn với một chất nhuộm huỳnh quang (fluorochrome) có đặc tính phát quang dưới kích thích của nguồn sáng là tia cực tím. Trong phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp, trên các mảnh cắt là các kháng nguyên đã biết. Nhỏ lên các mảnh cắt một giọt huyết thanh Người bệnh (đã pha loãng theo yêu cầu của từng trường hợp chẩn đoán). Nếu trong huyết thanh Người bệnh có kháng thể tương ứng với kháng nguyên ở các mảnh cắt thì phức hợp kháng nguyên - kháng thể sẽ hình thành. Phức hợp này có thể phát hiện được nếu nhỏ lên trên đó một giọt globulin kháng globulin huỳnh quang (kháng người). Vì vậy, khi kháng nguyên bắt màu huỳnh quang có nghĩa là trong huyết thanh Người bệnh có kháng thể.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01
- Kỹ thuật y: 01

#### 2.2. Vật tư:

- Dung dịch đệm photphat PH 7,2.
- Kháng kháng thể huỳnh quang

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt lạnh đang ở trạng thái hoạt động.
- Dao sắc, thớt nhựa sạch, phẳng.
- Bộ dụng cụ phẫu tích bệnh phẩm.
- Phiến kính, lá kính sạch.
- Bút chì mềm (để ghi tên tuổi người bệnh, mã số tiêu bản trên phiến kính).
- Giấy thám, gạc sạch.
- Găng tay, khẩu trang, mũ, kính bảo vệ mắt và quần áo bảo hộ.
- Chổi lông mềm.

- Gel cắt lạnh.
- Cồn tuyệt đối.
- Giá đựng tiêu bản (đứng và nằm ngang).
- Kẹp không mâu, kéo.
- Giấy lọc.
- Lam kính, lamen
- Kính hiển vi 2 mắt để kiểm tra kết quả nhuộm.
- Kính phòng hộ, găng tay các loại.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Huyết thanh người bệnh.
- Da bìu người bệnh không bị bệnh miễn dịch.

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 2 giờ 30 phút**

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Labo giải phẫu bệnh.

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện các quy định của Bộ Y tế, bệnh viện và khoa phòng về các vấn đề:

- Quy định về an toàn cho người thực hiện và dự phòng nguy cơ trước, trong và sau phơi nhiễm.
- Quy định hiệu chuẩn vật tư, thiết bị
- Quy định về an toàn điện và phòng tránh cháy nổ
- Quy định về an toàn hóa chất: có bảng chỉ dẫn an toàn từng loại hóa chất
- Quy định kiểm soát môi trường: đánh giá các yếu tố vi khí hậu như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, tiếng ồn... theo quy trình GPB-QTQL-12.1;
- Quy định về an toàn sinh học, theo quy trình GPB-QTQL-12.2;

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện:**

Bệnh phẩm da thân dương vật, của bệnh nhân không bị bệnh miễn dịch (chưa cố định) được tiến hành cắt lạnh theo qui trình cắt lạnh bệnh phẩm.

- Cắt các lát mỏng, có độ dày 4-5 $\mu$ m dàn ra lam.
- Ngâm lam bằng dung dịch đệm photphat PH 7,2 trong 5 phút x 3 lần
- Kháng huyết thanh pha loãng theo tỷ lệ là 1/10, 1/20, 1/40, 1/80... với PBS PH 7,2.

- Nhỏ lên các mảnh cắt đã được cố định trên phiến kính 1-3 giọt kháng huyết thanh đã pha loãng để 45 phút trong một hộp âm, kín, ở nhiệt độ 37°C.
- Đỗ huyết thanh thừa đi rồi tráng kỹ và nhẹ nhàng bằng dung dịch đậm PBS PH 7,2.
- Ngâm bằng dung dịch đậm photphat PH 7,2 trong 5 phút x 3 lần.
- Để ráo nước ở nhiệt độ thường.
- Khi các mảnh cắt còn hơi ẩm, nhỏ lên một giọt kháng kháng thể huỳnh quang IgG pha theo tỉ lệ của hãng để 45 phút trong hộp âm, tối màu ở 37°C.
- Đỗ kháng kháng thể huỳnh quang thừa đi, tráng kỹ.
- Ngâm bằng dung dịch đậm photphat PH 7,2 trong 5 phút x 3 lần.
- Để ráo nước ở nhiệt độ thường, khi các mảnh cắt còn hơi ẩm, nhỏ lên một giọt Mouting gắn lamen.
- Kết quả

Kháng thể cần phát hiện có màu xanh lá cây xem có lăng đọng khoảng gian bào, màng đáy lớp thượng bì hay trung bì.

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi huỳnh quang bởi Bác sĩ Giải phẫu bệnh, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

- Trả kết quả và các thông tin về bệnh nhân, kết quả xét nghiệm được lưu giữ trong hệ thống phần mềm His bệnh viện.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Tiêu bản cắt ở độ dày 4-5µm
- Tiêu bản bị nhuộm nền: thời gian ủ với kháng thể quá lâu hoặc pha không đúng tỉ lệ...
- Tiêu bản bị âm tính giả: hạn sử dụng hóa chất, thời gian ủ với kháng thể không đủ...
- Khi phủ kháng thể lên bệnh phẩm phải đậy tiêu bản trong buồng kín và tối màu.
- Để hộp kín trong ngăn mát tủ lạnh bảo quản được 1 tuần.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

Đảm bảo chất lượng xét nghiệm, đánh giá của Bác sĩ Giải phẫu bệnh.

- Thực hiện nội kiểm nhuộm MDHQGT: phải có chứng (+) và chứng (-).
- Nếu khi đọc tiêu bản nhuộm MDHQGT chứng (+) và chứng (-) không đạt thì phải nhuộm lại tiêu bản.
- Kích thước bệnh phẩm trên tiêu bản tương đương bệnh phẩm lúc tươi.
- Cấu trúc mô và tế bào được giữ nguyên giống bệnh phẩm lúc tươi.
- Tiêu bản không gấp, không xước rách, không mất mô.

-Tiêu bản trong, sạch, không thừa thiếu Bôm gắn lamen

- Không có bọt khí, bọt nước trên tiêu bản.

- Mă tiêu bản đẹp, bệnh phẩm đặt đúng vị trí tiêu bản

## **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Kỹ thuật xét nghiệm Y học xuất bản năm 1999.

- Bài giảng Y khoa xuất bản năm 2001.

- Hướng dẫn quy trình kỹ thuật khám bệnh, chữa bệnh chuyên ngành giải phẫu  
bệnh – Té bào bệnh học – Bộ Y tế năm 2013.

## **80. XÉT NGHIỆM VÀ CHẨN ĐOÁN MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG GIÁN TIẾP TÁCH MUỐI PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ**

### **1. ĐẠI CƯƠNG**

#### **1.1. Mục đích của kỹ thuật**

Là kỹ thuật phát hiện kháng thể trong máu để chẩn đoán phân biệt bệnh Pemphigoid và ly thượng bì mắc phải bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp tách muối (Salt split skin).

#### **1.2. Định nghĩa, nguyên lý**

Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang cũng tương tự kỹ thuật hoá mô miễn dịch: có sự kết hợp giữa kỹ thuật mô bệnh học và kỹ thuật miễn dịch học, nhưng sự khác biệt là: trong miễn dịch huỳnh quang, chất đánh dấu là các kháng nguyên được gắn với một chất nhuộm huỳnh quang (fluorochrome) có đặc tính phát quang dưới kích thích của nguồn sáng là tia cực tím. Trong phương pháp nhuộm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp, trên các mảnh cắt là các kháng nguyên đã biết. Nhỏ lên các mảnh cắt một giọt huyết thanh Người bệnh (đã pha loãng theo yêu cầu của từng trường hợp chẩn đoán). Nếu trong huyết thanh Người bệnh có kháng thể tương ứng với kháng nguyên ở các mảnh cắt thì phức hợp kháng nguyên - kháng thể sẽ hình thành. Phức hợp này có thể phát hiện được nếu nhỏ lên trên đó một giọt globulin kháng globulin huỳnh quang (kháng người). Vì vậy, khi kháng nguyên bắt màu huỳnh quang có nghĩa là trong huyết thanh Người bệnh có kháng thể.

### **2. CHUẨN BỊ**

#### **2.1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01
- Kỹ thuật viên Giải phẫu bệnh: 01

#### **2.2. Vật tư:**

- Nước muối bão hòa
- Dung dịch đệm photphat PH 7,2.
- Kháng kháng thể huỳnh quang.

#### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy cắt lạnh đang ở trạng thái hoạt động.
- Dao sắc, thớt nhựa sạch, phẳng.
- Bộ dụng cụ phẫu tích bệnh phẩm.
- Phiến kính, lá kính sạch.
- Bút chì mềm (để ghi tên tuổi người bệnh, mã số tiêu bản trên phiến kính).
- Giấy thấm, gạc sạch.
- Găng tay, khẩu trang, mũ, kính bảo vệ mắt và quần áo bảo hộ.

- Chổi lông mềm.
- Gel cắt lạnh.
- Cồn tuyệt đối.
- Giá đựng tiêu bản (đứng và nằm ngang).
- Kẹp không mâu, kéo.
- Giấy lọc.
- Lam kính, lamen
- Kính hiển vi 2 mắt để kiểm tra kết quả nhuộm.
- Kính phòng hộ, găng tay các loại.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Huyết thanh người bệnh.
- Da bệnh nhân không bị bệnh miễn dịch

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

**2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 2 giờ 30 phút**

**2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật :** Labo giải phẫu bệnh.

### **3. AN TOÀN**

Thực hiện các quy định của Bộ Y tế.

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Các bước thực hiện:**

Bệnh phẩm tươi (chưa cố định) được ngâm vào nước muối bão hòa 24 - 72 giờ sau đó tiến hành cắt lạnh theo qui trình cắt lạnh bệnh phẩm.

- Cắt các lát mỏng, có độ dày 4-5µm dàn ra lam.
- Ngâm lam bằng dung dịch đệm photphat PH 7,2 trong 5 phút x 3 lần
- Ly tâm máu Người bệnh lấy huyết thanh
- Kháng huyết thanh pha tỷ lệ 1/10 với PBS PH 7,2.
- Nhỏ lên các mảnh cắt đã được cố định trên phiến kính 1-3 giọt kháng huyết thanh đã pha loãng, để 45 phút trong một hộp ấm, kín, ở nhiệt độ 37°C.
- Đỗ huyết thanh thừa đi rồi tráng kỹ và nhẹ nhàng bằng dung dịch đệm PBS PH 7,2.
- Ngâm bằng dung dịch đệm photphat PH 7,2 trong 5 phút x 3 lần.
- Để ráo nước ở nhiệt độ thường.

- Khi các mảnh cắt còn hơi ẩm, nhô lên một giọt kháng thể huỳnh quang IgG pha theo tỉ lệ của hãng để 45 phút trong hộp ẩm, tối màu ở  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Đỗ kháng kháng thể huỳnh quang thừa đi, tráng kỹ.
- Ngâm bằng dung dịch đệm photphat PH 7,2 trong 5 phút x 3 lần.
- Để ráo nước ở nhiệt độ thường, khi các mảnh cắt còn hơi ẩm, nhô lên một giọt Mouting gắn lamen.
- Kết quả: Kháng thể cần phát hiện có màu xanh lá cây xem có lăng đọng màng dày lớp thượng bì hay trung bì.

#### **4.2. Nhận định kết quả**

Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi huỳnh quang bởi Bác sĩ Giải phẫu bệnh, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh...

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

- Trả kết quả và các thông tin về bệnh nhân, kết quả xét nghiệm được lưu giữ trong hệ thống phần mềm His bệnh viện.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Tiêu bản cắt ở độ dày  $4-5\mu\text{m}$
- Tiêu bản nhuộm nền: thời gian ủ với kháng thể quá lâu hoặc pha không đúng tỉ lệ...
- Tiêu bản âm tính giả: hạn sử dụng hóa chất, thời gian ủ với kháng thể không đủ...
- Khi phủ kháng thể lên bệnh phẩm phải đợi tiêu bản trong buồng kín và tối màu.
- Để hộp kín trong ngăn mát tủ lạnh bảo quản được 1 tuần.

### **6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG**

Đảm bảo chất lượng xét nghiệm, đánh giá của Bác sĩ Giải phẫu bệnh.

- Thực hiện nội kiểm nhuộm MDHQGT: phải có chứng (+) và chứng (-).
- Nếu khi đọc tiêu bản nhuộm MDHQGT chứng (+) và chứng (-) không đạt thì phải nhuộm lại tiêu bản.
- Kích thước bệnh phẩm trên tiêu bản tương đương bệnh phẩm lúc tươi.
- Cấu trúc mô và tế bào được giữ nguyên giống bệnh phẩm lúc tươi.
- Tiêu bản không gấp, không xước rách, không mất mô.
- Tiêu bản trong, sạch, không thừa thiếu Bôm gắn lamen
- Không có bọt khí, bọt nước trên tiêu bản.
- Mã tiêu bản đẹp, bệnh phẩm đặt đúng vị trí tiêu bản

### **7. TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Kỹ thuật xét nghiệm Y học xuất bản năm 1999.
- Bài giảng Y khoa xuất bản năm 2001.

## 81. XÉT NGHIỆM BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI TẠI CHỖ GẮN BẠC HAI MÀU (DUAL-ISH)

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Phát hiện trình tự axit nucleic đặc hiệu (DNA/RNA) bằng sử dụng đầu dò axit nucleic bổ sung (probe) được đánh dấu. Quan sát tế bào hoặc mô (tại chỗ) trên lam kính bằng kính hiển vi quang.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

- Phát hiện trình tự axit nucleic cụ thể (DNA/RNA), Phát hiện các bất thường về số lượng nhiễm sắc thể (các dị tật bẩm sinh hoặc mắc phải)

- Phương pháp nhuộm lai tại chỗ (ISH) nhìn chung cho phép nhận diện được các trình tự DNA hoặc RNA đích nhờ phương pháp lai lần lượt: mẫu dò của DNA hoặc RNA được đánh dấu với trình tự đích, một kháng thể sơ cấp gắn được với mẫu dò được đánh dấu, một kháng thể thứ cấp gắn với kháng thể sơ cấp, một phức hợp enzyme và một cơ chất tạo màu và các bước rửa xen kẽ trong quá trình nhuộm. Sự hoạt hóa enzyme bởi chất tạo màu tạo thành sản phẩm phản ứng có màu tại vị trí đích. Mẫu thử sau đó có thể được nhuộm tương phản và dùng lam kính phủ lên.

- Kết quả được biện luận sử dụng kính hiển vi quang học

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ Giải phẫu bệnh:	01
------------------------	----

Kỹ thuật viên xét nghiệm:	01
---------------------------	----

Cử nhân sinh học:	01
-------------------	----

Nhân lực hỗ trợ: Hộ lý, nhân viên văn phòng, nhân viên vệ sinh

#### 2.2. Vật tư, hóa chất:

- Dung dịch khử Paraffin

- Dung dịch dầu khoáng phủ tiêu bản

- Dung dịch tiền xử lý mẫu màng tế bào

- ISH protease: enzyme tiền xử lý mẫu ở nhân, ly giải màng nhân, bóc lộ acid nucleic

- Dung dịch đệm tạo môi trường tối ưu cho phản ứng lai của đoạn dò (ví dụ với gen HER2 và CEP17).

- Hỗn hợp chứa đoạn dò (gen HER2 và CEP17, bắt cặp đặc hiệu với trình tự đặc trưng cho gen HER2 và CEP17 tương ứng).

- Silver ISH DNP Detection Kit: bộ kit tạo màu bạc, gắn đặc hiệu với đoạn dò HER2 và cho phản ứng tạo tín hiệu màu bạc khi quan sát dưới KHV

- RED ISH DIG Detection Kit: bộ kit tạo màu đỏ, gắn đặc hiệu với đoạn dò CEP17 và cho phản ứng tạo tín hiệu màu đỏ

- Dung dịch rửa sau phản ứng lai
- SSC (sodium saline citrate): dung dịch rửa sau mỗi bước phản ứng
- Hematoxylin: dung dịch nhuộm nhân
- Dung dịch làm xanh nhân
- Mẫu mô chứng
- Keo gắn phiến kính
- Lam kính thường, lam kính có gắn chất chống bong, phiến kính

### **2.3. Trang thiết bị:**

- Máy nhuộm lai tự động
- Máy cắt lát mỏng
- Lưỡi dao cắt lát mỏng
- Tủ âm
- Tủ hút
- KHV quang học
- Tủ lạnh

### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm**

- Khối khối nén chứa u bệnh phẩm được cắt lát mỏng 3-5 µm và dán lên lam kính chống bong, lam kính tích điện (hoặc lam tráng silan), và một lam kính sạch nhuộm HE
- Đỗ lam kính trong tủ âm 60-65°C trong 40-45 phút
- Cài đặt chương trình chạy máy nhuộm lai tự động.

### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm**

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định: họ tên người bệnh, tuổi, giường bệnh, tên khoa phòng, chẩn đoán, loại mẫu bệnh phẩm, thời gian lấy mẫu bệnh phẩm...

### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật : 720 phút.**

### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật:**

- Thực hiện chung với phòng thực hiện kỹ thuật HMMD, phòng phải có hệ thống thông khí tốt, hệ thống lạnh ổn định từ 23-26°C.

## **3. AN TOÀN**

### **3.1. An toàn cho người lao động:**

- Sử dụng trang bị bảo hộ cá nhân như găng tay, kính bảo hộ, khẩu trang và áo blouse;
- Tuân thủ quy trình vận hành an toàn với hóa chất và thiết bị;

- Quản lý chất thải hóa học một cách an toàn;
- Thực hiện các biện pháp phòng ngừa lây nhiễm.
- Được đào tạo về an toàn và sức khỏe nghề nghiệp để đảm bảo môi trường làm việc an toàn.

### **3.2. Hiệu chỉnh vật tư thiết bị:**

- Phải có kiểm tra và điều chỉnh thiết bị để đảm bảo chúng hoạt động chính xác,
- Lịch bảo dưỡng định kỳ

### **3.3. Phòng, tránh cháy, nổ:**

- Sử dụng đúng cách hóa chất và dung môi dễ cháy,
- Đảm bảo thông gió tốt, bảo quản hóa chất theo yêu cầu an toàn, sử dụng tủ lạnh chống cháy cho các chất dễ bay hơi,
- Kiểm tra thiết bị điện định kỳ để phát hiện hỏng hóc,
- Trang bị bình chữa cháy cùng các quy trình an toàn sẵn sàng áp dụng.

### **3.4. Điều kiện lưu trữ hóa chất, đặc biệt là kháng thể:**

- Đảm bảo nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng phù hợp trong bảo quản.
- Đối với kháng thể, thường được lưu trữ trong tủ lạnh ở 2-8°C cho sử dụng ngắn hạn hoặc đông lạnh -20°C-80°C cho sử dụng dài hạn,
- Tránh đông lạnh và rã đông nhiều lần sẽ làm giảm chất lượng kháng thể.
- Hóa chất dễ cháy cần được bảo quản trong tủ chống cháy và tách biệt khỏi các chất oxy hóa.

### **3.5. Quy định về an toàn sinh học:**

- Sử dụng các biện pháp bảo hộ cá nhân như găng tay, kính bảo hộ, và khẩu trang; thực hành kỹ thuật sinh học an toàn để tránh nhiễm khuẩn;
- Xử lý và tiêu hủy mẫu bệnh phẩm theo quy định;
- Bảo dưỡng thiết bị sạch sẽ.
- Đảm bảo không gian làm việc được giữ sạch sẽ và an toàn, tránh ô nhiễm chéo giữa các mẫu và giữa người với người.

### **3.6. Quy định về môi trường:**

- Duy trì một không gian làm việc sạch sẽ, an toàn và có kiểm soát.
- Kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, và thông gió để đảm bảo điều kiện lý tưởng cho cả nhân viên và mẫu nghiên cứu.
- Tuân thủ các biện pháp xử lý chất thải hóa học và sinh học một cách an toàn và thân thiện với môi trường.

## **4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH**

### **4.1. Các bước thực hiện**

B1: Tiền xử lý mẫu mô: 28 phút

B2: Ly giải màng nhân ISH Protease : 4 phút

B4: Biến tính DNA: 4 phút

B5: Phản ứng lai (Hybridization): 6 giờ, nhiệt độ ủ 72°C

B6: Thực hiện phản ứng khuếch đại bạc: 16 phút

B7: Hiển thị màu (Silver Chromogen): 4 phút

B8: Thực hiện phản ứng khuếch đại tín hiệu đỏ: 24 phút

B9: Hiển thị màu (Red Chromogen): 8 phút

B10: Nhuộm tương phản bằng hematoxylin: 8 phút

B11: Làm xanh nhân: 4 phút

B12: Làm trong, gắn phiến kính

#### **4.2. Nhận định kết quả**

- Tiêu bản sau khi nhuộm màu xong sẽ được đọc dưới kính hiển vi quang học bởi Bác sĩ, từ đó đưa ra định hướng và chẩn đoán cho người bệnh

- Quy trình lai tại chỗ tự động của Ventana tạo ra sản phẩm phản ứng màu bạc và đỏ riêng biệt kết tủa ở vùng đích được định vị bởi các mầu dò. Một người đọc đủ tiêu chuẩn có kinh nghiệm về quy trình lai tại chỗ phải đánh giá các mầu chứng và đánh giá sản phẩm nhuộm trước khi biện luận kết quả....

#### **4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở.

### **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

#### **KHÔNG CÓ TÍN HIỆU HOẶC TÍN HIỆU YẾU**

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Khử paraffin không hết	Tăng thời gian khử paraffin hoặc thay thế EZ prep mới
Điều kiện lai không chính xác	Kiểm tra lại nhiệt độ máy lai hoặc buồng lai
Nhiệt độ rửa sau khi lai không chính xác	Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa hoặc tăng thời gian lai
Lượng probe không đủ	Tăng thêm lượng probe bơm vào lâm
Digest không đủ	Kiểm tra lại nhiệt độ digest hoặc tăng thêm thời gian
Thời gian cố định quá dài	Kiểm tra lại quy trình cố định bệnh phẩm, bệnh phẩm cần được cố định trong khoảng 6-72 giờ

## TÍN HIỆU KHÔNG ĐỒNG ĐỀU GIỮA CÁC VÙNG TRÊN BỆNH PHẨM

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Tồn tại nhiều vùng khác nhau trên bệnh phẩm	Tăng thời gian cố định
Probe phân bố không đồng đều do có bọt khí	Thực hiện lại phản ứng lai và đảm bảo không có bọt khí
Kích thước bệnh phẩm quá lớn	Tăng thể tích dung dịch lai khi bơm

## NHUỘM NỀN CAO

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Quá trình rửa sau khi lai	Kiểm tra lại pH của dung dịch rửa (7,2-7,5)
	Kiểm tra lại nhiệt độ buồng rửa
	Lắc trong quá trình rửa
	Tăng thời gian rửa bằng SSC

## MẤT HAY TIÊU BIỂN BỆNH PHẨM

Nguyên nhân	Cách khắc phục
Sấy tiêu bản không đúng	Kiểm tra lại nhiệt độ tủ sấy
Bộc lộ quá mức	Kiểm tra lại nhiệt độ bộc lộ Giảm thời gian bộc lộ
Biến tính quá mức	Kiểm tra lại nhiệt độ biến tính Giảm thời gian biến tính

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.
2. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020 – College of American Pathologists.

## 82. XÉT NGHIỆM BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI TẠI CHỖ (IN SITU HYBRIDIRATION: ISH)

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình nhằm hướng dẫn các bước thực hiện, cách tiến hành phân tích kết quả và các lưu ý nhằm thực hiện xét nghiệm lai tại chỗ chung cho các loại mồi dò khác nhau từ mẫu bệnh phẩm là khối nén.

#### 1.2. Nguyên lý

**ISH (In situ hybridization):** Lai tại chỗ là kỹ thuật sử dụng các đầu dò gắn mồi có trình tự bổ sung với trình tự đích quan tâm trên DNA. Kết quả quá trình lai cho phép xác định sự có mặt, số lượng cũng như tương quan vị trí của các trình tự đích.

Sử dụng kính hiển vi quang học để biện giải kết quả xét nghiệm. Các kết quả dương tính hỗ trợ trong phân loại mẫu bệnh bình thường và bất thường, và được dùng bổ sung với các xét nghiệm mô/tế bào bệnh học truyền thống khác.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Nhân lực

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01
- Kỹ thuật y: 02
- Nhân viên hỗ trợ: Hộ lý, nhân viên văn phòng, nhân viên vệ sinh

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

##### 2.2.1. Hóa chất

STT	Hóa chất
1	Mẫu dò gắn đặc hiệu RNA cần phát hiện
2	Tạo tín hiệu đỏ cho mRNA mục tiêu
3	Tạo tín hiệu đen cho mRNA mục tiêu
4	Enzyme phá màng nhân
5	Dung dịch nhuộm tương phản
6	Dung dịch khử paraffin
7	Dung dịch dầu bao phủ lên tiêu bản mô, ngăn hóa chất bốc hơi
8	Dung dịch rửa tiêu bản
9	Đệm xử lý tế bào

10	Dung dịch xử lý tế bào
11	Mẫu dò lai mRNA chứng dương
12	Mẫu dò lai chứng âm
13	Tiêu bản mẫu chứng dương

### 2.2.2. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần;
- Lam kính thường;
- Lam kính chuyên dụng cho kỹ thuật hóa mô miếng dịch;
- Lamelle;
- Que tăm bệnh phẩm.
- Khay đá.
- Giá để tiêu bản.
- Ependoff 1.5 ml;
- Đầu côn 20 ul có lọc;
- Đầu côn 200 ul có lọc;
- Đầu côn 1ml có lọc;
- Khăn sạch.
- Găng tay.
- Nhãn in .
- Nước cất.
- Bút chì, giấy A4, bút chì.

### 2.3. Trang thiết bị:

- Kính hiển vi quang học 1 đầu và nhiều đầu có gắn camera (nếu có);
- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu);
- Hệ thống nhuộm hóa mô;
- Máy nhuộm tiêu bản Hematoxylin Eosin;
- Máy gắn lamelle tự động;
- Bệ dàn tiêu bản;
- Máy lắc;
- Tủ lạnh;
- Tủ ám;
- Tủ hút cho phòng xét nghiệm;

- Máy in nhãn;
- Máy lọc nước RO 2 lần
- Pipet định mức 1000 microlit
- Pipet định mức 200 microlit
- Pipet định mức 50 microlit
- Các dụng cụ và thuốc tẩy trùng để làm sạch dụng cụ;
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại);
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Hệ thống lưu trữ tiêu bản, khói nến.
- Máy tính, máy in;
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm,...) và lưu trữ bệnh phẩm.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:**

- Bệnh phẩm là các mẫu nến có vùng u cần lai hai màu để đánh giá.
- Khối nến bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
  - + Bệnh phẩm được cố định ngay sau khi mổ trong formalin trung tính 10% với thời gian tối ưu là 6h-14h, nhằm đảm bảo chất lượng Nucleic acid trong tế bào được giữ nguyên trạng thái, đồng thời không bị tiêu hủy do enzyme nội sinh.
  - + Các quy trình mô bệnh học tạo ra khối nến phải đảm bảo đúng thời gian và kĩ thuật.
  - + Mô u đủ số lượng để nhuộm ( $>100$  tế bào).

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, yêu cầu xét nghiệm.
  - + Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, loại mẫu.
  - + Có ghi rõ tiền sử bệnh lý, phác đồ điều trị hỗ trợ, thời gian điều trị, đánh giá đáp ứng trên lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh (nếu có), tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
  - + Thời gian thực hiện xét nghiệm giải phẫu bệnh, điều kiện lưu trữ. Ghi ngày giờ nhận, người bàn giao và người nhận.
  - Đổi chiều chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm,...

#### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

- Thời gian thực hiện kỹ thuật: 18 giờ;
- Thời gian thực hiện xét nghiệm: 7 ngày làm việc.

#### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật**

Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh.

### **3. AN TOÀN:**

- Thực hiện theo quy định an toàn phòng xét nghiệm của Bộ y tế

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Chuẩn bị bệnh phẩm**

- Cắt mẫu có độ dày 4 µm, lát cắt dày hơn 4 µm có thể cần xử lý protease mạnh hơn so với khuyến cáo và có thể xuất hiện bong bóng nhân do paraffin dư thừa trong mô.

- Khối nén bệnh phẩm của bệnh nhân cắt mảnh và dán lên 2 tiêu bản có sẵn mẫu chứng âm và mẫu chứng dương. Cắt 1 tiêu bản để thực hiện kỹ thuật nhuộm hematoxylin – Eosin thông thường. Mẫu chứng giúp đánh giá tiêu bản xét nghiệm nhuộm đạt hay không đạt.

+ Tiêu bản chứa chứng dương để xác định sự bảo tồn mRNA trên mẫu bệnh nhân. Nếu tiêu bản này âm tính có nghĩa là mRNA trên mô bệnh không còn được bảo tồn, mRNA bị phá hủy.

+ Tiêu bản chứng âm sử dụng để đánh giá kết quả nhuộm nền, nhuộm không đặc hiệu trên mô bệnh.

#### **4.2. Quy trình nhuộm tự động:**

Bước 1: Tiền xử lý mẫu mô: 28 phút

Bước 2: Ly giải màng nhân: 4 phút

Bước 3: Biến tính DNA: 4 phút

Bước 4: Phản ứng lai 6 giờ, nhiệt độ ủ 72°C

Bước 5: Thực hiện phản ứng khuếch đại bạc: 16 phút

Bước 6: Hiển thị màu đen: 4 phút

Bước 7: Thực hiện phản ứng khuếch đại tín hiệu đỏ: 24 phút

Bước 8: Hiển thị màu đỏ: 8 phút

Bước 9: Nhuộm nhân tế bào bằng hematoxylin: 8 phút

Bước 10: Làm xanh nhân: 4 phút

Bước 11: Làm trong, gắn lamen

#### **4.3. Nhận định kết quả và báo cáo**

##### **4.3.1. Đọc kết quả**

- Quy trình nhuộm tự động tạo ra sản phẩm phản ứng màu xanh kết tủa tại vị trí DNA hoặc RNA đích.

- Bác sĩ giải phẫu bệnh phải đánh giá chứng âm và chứng dương trước khi đọc kết quả trên mẫu bệnh phẩm. Nếu lam chứng nhuộm màu không thích hợp, thì kết quả nhuộm trên mẫu bệnh được coi là không hợp lệ.

+ Kiểm tra lam chứng dương trước để xác định rằng tất cả các thuốc thử đang hoạt động đúng. Sự hiện diện của sản phẩm phản ứng màu xanh trong các tế bào đích

là dấu hiệu của phản ứng dương tính.

+ Chứng âm được kiểm tra sau chứng dương để xác minh tính đặc hiệu của phản ứng. Không nên có bất kỳ sự nhuộm màu đặc hiệu nào trên chứng âm. Nếu nhuộm màu xảy ra, nó cho thấy phản ứng chéo không đặc hiệu với các tế bào hoặc các thành phần của tế bào. Các tế bào nguyên vẹn nên được sử dụng để đọc kết quả nhuộm màu vì các tế bào hoại tử hoặc thoái hóa thường bắt màu không đặc hiệu.

- Kết quả đánh giá trên mẫu bệnh phải được đánh giá cùng với chứng âm dưới kính hiển vi quang học.

+ Kết quả là âm tính khi không phát hiện được chuỗi DNA hoặc RNA trong tế bào đích.

+ Kết quả dương tính là sự xuất hiện của tín hiệu màu xanh trong tế bào đích. Hình thái mô học của mẫu nên được đánh giá cùng tiêu bản nhuộm HE.

#### 4.3.2. Báo cáo, trả kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở;

Lưu khối nến và tiêu bản theo quy định của cơ sở.

### 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

#### 5.1. Trước xét nghiệm

##### 5.1.1. Mẫu phẩm không đủ u (dưới 100 tế bào) hoặc chất lượng không đạt:

- Nguyên nhân: Do mảnh sinh thiết quá nhỏ hoặc do các bước trong quy trình giải phẫu bệnh không đạt làm bệnh phẩm có thể mất kháng nguyên.

- Khắc phục: Đánh giá bằng tiêu bản nhuộm Hematoxylin nếu không đạt cần chọn lại mẫu phẩm khác của bệnh nhân. Nếu không có mẫu phẩm khác cần sinh thiết lại (nếu có thể). Nếu không thể sinh thiết lại cần khuyến cáo bác sĩ chỉ định.

##### 5.1.2. Những sai sót về hoá chất, trang thiết bị

Hoá chất phải được đảm bảo đúng khuyến cáo của nhà sản xuất, theo dõi môi trường bảo quản. Trang thiết bị được hiệu chuẩn, hiệu chỉnh định kì. Các sai sót về hoá chất, vật tư, trang thiết bị cần khắc phục theo Quy trình quản lý tương ứng.

#### 5.2. Trong quá trình nhuộm

- Theo dõi quá trình nhuộm của máy để kịp thời xử lý các sự cố khi máy báo lỗi. Khi hệ thống báo lỗi, máy dừng hoạt động, cần phải chuyển sang các bước tiếp theo nhuộm bằng tay ngay sau đó, không được để bệnh phẩm trên tiêu bản bị khô.

- Reset lại máy bằng cách khởi động lại hệ thống. Hệ thống lỗi phức tạp mà người sử dụng không có khả năng xử lý cần gọi kỹ sư của hãng để được hỗ trợ kịp thời.

#### 5.3. Sau xét nghiệm

##### 5.3.1. Chứng âm nền:

- Nguyên nhân: Bộc lộ quá mức.

- Khắc phục: Test dài nhiệt độ và thời gian bốc lộ để tìm vị trí nhiệt độ và thời gian tối ưu cho phương pháp nhuộm. Nhuộm lại bệnh phẩm.

### 5.3.2. Chứng dương âm tính:

- Nguyên nhân: Hóa chất hỏng; bốc lộ kháng nguyên chưa đạt; thời gian phản ứng với kháng thể một quá ngắn; kháng thể một pha loãng lồng độ chưa tối ưu.

- Khắc phục: Pha lại hóa chất mới; cắt các tiêu bản chứng dương để test tìm ra thời gian bốc lộ kháng nguyên, thời gian phản ứng với kháng thể 1, tỉ lệ pha loãng kháng thể 1 sao cho tối ưu. Nhuộm lại bệnh phẩm.

### 5.3.3. Tiêu bản chỉ nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm:

- Nguyên nhân: Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm.

- Khắc phục: Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được để trong hệ thống kín gió. Nhuộm lại bệnh phẩm.

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.

Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020  
– College of American Pathologists.

Freida Carson: Histotechnology, 3rd edition, 2017.

### 83. XÉT NGHIỆM BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI TẠI CHỖ GẮN MÀU (CISH)

#### 1. ĐẠI CƯƠNG

##### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này hướng dẫn các bước thực hiện, cách tiến hành phân tích kết quả và các lưu ý nhằm thực hiện xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu chung cho các loại mồi dò khác nhau từ mẫu bệnh phẩm là khói nến.

##### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

**CISH (chromogenic in situ hybridization):** Lai tại chỗ gắn màu là kỹ thuật sử dụng các đầu dò gắn mồi có trình tự bổ sung với trình tự đích quan tâm trên DNA. Kết quả quá trình lai cho phép xác định sự có mặt, số lượng cũng như tương quan vị trí của các trình tự đích.

Sử dụng kính hiển vi quang học để biện giải kết quả xét nghiệm. Các kết quả dương tính hỗ trợ trong phân loại mẫu bệnh bình thường và bất thường, và được dùng bổ sung với các xét nghiệm mô/tế bào bệnh học truyền thống khác.

#### 2. CHUẨN BỊ

##### 2.1. Nhân lực

Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01

Kỹ thuật y: 01

Nhân lực hỗ trợ: Hộ lý, nhân viên văn phòng, nhân viên vệ sinh

##### 2.2. Vật tư, hóa chất

###### 2.2.1. Hóa chất

STT	Tên hóa chất
1	Mẫu dò gắn đặc hiệu RNA cần phát hiện
2	Tạo tín hiệu xanh cho mRNA mục tiêu
3	Enzyme phá màng nhân
4	Dung dịch nhuộm tương phản
5	Dung dịch khử paraffin
6	Dung dịch dầu bao phủ lên tiêu bản mô, ngăn hóa chất bốc hơi
7	Dung dịch rửa tiêu bản
8	Đệm xử lý tế bào
9	Dung dịch xử lý tế bào

10	Mẫu dò lai mRNA chứng dương
11	Mẫu dò lai chứng âm
12	Tiêu bản mẫu chứng dương

#### 2.2.2. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần;
- Lam kính thường;
- Lam kính chuyên dụng cho kỹ thuật hóa mô miễn dịch;
- Lamelle;
- Que tăm bệnh phẩm.
- Khay đá.
- Giá đế tiêu bản.
- Ependoff 1.5 ml;
- Đầu côn 20 ul có lọc;
- Đầu côn 200 ul có lọc;
- Đầu côn 1ml có lọc;
- Khăn sạch.
- Găng tay.
- Nhãn in .
- Nước cất.
- Bút chì, giấy A4, bút chì.

#### 2.3. Trang thiết bị:

- Kính hiển vi quang học 1 đầu và nhiều đầu có gắn camera (nếu có);
- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu);
- Hệ thống nhuộm hóa mô;
- Máy nhuộm tiêu bản Hematoxylin Eosin;
- Máy gắn lamelle tự động;
- Bể dàn tiêu bản;
- Máy lắc;
- Tủ lạnh;
- Tủ ám;
- Tủ hút cho phòng xét nghiệm;
- Máy in nhãn;

- Máy lọc nước RO 2 lần
- Pipet định mức 1000 microlit
- Pipet định mức 200 microlit
- Pipet định mức 50 microlit
- Các dụng cụ và thuốc tẩy trùng để làm sạch dụng cụ;
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại);
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Hệ thống lưu trữ tiêu bản, khói nến.
- Máy tính, máy in;
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm,...) và lưu trữ bệnh phẩm.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:**

- Bệnh phẩm là các mẫu nến có vùng u cần lai hai màu để đánh giá.
- Khối nến bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
  - + Bệnh phẩm được cố định ngay sau khi mổ trong formalin trung tính 10% với thời gian tối ưu là 6h-14h, nhằm đảm bảo chất lượng Nucleic acid trong tế bào được giữ nguyên trạng thái, đồng thời không bị tiêu hủy do enzyme nội sinh.
  - + Các quy trình mô bệnh học tạo ra khối nến phải đảm bảo đúng thời gian và kĩ thuật.
  - + Mô u đủ số lượng để nhuộm ( $>100$  tế bào).

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, yêu cầu xét nghiệm.
  - + Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, loại mẫu.
  - + Có ghi rõ tiền sử bệnh lý, phác đồ điều trị bổ trợ, thời gian điều trị, đánh giá đáp ứng trên lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh (nếu có), tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
  - + Thời gian thực hiện giải phẫu bệnh, điều kiện lưu trữ. Ghi ngày giờ nhận, người bàn giao và người nhận.
- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm,...

#### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

- Thời gian thực hiện kỹ thuật: 8 giờ;
- Thời gian trả kết quả: 7 ngày.

#### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật**

Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

### **3. AN TOÀN:**

- Thực hiện theo quy định an toàn phòng xét nghiệm của Bộ y tế

#### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

##### **4.1. Chuẩn bị bệnh phẩm**

- Cắt mẫu có độ dày 4 µm, lát cắt dày hơn 4 µm có thể cần xử lý protease mạnh hơn so với khuyến cáo và có thể xuất hiện bong bóng nhân do paraffin dư thừa trong mô.

- Khối nén bệnh phẩm của bệnh nhân cắt mảnh và dán lên 2 tiêu bản có sẵn mẫu chứng âm và mẫu chứng dương. Cắt 1 tiêu bản để thực hiện kỹ thuật nhuộm hematoxylin – Eosin thông thường. Mẫu chứng giúp đánh giá tiêu bản xét nghiệm nhuộm đạt hay không đạt.

+ Tiêu bản chứa chứng dương để xác định sự bảo tồn mRNA trên mẫu bệnh nhân. Nếu tiêu bản này âm tính có nghĩa là mRNA trên mô bệnh không còn được bảo tồn, mRNA bị phá hủy.

+ Tiêu bản chứng âm sử dụng để đánh giá kết quả nhuộm nền, nhuộm không đặc hiệu trên mô bệnh.

##### **4.2. Quy trình nhuộm tự động:**

Bước 1: Tiền xử lý mẫu mô: 28 phút

Bước 2: Ly giải màng nhân: 20 phút

Bước 3: Biến tính DNA: 1 phút

Bước 4: Hiển thị màu xanh mục tiêu: 60 phút

Bước 5: Nhuộm đỏ tương phản: 4 phút

Bước 6: Làm trong, gắn lamelle.

##### **4.3. Nhận định kết quả và báo cáo**

###### **4.3.1. Đọc kết quả**

- Quy trình nhuộm tự động tạo ra sản phẩm phản ứng màu xanh kết tủa tại vị trí Gen đích.

- Bác sĩ giải phẫu bệnh phải đánh giá chứng âm và chứng dương trước khi đọc kết quả trên mẫu bệnh phẩm. Nếu lam chứng nhuộm màu không thích hợp, thì kết quả nhuộm trên mẫu bệnh được coi là không hợp lệ. Lưu ý không nên sử dụng vật kính 100X.

+ Kiểm tra lam chứng dương trước để xác định rằng tất cả các thuốc thử đang hoạt động đúng. Sự hiện diện của sản phẩm phản ứng màu xanh trong các tế bào đích là dấu hiệu của phản ứng dương tính.

+ Chứng âm được kiểm tra sau chứng dương để xác minh tính đặc hiệu của phản ứng. Không nên có bất kỳ sự nhuộm màu đặc hiệu nào trên chứng âm. Nếu nhuộm màu xảy ra, nó cho thấy phản ứng chéo không đặc hiệu với các tế bào hoặc các thành phần của tế bào. Các tế bào nguyên vẹn nên được sử dụng để đọc kết quả nhuộm màu vì các tế bào hoại tử hoặc thoái hóa thường bắt màu không đặc hiệu.

- Kết quả đánh giá trên mẫu bệnh phải được đánh giá cùng với Negative reagent control dưới kính hiển vi quang học.

+ Kết quả là âm tính khi không phát hiện được chuỗi Gen trong tế bào đích.

+ Kết quả dương tính là sự xuất hiện của tín hiệu màu xanh trong tế bào đích. Hình thái mô học của mẫu nên được đánh giá cùng tiêu bản nhuộm H&E.

#### 4.3.2. Báo cáo, trả kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở;

Lưu khối nến và tiêu bản theo quy định của cơ sở.

### 5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

#### 5.1. Trước xét nghiệm

5.1.1. Mẫu phẩm không đủ u (dưới 100 tế bào) hoặc chất lượng không đạt:

- Nguyên nhân: Do mảnh sinh thiết quá nhỏ hoặc do các bước trong quy trình giải phẫu bệnh không đạt làm bệnh phẩm có thể mất kháng nguyên.

- Khắc phục: Đánh giá bằng tiêu bản nhuộm Hematoxylin nếu không đạt cần chọn lại mẫu phẩm khác của bệnh nhân. Nếu không có mẫu phẩm khác cần sinh thiết lại (nếu có thể). Nếu không thể sinh thiết lại cần khuyến cáo bác sĩ chỉ định.

#### 5.1.2. Những sai sót về hoá chất, trang thiết bị

Hoá chất phải được đảm bảo đúng khuyến cáo của nhà sản xuất, theo dõi môi trường bảo quản. Trang thiết bị được hiệu chuẩn, hiệu chỉnh định kì. Các sai sót về hoá chất, vật tư, trang thiết bị cần khắc phục theo Quy trình quản lý tương ứng.

#### 5.2. Trong quá trình nhuộm

- Theo dõi quá trình nhuộm của máy để kịp thời xử lý các sự cố khi máy báo lỗi.

Khi hệ thống báo lỗi, máy dừng hoạt động, cần phải chuyển sang các bước tiếp theo nhuộm bằng tay ngay sau đó, không được để bệnh phẩm trên tiêu bản bị khô.

- Reset lại máy bằng cách khởi động lại hệ thống. Hệ thống lỗi phức tạp mà người sử dụng không có khả năng xử lý cần gọi kỹ sư của hãng để được hỗ trợ kịp thời.

#### 5.3. Sau xét nghiệm

##### 5.3.1. Chứng âm nền:

- Nguyên nhân: Bộc lộ quá mức.

- Khắc phục: Test dài nhiệt độ và thời gian bộc lộ để tìm vị trí nhiệt độ và thời gian tối ưu cho phương pháp nhuộm. Nhuộm lại bệnh phẩm.

##### 5.3.2. Chứng dương âm tính:

- Nguyên nhân: Hóa chất hỏng; bộc lộ kháng nguyên chưa đạt; thời gian phản ứng với kháng thể một quá ngắn; kháng thể một pha loãng lỏng độ chưa tối ưu.

- Khắc phục: Pha lại hóa chất mới; cắt các tiêu bản chứng dương để test tìm ra thời gian bộc lộ kháng nguyên, thời gian phản ứng với kháng thể 1, tỉ lệ pha loãng kháng thể 1 sao cho tối ưu. Nhuộm lại bệnh phẩm.

### 5.3.3. Tiêu bản chỉ nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm:

- Nguyên nhân: Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bám màu thuốc nhuộm.

- Khắc phục: Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được để trong hệ thống kín gió. Nhuộm lại bệnh phẩm.

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.

Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020  
– College of American Pathologists.

Freida Carson: Histotechnology, 3rd edition, 2017.

## 84. XÉT NGHIỆM BẰNG PHƯƠNG PHÁP LAI TẠI CHỖ GẮN HUỲNH QUANG (FISH)

### 1. ĐẠI CƯƠNG

#### 1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này hướng dẫn các bước thực hiện, cách tiến hành phân tích kết quả và các lưu ý nhằm thực hiện xét nghiệm lai tại chỗ gắn huỳnh quang chung cho các loại mồi dò khác nhau từ mẫu bệnh phẩm là khôi nén nhằm xác định các khuếch đại gen.

#### 1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Lai tại chỗ gắn huỳnh quang (FISH) là một kỹ thuật di truyền tế bào phân tử, sử dụng các đầu dò huỳnh quang có trình tự bổ sung với trình tự đích quan tâm trên DNA. Kết quả quá trình lai cho phép xác định sự có mặt, số lượng cũng như tương quan vị trí của các trình tự đích.

Kính hiển vi huỳnh quang có thể được sử dụng để xác định vị trí mồi dò huỳnh quang liên kết với nhiễm sắc thể. Các kết quả dương tính hỗ trợ trong phân loại mẫu bệnh bình thường và bất thường, và được dùng bổ sung với các xét nghiệm mô/tế bào bệnh học truyền thống khác.

### 2. CHUẨN BỊ

#### 2.1. Nhân lực

Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01

Kỹ thuật y: 02

Nhân lực hỗ trợ: Hộ lý, nhân viên văn phòng, nhân viên vệ sinh

#### 2.2. Vật tư, hóa chất

##### 2.2.1. Hóa chất

- Bộ kit có đầu dò gen càn phát hiện gắn huỳnh quang.
- Bộ kit xử lý mô cho kỹ thuật FISH paraffin pretreatment reagent kit .
- Cồn 70<sup>0</sup>, 90<sup>0</sup>, 100<sup>0</sup>.
- Toluen.
- Nước cát 2 lần.

##### 2.2.2. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần;
- Lam kính thường;
- Lam kính chuyên dụng cho kỹ thuật hóa mô miễn dịch;
- Lamelle;
- Que tăm bệnh phẩm.

- Khay đá.
- Giá để tiêu bản.
- Ependoff 1.5 ml;
- Đầu côn 20 ul có lọc;
- Đầu côn 200 ul có lọc;
- Đầu côn 1ml có lọc;
- Khăn sạch.
- Găng tay.
- Nhãn in .
- Nước cất.
- Bút chì, giấy A4, bút chì.

### **2.3. Trang thiết bị:**

- Kính hiển vi quang học, 1 đầu và nhiều đầu có gắn camera (nếu có);
- Kính hiển vi huỳnh quang kèm hệ thống phần mềm hỗ trợ phân tích;
- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu);
- Hệ thống nhuộm hóa mô;
- Máy nhuộm tiêu bản Hematoxylin Eosin;
- Máy gắn lamelle tự động;
- Bệ dàn tiêu bản;
- Máy lắc;
- Tủ lạnh;
- Tủ âm;
- Tủ hút cho phòng xét nghiệm;
- Máy in nhãn;
- Máy lọc nước RO 2 lần
- Pipet định mức 1000 microlit
- Pipet định mức 200 microlit
- Pipet định mức 50 microlit
- Các dụng cụ và thuốc tẩy trùng để làm sạch dụng cụ;
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha;
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Hệ thống lưu trữ tiêu bản, khói nến.
- Máy tính, máy in;

- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm,...) và lưu trữ bệnh phẩm.

#### **2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:**

- Bệnh phẩm là các mẫu nến có vùng u cần đánh giá.
- Khối nến bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
  - + Bệnh phẩm được cố định ngay sau khi mổ trong formalin trung tính 10% với thời gian tối ưu là 6h-14h, nhằm đảm bảo chất lượng Nucleic acid trong tế bào được giữ nguyên trạng thái, đồng thời không bị tiêu hủy do enzyme nội sinh.
  - + Các quy trình mô bệnh học tạo ra khối nến phải đảm bảo đúng thời gian và kĩ thuật.
  - + Mô u đủ số lượng để nhuộm ( $>100$  tế bào).

#### **2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:**

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, yêu cầu xét nghiệm.
  - + Có ghi đầy đủ chẩn đoán lâm sàng, bao gồm các triệu chứng lâm sàng, các kết quả cận lâm sàng khác, loại mẫu.
  - + Có ghi rõ tiền sử bệnh lý, phác đồ điều trị bổ trợ, thời gian điều trị, đánh giá đáp ứng trên lâm sàng và chẩn đoán hình ảnh (nếu có), tên bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
    - + Thời gian thực hiện giải phẫu bệnh, điều kiện lưu trữ. Ghi ngày giờ nhận, người bàn giao và người nhận.
- Đôi chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm,...

#### **2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:**

- Thời gian thực hiện kỹ thuật: 8 giờ;
- Thời gian trả kết quả: 7 ngày.

#### **2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật**

Phòng xét nghiệm Giải phẫu bệnh

### **3. AN TOÀN:**

- Thực hiện theo quy định an toàn phòng xét nghiệm của Bộ y tế

### **4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **4.1. Chuẩn bị bệnh phẩm**

- Kỹ thuật viên cắt 03 lát bệnh phẩm dày 4 µm trên các lam kính: 1 lát dán trên lam thường nhuộm HE cắt theo quy trình Nhuộm Hematoxylin – eosin (HE) trên các mảnh mô; 2 lát dán lên tiêu bản có sẵn chứng âm và chứng dương.

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh đánh giá tiêu bản nhuộm HE, khoanh vùng lựa chọn.
- Cử nhân sinh học căn cứ vào vùng khoanh trên tiêu bản nhuộm loại bỏ phần bệnh phẩm không cần thiết trên tiêu bản còn lại.

- Mẫu chứng giúp đánh giá tiêu bản xét nghiệm nhuộm đạt hay không đạt.

+ Tiêu bản chúa chứng dương để xác định sự bảo tồn DNA trên mẫu bệnh nhân. Nếu tiêu bản này âm tính có nghĩa là DNA trên mô bệnh không còn được bảo tồn, DNA bị phá hủy.

+ Tiêu bản chứng âm sử dụng để đánh giá kết quả nhuộm nền, nhuộm không đặc hiệu trên mô bệnh.

#### **4.2. Các bước nhuộm:**

##### *4.2.1. Xử lý mẫu bệnh phẩm*

- Chuẩn bị dung dịch bóc lộ: Cho 50 ml dung dịch pretreatment vào Jar chuyên dụng. Ủ Jar ở 90 - 98°C trong 30 phút trước khi bắt đầu xét nghiệm;

- Chuẩn bị lam kính với bệnh phẩm dày 4-5ul, ủ bệnh phẩm ở 56 - 60°C trong 30 phút trước khi bắt đầu xét nghiệm;

- Loại paraffine bằng cách ngâm lam trong Toluene 5 phút (lặp lại 3 lần);

- Chuyển lam lần lượt sang cồn 100, 90, 70% trong 3 phút;

- Chuyển lam sang nước tinh khiết trong 3 phút;

- Ngâm lam trong dung dịch rửa trong 3 phút;

- Ngâm lam trong Pretreatment solution trong 30 phút ở 90 - 98°C;

- Chuyển lam sang nước tinh khiết trong 3 phút;

- Ngâm lam trong dung dịch rửa trong 3 phút;

- Loại bỏ dung dịch thừa;

- Nhỏ lên lam dung dịch chứa Protease (Protease Solution) trong 10 – 60 phút, theo dõi sự thoái biến của protein trên kính hiển vi quang học. Khi trên màng nhân tế bào xuất hiện các lỗ nhỏ và màng nhân nở ra thì quá trình xử lý có thể dừng lại;

- Ngâm lam lần lượt trong cồn 75%, 85%, 100% trong 1 phút;

- Đè khô trong 2-5 phút.

##### *4.2.2. Lai DNA với đầu dò huỳnh quang*

- Chuyển toàn bộ lam kính sau khi xử lý vào phòng tối;

- Nhỏ 10 ul kit xác định gen đột biến lên lam kính và đậy lamen;

- Phủ mép lamen bằng nhựa cao su (rubber cement);

- Chuyển lamen vào máy lai và chọn chương trình lai (72 °C – 10 phút; 37 °C trong 14 - 20 giờ);

- Sau khi quá trình lai kết thúc, chuẩn bị 2 jar chứa 50 ml dung dịch rửa, ủ dung dịch rửa 30 phút ở 37°C trước khi làm bước tiếp theo. Cần thận loại bỏ rubber cement, tránh làm ảnh hưởng đến mẫu;
- Ngâm lam trong dung dịch rửa sau lai ở 37°C cho đến khi lamen bong ra;
- Ngâm lam trong dung dịch sau lai ở 37°C trong 5 phút;
- Để khô lam tự nhiên;
- Nhỏ lên lam 10ul DAPI và đợi lamen ủ 15 phút.

### **4.3. Nhận định kết quả và báo cáo**

#### **4.3.1. Đọc kết quả**

- Khởi động kính hiển vi huỳnh quang, cho kính chạy 10 – 15 phút trước khi đọc kết quả.
- Khởi động máy tính và bật phần mềm phân tích kết quả tích hợp với kính hiển vi huỳnh quang: Meta system Isis.
- Kiểm tra kết quả lai trên các mẫu đối chứng.
- Phân tích kết quả mẫu bệnh phẩm dựa trên các kênh màu huỳnh quang tương ứng với các đầu dò của bộ kit.
- Đánh giá theo tiêu chuẩn để kết luận bất thường về gen theo các tiêu chuẩn của từng loại đột biến. Ví dụ: Khuếch đại gen Her2 đánh giá theo tiêu chuẩn ASCO/CAP.

#### **4.3.2. Báo cáo, trả kết quả xét nghiệm và lưu trữ bệnh phẩm**

Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ theo quy định của cơ sở;

Lưu khống nến và tiêu bản theo quy định của cơ sở.

## **5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

### **5.1. Trước xét nghiệm**

#### **5.1.1. Mẫu phẩm không đủ u (dưới 100 tế bào) hoặc chất lượng không đạt:**

- Nguyên nhân: Do mảnh sinh thiết quá nhỏ hoặc do các bước trong quy trình giải phẫu bệnh không đạt làm bệnh phẩm có thể mất kháng nguyên.

- Khắc phục: Đánh giá bằng tiêu bản nhuộm Hematoxylin nếu không đạt cần chọn lại mẫu phẩm khác của bệnh nhân. Nếu không có mẫu phẩm khác cần sinh thiết lại (nếu có thể). Nếu không thể sinh thiết lại cần khuyến cáo bác sĩ chỉ định.

#### **5.1.2. Những sai sót về hoá chất, trang thiết bị**

Hoá chất phải được đảm bảo đúng khuyến cáo của nhà sản xuất, theo dõi môi trường bảo quản. Trang thiết bị được hiệu chuẩn, hiệu chỉnh định kì. Các sai sót về hoá chất, vật tư, trang thiết bị cần khắc phục theo Quy trình quản lý tương ứng.

## 5.2. Trong quá trình nhuộm

- Theo dõi quá trình nhuộm của máy để kịp thời xử lý các sự cố khi máy báo lỗi. Khi hệ thống báo lỗi, máy dừng hoạt động, cần phải chuyển sang các bước tiếp theo nhuộm bằng tay ngay sau đó, không được để bệnh phẩm trên tiêu bản bị khô.
- Reset lại máy bằng cách khởi động lại hệ thống. Hệ thống lỗi phức tạp mà người sử dụng không có khả năng xử lý cần gọi kỹ sư của hãng để được hỗ trợ kịp thời.

## 5.3. Trong phân tích

### Tín hiệu yếu hoặc không có tín hiệu

- **Nguyên nhân 1:** Không có đoạn trình tự đích;  
Khắc phục: Sử dụng đối chứng để kiểm tra.
- **Nguyên nhân 2:** Mẫu được cố định không đúng cách;  
Khắc phục: Tối ưu hóa lại quá trình cố định. Sử dụng formaline 10% cố định trong 6-14 giờ.
- **Nguyên nhân 3:** Không thực hiện đúng cách quá trình sủ ly với pepsin;  
Khắc phục: Tối ưu hóa thời gian ủ pepsin, tăng hoặc giảm nếu cần thiết.
- **Nguyên nhân 4:** Probe bị bốc hơi;  
Khắc phục: Tạo buồng lại ẩm bằng hơi nước và dán kín lamen bằng Rubber cement.

### Tín hiệu bị nhiễu, mẫu nền mạnh

- **Nguyên nhân:** do mẫu không được làm khô trước khi lai, lượng probe đưa vào quá nhiều, hoặc nồng độ dung dịch rửa quá cao;  
Khắc phục: Phải để mẫu khô hoàn toàn trước khi lai, tính toán lượng probe đưa vào cho phù hợp và tối ưu lại nồng độ dung dịch rửa.

### Mô bị tiêu biến

- **Nguyên nhân:** Do mẫu cố định không tốt, thời gian bộc lộ quá lâu hoặc thời gian ủ pepsin quá dài;  
Khắc phục: Kiểm tra lại thời gian cố định mẫu, thời gian bộc lộ và thời gian ủ với pepsin (khi ủ với pepsin phải vừa ủ vừa quan sát trên kính hiển vi để theo dõi mức độ tiêu biến của mô).

### Tín hiệu bị chòng lấp

- **Nguyên nhân:** Do cắt mẫu bệnh phẩm quá dày;  
Khắc phục: Bảo đảm độ dày của mẫu 2 – 5 um.

### Couterstain yếu

- **Nguyên nhân:** Do chất lượng DAPI không đảm bảo hoặc do lượng DAPI cho lên mẫu không đủ hoặc thời gian ủ DAPI quá ngắn;

**Khắc phục:** Kiểm tra lại chất lượng DAPI, cho lượng DAPI và ủ DAPI tối thiểu 15 phút trước khi đọc trên kính hiển vi huỳnh quang.

## 6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm và đánh giá kết quả nội kiểm theo quy định.
- Tham gia, thực hiện và đánh giá kết quả ngoại kiểm/so sánh liên phòng (nếu có).

## 7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

Specimen collection & Transport guide. 2018-2019 – Quest Diagnostic.

Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology Version 9.0 - 2020  
– College of American Pathologists.

Tài liệu hướng dẫn của nhà sản xuất