

Số: 2017 /QĐ-BYT

Hà Nội, ngày 09 tháng 6 năm 2014

**QUYẾT ĐỊNH**  
**Về việc ban hành tài liệu “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Huyết học- Truyền máu- Miễn dịch- Di truyền- Sinh học phân tử”**

**BỘ TRƯỞNG BỘ Y TẾ**

Căn cứ Luật khám bệnh, chữa bệnh năm 2009;

Căn cứ Nghị định số 63/2012/NĐ-CP ngày 31/8/2012 của Chính Phủ quy định chức năng, nhiệm vụ, quyền hạn và cơ cấu tổ chức của Bộ Y tế;

*Xét Biên bản họp của Hội đồng nghiệm thu Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Huyết học- Truyền máu- Miễn dịch di truyền- Sinh học phân tử của Bộ Y tế;*

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 “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Huyết học- Truyền máu- Miễn dịch di truyền- Sinh học phân tử”, gồm 147 quy trình kỹ thuật.

**Điều 2.** Tài liệu “Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Huyết học- Truyền máu- Miễn dịch di truyền- Sinh học phân tử” ban hành kèm theo Quyết định này được áp dụng tại các cơ sở khám bệnh, chữa bệnh.

Căn cứ vào tài liệu hướng dẫn này và điều kiện cụ thể của đơn vị, Giám đốc cơ sở khám bệnh, chữa bệnh xây dựng và ban hành tài liệu Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Huyết học- Truyền máu- Miễn dịch di truyền- Sinh học phân tử phù hợp để thực hiện tại đơn vị.

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

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

**Nơi nhận:**

- Như Điều 4;
- Bộ trưởng Bộ Y tế (để b/c);
- Các Thứ trưởng BHYT;
- Bảo hiểm Xã hội Việt Nam (để phối hợp);
- Công thông tin điện tử BHYT;
- Website Cục KCB;
- Lưu VT, KCB.

**KT. BỘ TRƯỞNG**  
**THỨ TRƯỞNG**

**Đã ký**

**Nguyễn Thị Xuyên**

**DANH SÁCH HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT  
CHUYÊN NGÀNH HUYẾT HỌC- TRUYỀN MÁU- MIỄN DỊCH-  
DI TRUYỀN- SINH HỌC PHÂN TỬ**

*(Ban hành kèm theo Quyết định số: 2017 /QĐ-BYT ngày 09 tháng 6 năm 2014  
của Bộ trưởng Bộ Y tế)*

<b>TT</b>	<b>TÊN QUY TRÌNH KỸ THUẬT</b>
<b>Chương I. Huyết học tế bào</b>	
1.	Nhuộm hóa học tế bào
2.	Tìm ấu trùng giun chỉ (phương pháp thủ công)
3.	Tìm ký sinh trùng sốt rét (phương pháp thủ công)
4.	Nhuộm hoá mô miễn dịch mảnh sinh thiết tuỷ xương
5.	Nhuộm sợi xơ trong mô tuỷ xương (Phương pháp sợi Collagen Van Gieson)
6.	Nhuộm sợi liên võng trong mô tuỷ xương (Phương pháp Gomori)
7.	Xét nghiệm tế bào trong dịch não tuỷ (phương pháp thủ công)
8.	Xét nghiệm tế bào trong các loại dịch (phương pháp thủ công)
9.	Xét nghiệm tế bào nước tiểu (phương pháp thủ công)
10.	Xét nghiệm tế bào nước tiểu (bằng máy tự động)
11.	Đếm số lượng tiểu cầu bằng máy đếm tự động theo nguyên lý trở kháng và laser; quan sát độ tập trung tiểu cầu trên tiêu bản máu ngoại vi
12.	Tìm hồng cầu có chấm ưa bazơ
13.	Tìm mảnh vỡ hồng cầu
14.	Xét nghiệm hồng cầu lưới (bằng máy đếm tự động)
15.	Xét nghiệm hồng cầu lưới (Bằng kỹ thuật nhuộm xanh sáng Cresyl)
16.	Tìm tế bào Hargrave
17.	Xử lý bệnh phẩm sinh thiết và chẩn đoán mô học
18.	Chụp ảnh trên kính hiển vi kỹ thuật số và ghi đĩa
19.	Chụp ảnh trên kính hiển vi kỹ thuật số
<b>Chương II. Đông cầm máu</b>	
20.	Thời gian máu chảy (phương pháp Ivy)
21.	Nghiệm pháp dây thắt (phương pháp tăng áp)
22.	Phát hiện kháng đông đường ngoại sinh

23.	Định lượng Fibrinogen (phương pháp gián tiếp) bằng máy bán tự động/tự động
24.	Định lượng yếu tố XII (phương pháp 1 thì)
25.	Nghiệm pháp sinh Thromboplastin (TGT:Thromboplastin Generation Test)
26.	Định lượng ức chế yếu tố IX
27.	Định lượng hoạt tính Plasminogen
28.	Đo độ quánh máu/huyết tương
29.	Phát hiện kháng đông đường chung
30.	Xét nghiệm phát hiện giảm tiểu cầu do Heparin (Heparin induced Thrombocytopenia)
31.	Định lượng kháng nguyên chất ức chế hoạt hóa Plasminogen 1 (PAI-1 antigen: Plasminogen activated inhibitor type 1 antigen)
<b>Chương III. Miễn dịch- Di truyền- Sinh học phân tử</b>	
32.	Định lượng kháng thể kháng nDNA (anti-nDNA) bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA)
33.	Định lượng kháng thể kháng dsDNA (anti-dsDNA) bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA)
34.	Định tính kháng thể kháng dsDNA (bằng kỹ thuật ngưng kết latex)
35.	Định tính kháng thể kháng nhân bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA)
36.	Định lượng anti – $\beta$ 2 glycoprotein bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA)
37.	Đếm tế bào gốc tạo máu CD34 <sup>+</sup> bằng máy phân tích tế bào dòng chảy (Flow Cytometry)
38.	Độ chéo trong ghép bằng máy phân tích tế bào dòng chảy (Flow Cytometry)
39.	Đếm tế bào lympho T-CD3, T-CD4, T-CD8 bằng kỹ thuật phân tích tế bào dòng chảy
40.	Xét nghiệm CD55/59 bạch cầu
41.	Điện di huyết sắc tố trên máy điện di mao quản
42.	Sức bền hồng cầu
43.	Tiền miễn cảm bằng kỹ thuật miễn dịch gắn men (ELISA)
44.	Xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH
45.	Nhuộm băng G nhiễm sắc thể
46.	Công thức nhiễm sắc thể tuỷ
47.	Công thức nhiễm sắc thể máu ngoại vi
48.	Cấy hỗn hợp tế bào lympho
49.	Phát hiện người mang gen Hemophilia (bằng kỹ thuật PCR-PFLP)
50.	Xét nghiệm FISH xác định nhiễm sắc thể X,Y
51.	Xét nghiệm FISH xác định nhiễm sắc thể Ph1 (BCR/ABL)
52.	Xét nghiệm FISH chẩn đoán chuyển đoạn NST 4;11
53.	Xét nghiệm FISH chẩn đoán chuyển đoạn NST 1;19
54.	Xét nghiệm FISH chẩn đoán chuyển đoạn NST 8;21

55.	Xét nghiệm FISH chẩn đoán chuyên đoạn NST 15;17
56.	Tách chiết DNA từ máu ngoại vi/máu cuống rốn
57.	Tách chiết RNA từ máu ngoại vi/tủy xương
58.	PCR chẩn đoán bệnh anpha thalassemia (05 đột biến)
59.	Kỹ thuật Nested RT-PCR phát hiện gen lai BCR/ABL
60.	Định lượng gen bệnh máu ác tính bằng kỹ thuật Real - Time PCR
61.	Xét nghiệm phát hiện sự tồn tại của gen bệnh bằng kỹ thuật RT-PCR
62.	Phát hiện gene JAK2 V617F bằng kỹ thuật AS- PCR
63.	Xét nghiệm phát hiện đột biến gene bằng kỹ thuật Multiplex PCR ( phát hiện cùng lúc nhiều đột biến)
64.	Định lượng virus Cytomegalo (CMV) bằng kỹ thuật Real Time PCR
65.	Phát hiện đảo đoạn intron 22 của gen yếu tố VIII bệnh Hemophilia bằng kỹ thuật longrange PCR.
<b>Chương IV. Truyền máu</b>	
66.	Xét nghiệm hòa hợp miễn dịch phát máu ở 22°C (kỹ thuật ống nghiệm)
67.	Nghiệm pháp coombs trực tiếp (phương pháp ống nghiệm)
68.	Nghiệm pháp coombs gián tiếp (phương pháp ống nghiệm)
69.	Định nhóm máu hệ Rh D (yếu) (kỹ thuật ống nghiệm)
70.	Xác định kháng nguyên C của hệ Rh (kỹ thuật ống nghiệm)
71.	Xác định kháng nguyên c của hệ Rh (kỹ thuật ống nghiệm)
72.	Xác định kháng nguyên E của hệ Rh (kỹ thuật ống nghiệm)
73.	Xác định kháng nguyên e của hệ Rh (kỹ thuật ống nghiệm)
74.	Xác định kháng nguyên K của hệ KELL (kỹ thuật ống nghiệm)
75.	Xác định kháng nguyên k của hệ KELL (kỹ thuật ống nghiệm)
76.	Xác định kháng nguyên Jka của hệ kidd (kỹ thuật ống nghiệm)
77.	Xác định kháng nguyên Jkb của hệ kidd (kỹ thuật ống nghiệm)
78.	Xác định kháng nguyên S của hệ MNS (kỹ thuật ống nghiệm)
79.	Xác định kháng nguyên P1 của hệ P1PK (kỹ thuật ống nghiệm)
80.	Xác định kháng nguyên Lea của hệ MNS (kỹ thuật ống nghiệm)
81.	Xác định kháng nguyên Leb của hệ MNS (kỹ thuật ống nghiệm)
82.	Xác định kháng nguyên Kpa của hệ KELL (kỹ thuật ống nghiệm)
83.	Xác định kháng nguyên Kpb của hệ KELL (kỹ thuật ống nghiệm)
84.	Xác định kháng nguyên M của hệ MNS (kỹ thuật ống nghiệm)
85.	Xác định kháng nguyên N của hệ MNS (kỹ thuật ống nghiệm)
86.	Xác định kháng nguyên Fya của hệ DUFFY (kỹ thuật ống nghiệm)
87.	Xác định kháng nguyên Fyb của hệ DUFFY (kỹ thuật ống nghiệm)
88.	Xác định kháng nguyên s của hệ MNS (kỹ thuật ống nghiệm)
89.	Xác định kháng nguyên Lua của hệ Lutheran (kỹ thuật ống nghiệm)
90.	Xác định kháng nguyên Lub của hệ Lutheran (kỹ thuật ống nghiệm)
91.	Xác định kháng nguyên C của hệ Rh (phương pháp gelcard)
92.	Xác định kháng nguyên c của hệ Rh (phương pháp gelcard)

93.	Xác định kháng nguyên E của hệ Rh (phương pháp gelcard)
94.	Xác định kháng nguyên e của hệ Rh (phương pháp gelcard)
95.	Xác định kháng nguyên K của hệ KELL (phương pháp gelcard)
96.	Xác định kháng nguyên k của hệ KELL (phương pháp gelcard)
97.	Xác định kháng nguyên Kp <sup>a</sup> của hệ KELL (phương pháp gelcard)
98.	Xác định kháng nguyên Kp <sup>b</sup> của hệ KELL (phương pháp gelcard)
99.	Xác định kháng nguyên Fy <sup>a</sup> của hệ DUFFY (phương pháp gelcard)
100.	Xác định kháng nguyên Fy <sup>b</sup> của hệ DUFFY (phương pháp gelcard)
101.	Xác định kháng nguyên Jk <sup>a</sup> của hệ kidd (phương pháp gelcard)
102.	Xác định kháng nguyên Jk <sup>b</sup> của hệ kidd (phương pháp gelcard)
103.	Xác định kháng nguyên Le <sup>a</sup> của hệ LEWIS (phương pháp gelcard)
104.	Xác định kháng nguyên Le <sup>b</sup> của hệ LEWIS (phương pháp gelcard)
105.	Xác định kháng nguyên s của hệ MNS (phương pháp gelcard)
106.	Xác định kháng nguyên S của hệ MNS (phương pháp gelcard)
107.	Xác định kháng nguyên M của hệ MNS (phương pháp gelcard)
108.	Xác định kháng nguyên N của hệ MNS (phương pháp gelcard)
109.	Xác định kháng nguyên Lu <sup>a</sup> của hệ Lutheran (phương pháp gelcard)
110.	Xác định kháng nguyên Lu <sup>b</sup> của hệ Lutheran (phương pháp gelcard)
111.	Xác định kháng nguyên P1 của hệ P1PK (phương pháp gelcard)
112.	Xác định kháng nguyên D từng phần (D <sup>VI</sup> ) (phương pháp gelcard)
113.	Sàng lọc kháng thể bất thường (kỹ thuật ống nghiệm)
114.	Sàng lọc kháng thể bất thường (phương pháp gelcard)
115.	Định danh kháng thể bất thường (kỹ thuật ống nghiệm)
116.	Định danh kháng thể bất thường (phương pháp gelcard)
117.	Gan tế bào máu từ máu ngoại vi (Dành cho người hiến máu thành phần)
<b>Chương V. Công nghệ Tế bào gốc</b>	
118.	Tuyển chọn người cho và huy động tế bào gốc
119.	Thu nhận máu dây rốn
120.	Thu nhận tế bào gốc từ máu ngoại vi sau huy động
121.	Thu nhận tế bào lympho từ người hiến
122.	Thu nhận tế bào gốc từ tủy xương
123.	Phân lập tế bào gốc bằng túi lấy máu
124.	Phân lập tế bào gốc từ máu dây rốn bằng phương pháp ly tâm có sử dụng HES
125.	Phân lập tế bào gốc bằng ống ly tâm 50ml, không sử dụng hóa chất
126.	Cô đặc và tinh sạch tế bào gốc bằng ống Res-Q60
127.	Phân lập tế bào gốc bằng phương pháp ly tâm phân lớp theo tỷ trọng sử dụng FICOLL
128.	Phân lập tế bào gốc bằng hệ thống tự động SEPAX
129.	Phân lập tế bào gốc máu dây rốn bằng hệ thống tự động AXP
130.	Phân lập tế bào gốc từ dịch hút tủy xương bằng máy COMTEC

131.	Phân lập tế bào gốc từ dịch hút tủy xương bằng máy HARVEST-TERUMO
132.	Bảo quản đông lạnh tế bào gốc tạo máu bằng bình nitơ lỏng
133.	Rã đông khối tế bào gốc đông lạnh
134.	Đánh giá tỷ lệ sống của tế bào bằng kỹ thuật nhuộm xanh Tryban
135.	Nuôi cấy cụm tế bào gốc tạo máu
136.	Vận chuyển tế bào gốc sau bảo quản
137.	Định nhóm HLA độ phân giải cao bằng kỹ thuật SSO – Luminex
<b>Chương VI. Huyết học lâm sàng</b>	
138.	Trao đổi huyết tương
139.	Gạn bạch cầu điều trị
140.	Gạn tiểu cầu điều trị
141.	Truyền hóa chất đường tĩnh mạch
142.	Truyền máu tại giường
143.	Rút máu
144.	Chọc tủy sống lấy dịch não tủy làm xét nghiệm
145.	Chọc tủy sống tiêm hóa chất nội tủy
146.	Ghép tế bào gốc tạo máu tự thân
147.	Ghép tế bào gốc tạo máu đồng loại

(Tổng số 147 quy trình kỹ thuật)

**KT. BỘ TRƯỞNG  
THỨ TRƯỞNG**

**Đã ký**

**Nguyễn Thị Xuyên**

# CHƯƠNG I. HUYẾT HỌC TẾ BÀO (Cell-Hematology)

## NHUỘM HÓA HỌC TẾ BÀO

(CYTOCHEMICAL STAIN)

### I. NGUYÊN LÝ

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

#### 1. Nguyên tắc chung

**Tất cả các phương pháp nhuộm hóa học tế bào đều bao gồm ba giai đoạn:**

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

- *Nhuộm*: Dùng các thuốc nhuộm (Soudan Black) hay các cơ chất (benzidin,  $\infty$  naphtol acetat,...) để trực tiếp hoặc gián tiếp làm hiện màu các thành phần cần khảo sát.

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

#### 2. Đảm bảo tiêu bản khô, sạch ở mỗi bước kỹ thuật

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

### II. CHỈ ĐỊNH

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

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

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Cử nhân kỹ thuật, kỹ thuật viên Huyết học – Truyền máu thuộc nhóm kỹ thuật chuyên sâu thực hiện quy trình này.

## **2. Phương tiện – Hóa chất**

Hiện nay, hầu hết các Labo Huyết học – Tế bào đều sử dụng các phương pháp nhuộm hóa học tế bào bằng cách cố định tiêu bản bằng hơi formol 40% và dung dịch cồn formol 10%.

Mặc dù có thể sử dụng hóa chất của các hãng khác nhau, nhưng để đạt được hiệu quả tốt thì việc chuẩn bị các phương tiện để tiến hành kỹ thuật cũng có điểm chung như:

### **2.1. Dụng cụ**

- Bể nhuộm thủy tinh dung tích 100ml: 2 chiếc;
- Bàn sấy, quạt sấy tiêu bản: 1 chiếc;
- Bain - marie (bình cách thủy) có điều chỉnh nhiệt độ;
- Pipette Pasteur:  $\geq 4$  cái/1 tiêu bản;
- Pipette man loại 100 - 1000 $\mu$ l: 1- 2 cái, kèm đầu côn;
- Gạc thấm: 2 cái/ 1 tiêu bản;
- Lam kính làm tiêu bản theo nhu cầu;
- Giá cài tiêu bản: sử dụng theo số xét nghiệm;
- Kính hiển vi + dầu soi.

### **2.2. Hóa chất**

- Cồn formol 10%: 100ml cho một đợt dùng;
- Cơ chất cho phản ứng: Soudan black, periodic acid shiff, benzidin, Naphthol acetat...;
- Các hóa chất đệm phản ứng: Tris, TBS, PO4-3,...;
- Các hóa chất nhuộm nền như: Hematoxyllin, Giemsa, Nuclear Fastred...

## **3. Bệnh phẩm**

- Sử dụng tiêu bản tủy xương hoặc tiêu bản máu ngoại vi (theo chỉ định);
- Tiêu bản được sấy khô và ghi các ký hiệu của kỹ thuật cần làm.

## **4. Phiếu xét nghiệm**

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Trước khi tiến hành cần làm các thao tác sau:

- Kiểm tra thông tin tiêu bản (tên, tuổi người bệnh);
- Ghi ký hiệu trên tiêu bản (ví dụ: PAS, Peroxydase, Soudan Black ...);
- Làm khô tiêu bản;



- Tiến hành từng bước kỹ thuật:

+ Cố định tiêu bản (máu, tủy) trong cồn formol 10% hoặc hơi formol 40%: 10 phút.

+ Rửa dưới dòng nước chảy mạnh (đối với cố định bằng cồn formol 10%), rửa nhẹ nhàng (đối với cố định bằng hơi formol 40%) rồi sấy khô tiêu bản: thường khoảng 5 – 10 phút.

+ Nhuộm với cơ chất tùy từng loại xét nghiệm. Tùy theo mỗi loại xét nghiệm và cơ chất mà để thời gian phù hợp, tạo điều kiện cho phản ứng hiệu quả.

+ Rửa dưới dòng nước chảy mạnh để loại bỏ hóa chất còn lại sau phản ứng và các tạp bản trên tiêu bản → sấy khô tiêu bản.

+ Nhuộm nền: Tùy theo mỗi loại xét nghiệm mà có hóa chất và thời gian nhuộm khác nhau để có chất lượng tốt.

+ Rửa dưới dòng nước chảy mạnh → sấy khô và làm đẹp, hoàn thiện tiêu bản.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

### **1. Đánh giá mức độ dương tính**

Độ 0: Không có hạt bắt màu hóa học tế bào là (-).

Độ 1: Các hạt bắt màu chiếm khoảng  $\leq 1/3$  bào tương tế bào là (+).

Độ 2: Các hạt bắt màu chiếm khoảng  $>1/3$  đến  $< 3/4$  bào tương tế bào là (++) .

Độ 3: Các hạt bắt màu chiếm hết bào tương tế bào là (+++).

Độ 4: Các hạt bắt màu chiếm hết bào tương và đề lên cả nhân tế bào là (++++).

### **2. Tính điểm (score)**

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

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

## **VII. THEO DÕI**

Ở mỗi phương pháp nhuộm đều đòi hỏi nồng độ hóa chất và thời gian phản ứng khác nhau. Vì vậy, người tiến hành kỹ thuật phải theo dõi được thời gian phản ứng của mỗi xét nghiệm để chọn thời gian tối ưu cho phản ứng. Việc đó góp phần quan trọng đến việc có tạo ra sản phẩm chất lượng cao hay không.

## **VIII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

Nhuộm hóa học tế bào đòi hỏi chặt chẽ về nồng độ hóa chất, thời gian phản ứng và điều kiện phản ứng. Nếu xảy ra sự cố thì xử trí bằng cách thực hiện quy chuẩn về các điều kiện cho mỗi loại xét nghiệm.

## **TÌM ẤU TRÙNG GIUN CHỈ (Phương pháp thủ công)** **(Filariasis's larva Test by manual method)**

### **I. NGUYÊN LÝ**

- Ấu trùng giun chỉ được truyền từ người này sang người khác qua muỗi đốt và phát triển thành giun chỉ trưởng thành trong hệ bạch huyết, cản trở tuần hoàn bạch huyết, gây phù chân voi.

- Giun chỉ đẻ ra ấu trùng, ấu trùng chui qua ống bạch huyết vào máu.

- Ấu trùng lưu hành trong máu, thường xuất hiện ở máu ngoại vi vào ban đêm (từ 20h đến 4h).

### **II. CHỈ ĐỊNH**

- Những người cần chỉ định làm xét nghiệm bao gồm: có biểu hiện lâm sàng nghi ngờ nhiễm giun chỉ; những người đã và đang sinh sống ở vùng có giun chỉ lưu hành.

- Lấy máu ngoại vi vào ban đêm; tốt nhất lấy máu vào khoảng thời gian từ 20h đến 2h sáng.

- Có thể lấy máu tìm ấu trùng vào ban ngày khi dùng thuốc kích thích Diethylcarbazine (D.E.C).

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

Kỹ thuật viên lấy máu mao mạch trực tiếp cho người bệnh tại phòng xét nghiệm, bệnh phòng hay tại địa phương.

#### **2. Phương tiện - Hóa chất**

##### **2.1. Dụng cụ**

- Phiếu xét nghiệm;
- Lam kính khô, sạch;
- Giá nhuộm, giá cài tiêu bản;
- Kim chích máu vô khuẩn;
- Bông thấm nước vô khuẩn;
- Khay men (nếu cần);
- Ống đong;
- Pipette nhỏ giọt;

- Đũa thủy tinh;
- Đồng hồ;
- Kính hiển vi.

## **2.2. Hóa chất**

- Cồn sát trùng 70°;
- Giemsa mẹ;
- Dung dịch Formalin 2%;
- Nước cất hoặc dung dịch đệm.

## **3. Người bệnh**

- Về mùa lạnh, người bệnh nên nhúng tay vào nước ấm khoảng 5 phút trước khi lấy máu.

- Tốt nhất nên lấy máu vào ban đêm (từ 20h - 2h sáng).

- Nếu lấy máu vào ban ngày: cho người bệnh uống Diethylcarbazine (D.E.C) với liều 2mg/1kg cân nặng (khoảng 0.1g cho 1 người), sau 15- 30 phút lấy máu làm xét nghiệm. Với cách này, mật độ ấu trùng được phát hiện bằng khoảng 20 - 40% so với kỹ thuật lấy máu xét nghiệm ban đêm. Phương pháp này cũng cần cẩn thận khi áp dụng ở những vùng có giun chỉ B.malayi, vì có thể xảy ra phản ứng sốt.

## **4. Hồ sơ bệnh án**

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy máu làm xét nghiệm**

- Đánh mã số của người bệnh lên tiêu bản.

- Sát khuẩn đầu ngón tay đeo nhẫn bằng cồn 70°, để khô.

- Dùng kim chích vô khuẩn đâm nhanh vào vị trí sát khuẩn với độ sâu vừa phải.

- Lấy 3 giọt máu cách đều trên lam kính, mỗi giọt khoảng 20mm<sup>3</sup>. Khối lượng máu lấy làm xét nghiệm là 60mm<sup>3</sup>.

- Dùng đũa thủy tinh đánh tròn các giọt máu sao cho mỗi giọt máu có đường kính 1.5cm, để khô tự nhiên. Tiêu bản nên để khô 24 giờ thì nhuộm, nhưng cũng không nên để lâu quá.

### **2. Nhuộm tiêu bản**

- Pha dung dịch Giemsa với dung dịch đệm hoặc nước cất trung tính (pH = 7), nồng độ 1-5%.

- Phủ kín tiêu bản bằng dung dịch Giemsa trên, nhuộm từ 30– 60 phút tùy theo nồng độ của dung dịch Giemsa. Trung bình mỗi tiêu bản cần khoảng 2ml dung dịch nhuộm.

- Tráng nhẹ nhàng bằng nước thường cho trôi hết Giemsa.

- hong khô tự nhiên tiêu bản trên giá.

- Tiêu bản sau khi nhuộm đạt yêu cầu khi soi trên kính hiển vi: ấu trùng bắt màu tím trên nền màu hồng nhạt; Các hạt nhiễm sắc và hạch nhân bắt màu rõ.

### 3. Soi, phát hiện ấu trùng

- Soi phát hiện ấu trùng giun chỉ bằng vật kính x 10.

- Soi định loại bằng vật kính x 40.

- Soi toàn bộ diện tích 3 giọt máu, soi theo hình chữ chi.

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Đếm số lượng ấu trùng có trên 3 giọt máu, sơ bộ đánh giá mật độ ấu trùng có trên  $60\text{mm}^3$  máu.

### *Đặc điểm nhận dạng ấu trùng giun chỉ:*

<b>Đặc điểm</b>	<b>W. bancrofti</b>	<b>B. malayi</b>
Thời gian xuất hiện ở máu ngoại vi	Từ 20h đến 4h sáng.	Từ 20h đến 6h sáng.
Kích thước	200 $\mu\text{m}$	220 $\mu\text{m}$
Hình thể	Đều, mềm mại, xoắn ít.	Có thể không đều, xoắn nhiều.
Màng áo	Dài hơn thân một ít.	Dài hơn thân nhiều.
Đầu	Có một gai.	Có 2 gai.
Hạt nhiễm sắc	Ít và rõ, tròn.	Nhiều và không rõ, sát nhau.
Hạt nhiễm sắc cuối đuôi	Không đi đến cuối đuôi.	Đi đến cuối đuôi, có một hạt tách riêng ra, đi đến tận cùng đuôi.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Lượng máu lấy không đủ.

- Lấy máu vào thời gian giun chỉ không xuất hiện ở máu ngoại vi, hoặc lấy máu quá sớm hay quá muộn sau khi uống D.E.C

# **TÌM KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT**

## **(Phương pháp thủ công)**

### **(Malaria parasite Test by manual method)**

#### **I. ĐẠI CƯƠNG**

- Ký sinh trùng sốt rét (KSTSR) kí sinh ở người, vật chủ trung gian truyền bệnh là muỗi Anopheles.

- KSTSR xuất hiện nhiều nhất ở máu ngoại vi, khi người bệnh bắt đầu lên cơn sốt hay trong khi đang sốt.

- Máu được lấy để tìm KSTSR từ tĩnh mạch, chống đông bằng EDTA hoặc lấy trực tiếp từ mao mạch (bằng cách chích đầu ngón tay, dái tai hay gót chân).

- Ký sinh trùng sốt rét được tìm thấy bằng cách soi giọt máu dày hoặc giọt máu đàn trên kính hiển vi. Giọt máu được nhuộm bằng Giemsa loãng.

- Mật độ KSTSR được tính trên mật độ bạch cầu hoặc được tính bằng thang điểm (+) trên giọt đặc.

- Phân loại KSTSR theo tiêu chuẩn quy định.

#### **II. CHỈ ĐỊNH**

- Người bệnh có biểu hiện lâm sàng nghi ngờ nhiễm KSTSR;
- Người bệnh đã và đang sinh sống ở vùng có sốt rét lưu hành;
- Người bệnh mới từ vùng sốt rét trở về.

#### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

#### **IV. CHUẨN BỊ**

##### **1. Người thực hiện**

- Điều dưỡng lấy máu tĩnh mạch.
- Kỹ thuật viên lấy máu mao mạch trực tiếp tại phòng xét nghiệm hay tại địa phương, kết hợp làm kỹ thuật.

##### **2. Phương tiện - Hóa chất**

###### **2.1. Dụng cụ**

- Phiếu xét nghiệm;
- Lam kính khô, sạch;
- Lam kéo có cạnh nhẵn;
- Kim chích máu vô khuẩn;

- Bông thấm nước vô khuẩn;
- Băng dính cầm máu;
- khay men;
- Ống đong các loại: 10ml, 20ml...;
- Pipette nhỏ giọt;
- Đũa thủy tinh;
- Giá nhuộm, giá cài tiêu bản;
- Đồng hồ;
- Máy sấy tiêu bản;
- Dầu soi kính;
- Kính hiển vi;
- Bút viết;
- Bút chì kính mềm;
- Găng tay, khẩu trang, trang phục bảo hộ lao động.

## **2.2. Hóa chất**

- Cồn sát trùng 70°;
- Cồn tuyệt đối 96°;
- Thuốc nhuộm Giemsa mẹ;
- Nước cất hoặc dung dịch đệm;
- Các dung dịch điều chỉnh pH: NaHPO<sub>4</sub> 2%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2%.

### **● Cách pha dung dịch đệm:**

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.7g;
- NaHPO<sub>4</sub>: 1.0g.

Lượng muối trên mỗi loại hòa tan trong 150ml nước cất, dùng đũa thủy tinh khuấy đều cho tan hết. Trộn 2 loại dung dịch trên, tiếp tục cho vừa đủ 1000ml. Khuấy đều, kiểm tra, điều chỉnh pH 7.2.

### **● Cách pha dung dịch Giemsa nhuộm:**

- Giemsa mẹ: 0.3 - 0.4ml.
- Dung dịch đệm hoặc nước cất: 9.7ml.

Trộn đều Giemsa mẹ và nước cất ta được dung dịch Giemsa 3 – 4%.

Thời gian nhuộm: 30 – 45 phút.

\* Nhuộm nhanh: Pha dung dịch Giemsa 10% (1ml Giemsa mẹ + 9ml dung dịch đệm). Thời gian nhuộm: 15 – 20 phút.

### 3. Người bệnh

Nên làm xét nghiệm cho người bệnh trước hoặc trong khi lên cơn sốt, lúc này khả năng tìm thấy KSTSR ở máu ngoại vi cao hơn.

### 4. Hồ sơ bệnh án

Giấy chỉ định xét nghiệm (biểu mẫu số...) ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: Họ tên, năm sinh, địa chỉ khoa/phòng, số giường, nơi cư trú, chẩn đoán, chỉ định xét nghiệm; Ghi rõ ngày, tháng, năm chỉ định, chữ ký bác sĩ ra y lệnh.

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Trường hợp máu được lấy từ tĩnh mạch: Khi tiếp nhận ống máu từ y tá bệnh phòng, tiến hành làm tiêu bản từ ống máu được chống đông bằng EDTA, mà không qua lấy máu mao mạch trực tiếp từ người bệnh được trình bày ở phần tiếp sau đây:

- Lấy máu làm tiêu bản trực tiếp (lấy máu mao mạch)
- + Sát khuẩn ngón tay chích máu bằng cồn 70°, chờ khô.
- + Dùng kim vô khuẩn chích vào vị trí sát khuẩn, sâu khoảng 1mm.
- + Lau bỏ giọt máu đầu bằng bông khô, sạch.
- + Vuốt nhẹ nhàng ngón tay vừa chích từ trên xuống dưới.
- + Dùng lam kính sạch áp nhẹ vào giọt máu thứ 2, giọt máu cách đầu lam 2cm.
- + Giọt máu thứ 3 cũng lấy bằng cách áp lam tương tự như giọt máu thứ 2, cách giọt máu thứ 2 khoảng 1.5cm.
- + Dùng lam kính sạch khác đặt vào trung tâm giọt máu thứ 2 đánh theo hình xoắn ốc từ trong ra ngoài từ 5– 6 vòng để được giọt máu đặc có đường kính 0.9 - 1.0cm.
- + Tiếp theo, lấy lam kính kéo đặt lên phía trước giọt máu còn lại tạo thành góc 30° - 45°, lùi lam kéo về phía sau một chút để giọt máu được lan đều trên cạnh của lam kéo; đẩy từ từ lam kéo về phía trước, ta được giọt đàn.
- + Sát khuẩn tay cho người bệnh.
- + Để lam khô tự nhiên.
- + Đánh dấu tiêu bản bằng tên, mã số...theo quy định, tránh sai sót, nhầm lẫn.
- + Cố định giọt đàn bằng cồn tuyệt đối: nghiêng tiêu bản khoảng 30°, dùng pipette nhỏ giọt lấy cồn phủ lên giọt đàn, cài lên giá, để khô.



+ Giọt đặc thì không cố định. Nhưng đối với những trường hợp giọt đặc quá dày hay bản mốc thì phải dung giải bằng cách nhỏ nước cất hay Giemsa 1% trong 1- 2 phút, đổ nước, cắm lên giá, hong khô.

\* *Tiến hành nhuộm:*

- Xếp tiêu bản lên giá nhuộm, nhỏ dung dịch Giemsa phủ kín lên lam (Nồng độ Giemsa và thời gian nhuộm theo quy định).

- Rửa tiêu bản bằng nước sạch. Lưu ý đổ nước nhẹ nhàng vào góc lam để nước sạch dần thay thế Giemsa, tránh rửa mạnh làm trôi bệnh phẩm.

- hong lam khô tự nhiên.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

\* **Đọc kết quả:** Tìm KSTSR dưới KHV độ phóng đại 10 x 40 (để kiểm tra tiêu bản), sau đó đọc dưới độ phóng đại 10 x 100 tìm KSTSR theo chiều ngang tiêu bản, tuần tự tránh bỏ sót, hoặc theo chiều dọc, tránh trùng lên nhau. Đánh giá như sau:

- Soi 100 vi trường, thấy 1 KSTSR: (+);
- Soi 100 vi trường, thấy 10 KSTSR: (++);
- Soi 1 vi trường, thấy 1 KSTSR: (+++);
- Soi 1 vi trường, thấy 10 KSTSR: (++++).

\* Xác định loại KSTSR dựa trên hình thái và tiêu chuẩn chẩn đoán theo quy định.

## **VII. THEO DÕI**

- Theo dõi chặt chẽ người bệnh đi từ vùng có sốt rét lưu hành ra;
- Theo dõi những người bệnh nghi ngờ bị sốt rét, nên lấy máu tìm KSTSR trước hoặc trong khi người bệnh có cơn sốt;
- Cần theo dõi việc tái phát cho người có tiền sử sốt rét.

## **VIII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Chích đầu ngón tay không bỏ giọt máu đầu;
- Quá trình chích máu nặn bóp nhiều;
- Nhầm bệnh phẩm của người này sang người khác;
- Quá trình cố định, nhuộm không tốt gây bong tróc, trôi mất bệnh phẩm;
- Chẩn đoán sai do không bám sát tiêu chuẩn chẩn đoán.

**NHUỘM HÓA MÔ MIỄN DỊCH**  
**MẢNH SINH THIẾT TỬY XƯƠNG**  
**(Immunohistochemical stain on bone marrow biopsy)**

**I. NGUYÊN LÝ**

Nhuộm hóa mô miễn dịch mảnh sinh thiết tủy xương là phương pháp nhuộm sử dụng các kháng thể đã biết để xác định kháng nguyên có trong tổ chức tủy xương. Đây là kỹ thuật kết hợp phản ứng miễn dịch và hóa chất để làm hiện rõ các kháng nguyên hiện diện trong tế bào (bào tương, màng tế bào, nhân tế bào).

**II. CHỈ ĐỊNH**

- Nghi ngờ u lympho xâm lấn tủy xương;
- Nghi ngờ K di căn tủy xương;
- Nghi ngờ tăng sinh bất thường các dòng tế bào trong tủy xương.

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên hoặc cử nhân kỹ thuật chuyên khoa Huyết học – Truyền máu.

**2. Phương tiện - Hóa chất**

**2.1. Dụng cụ**

- Kính hiển vi quang học;
- Máy cắt tiêu bản;
- Bàn sấy 37°C;
- Lam kính chuyên dụng POLYSINED SNIDE;
- Bể nhuộm tiêu bản dung tích 100ml: 07 chiếc;
- Bể nhuộm tiêu bản dung tích 200ml: 07 chiếc;
- Lò vi sóng: 01 chiếc;
- Giá cài tiêu bản vừa bể nhuộm 200ml: 01 chiếc;
- Giá gỗ cài tiêu bản: 02 chiếc;
- Pipette man 0.2 -10 µl: 01 chiếc;
- Pipette man 100µl: 01 chiếc;
- Ống nghiệm vô trùng 2ml: 10 ống (tùy số maker cần sử dụng)

- Khay Inox 30 x 50 cm: 02 chiếc;
- Gạc thấm nước: 03 chiếc;
- Bút chì: 01 chiếc;
- Lamén 22 x 24 hoặc 22 x 22.

## 2.2. Hóa chất

- Toluén 1,2,3: để sẵn trong 3 bể nhuộm 100ml;
- Còn Etylic 80°, còn tuyệt đối 1,2 để sẵn trong bể nhuộm 100ml;
- Dung dịch đệm TBS (pH = 7,6);
- Dung dịch đệm Citrat Buffer (pH = 7,0);
- Dung dịch Hydroclorit (oxy già) 3%;
- Dung dịch Anti Dako Diluent;
- Kháng thể 1 (Anti Human – Tùy từng Marker);
- Kháng thể 2 (Envision + HRP – REF: K5007);
- Bộ định màu DAB + Chomogen (REF: K5007);
- Dung dịch Hematoxylin 5% 100ml;
- Boom Canada: Lấy ra cốc nhỏ, để trong tủ 60°C.

## 2.3. Pha hóa chất

### 2.3.1. Dung dịch TBS (pH = 7.6)

#### \* Dung dịch Tris HCL (1)

Tris	60.55 gram	30.27 gram
Axít HCL	35 ml	17.5 ml
Nước cất	1000 ml	500ml
Tổng sản phẩm	1035 ml	517.5 ml

#### \*Dung dịch NaCl (2)

Natriumchlorid (NaCl)	90 gram	45 gram
Nước cất	1000 ml	500 ml
Tổng sản phẩm	1000 ml	500 ml

⇒ **Dung dịch TBS gồm:** 100 ml (1) + 100 ml (2) + 800ml nước cất = 1000 ml chuẩn độ để đạt pH = 7,6.

### 2.3.2. Dung dịch Citrat buffer pH = 7.0

**\*Dung dịch (A):**

Acid acitric	21.01 gram	10.51 gram
Nước cất	1000 ml	500ml
Tổng sản phẩm	1000 ml	500 ml

**\* Dung dịch (B), pH= 6.0**

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	29.41 gram	14.71 gram
Nước cất	1000 ml	500ml
Tổng sản phẩm	1000 ml	500 ml

⇒ **Citrat buffer** gồm: 2ml (A) + 98ml (B) + 900ml nước cất(1000ml)

2.3.3. *Dung dịch kháng thể 1*: Là sự kết hợp của Anti Diluent (100µl/1 tiêu bản) với kháng thể đã biết (Anti Human) theo tỷ lệ khuyến cáo của nhà sản xuất và tùy từng maker sử dụng.

### 3. Bệnh phẩm

Lóc nền mảnh sinh thiết tủy xương.

### 4. Phiếu xét nghiệm

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Chuẩn bị tiêu bản

- Đúc khuôn parafin mảnh sinh thiết tủy xương đã được xử lý, làm nguội và để trong tủ lạnh 2-8°C.

- Cắt tiêu bản mỏng 0,2 µm, dán trên lam kính chuyên dụng.

- Sấy khô tiêu bản trong tủ ẩm 37°C trong thời gian 12 giờ.

### 2. Tiến hành nhuộm

Thực hiện theo quy trình sau ở điều kiện tiêu bản luôn ẩm:

- Ngâm tiêu bản trong dung dịch Toluene (15 phút), cồn 80° (5 phút) và cồn tuyệt đối (10 phút).

- Rửa dưới nước chảy nhẹ: 5 phút.

- Tráng tiêu bản qua dd TBS (pH = 7,6) trong vài giây → Cho vào đệm Citratebuffer (pH = 7.0) và đun trong lò vi sóng: 15 phút (ở chế độ M.Hight).

- Để nguội tự nhiên ở nhiệt độ phòng đến ≤ 40°C.

- Rửa bằng dd TBS (pH = 7,6): 3 lần (lần đầu tráng qua, lần 2 & 3 mỗi lần 5 phút).

- Ngâm trong dung dịch Oxy (Hydrogen peoxide) già 3%: 3 phút

- Tráng qua nước cất 2 lần (dùng bình bóp).
- Cho qua dung dịch TBS (pH = 7,6): 3 lần
- Cho tiêu bản ra giá và ủ kháng thể 1(100 - 200 $\mu$ l/lam): 30 phút.
- Rửa bằng dung dịch TBS (pH = 7,6): 3 lần, lau khô xung quanh mảnh.
- Phủ kháng thể 2 (Envision + HRP): 30 phút.
- Rửa bằng dung dịch TBS (pH = 7,6): 3 lần, lau khô xung quanh mảnh.
- Phủ dung dịch DAB (Tỷ lệ: 1ml buffer + 10  $\mu$ l chromogen): 5–10 giây, kết thúc ở 5 phút.
- Rửa qua nước cất 2 bằng bình bóp rồi cài vào giá trong bể nhuộm có sẵn nước cất 2 lần.
- Nhuộm Hematoxylin: 1 phút.
- Tráng còn tuyệt đối, ngâm tiêu bản trong Toluene → gắn lam, để khô và nhận định kết quả.

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Việc nhận định kết quả hình thái được khẳng định ở hai tiêu chí: âm tính và dương tính.

**Âm tính:** Trên kính hiển vi quan sát thấy nhân của các tế bào bắt màu xanh tím của Hematoxylin, nguyên sinh chất không có biểu hiện gì.

**Dương tính:** Nếu có sự hiện diện kháng nguyên trên tế bào, phức hợp kháng nguyên – kháng thể – DAB Chromogen sẽ cho màu vàng nâu trên nguyên sinh chất của tế bào, nhân của tế bào bắt màu xanh tím của Hematoxylin.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Để lam khô trong quá trình nhuộm;
- Thực hiện không đầy đủ theo quy trình kỹ thuật;
- Xử lý mảnh sinh thiết không tốt;
- Thời gian nhuộm các bước không phù hợp;
- Kỹ năng của người thực hiện kỹ thuật chưa ổn định.

# **NHUỘM SỢI XƠ TRONG MÔ TỬY XƯƠNG**

## **(Phương pháp sợi Collagen Van Gieson)**

### **(Van Gieson's stain on bone marrow biopsy)**

#### **I. NGUYÊN LÝ**

Nhuộm sợi collagen là phương pháp kết hợp ba màu gồm: một chất nhuộm nhân Hematoxylinferric, một chất nhuộm bào tương bằng Picro Fuchsin và một màu trọng lực của collagen là Solution Van Gieson.

#### **II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp bệnh lý có tăng sinh xơ trong tủy xương ( hội chứng tăng sinh tủy...).

#### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

#### **IV. CHUẨN BỊ**

##### **1. Người thực hiện**

01 Kỹ thuật viên hoặc Cử nhân kỹ thuật y có kiến thức chuyên khoa.

##### **2. Phương tiện - Hóa chất**

###### **2.1. Dụng cụ**

- Kính hiển vi quang học;
- Máy cắt tiêu bản;
- Bàn sấy 37°C;
- Lam kính sạch, mờ một đầu;
- Bể nhuộm tiêu bản dung tích 100ml: 06 chiếc;
- Bể nhuộm tiêu bản dung tích 200ml: 02 chiếc;
- Giá cài tiêu bản vừa bể nhuộm 200ml: 01 chiếc;
- Giá gỗ cài tiêu bản: 02 chiếc;
- Pipette Pasteur: 05 chiếc;
- Gạc thấm nước: 03 chiếc;
- Bút chì: 01 chiếc;
- Lam 22 x 24 hoặc 22 x 22

###### **2.2. Hóa chất**

- Toluene 1,2,3: để sẵn trong 3 bể nhuộm 100ml;
- Cồn Etylic 80°, cồn tuyệt đối 1,2 để sẵn trong bể nhuộm 100ml;

- Dung dịch Hematoxylinferric;
- Dung dịch Picro Fuchsin;
- Dung dịch Solution Vă Gieson;
- Boom Canada: ĐỂ nóng chảy ở 60°C lượng vừa phải.

### **3. Bệnh phẩm**

Lóc nên mảnh sinh thiết tủy xương.

### **4. Phiếu xét nghiệm**

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Chuẩn bị tiêu bản**

- Đúc khuôn parafin mảnh sinh thiết tủy xương đã được xử lý, làm nguội và để lạnh 2–8°C.

- Cắt tiêu bản mỏng 0,2  $\mu\text{m}$ , dán trên lam kính.
- Sấy khô tiêu bản trong tủ ẩm 37°C trong thời gian 3 giờ.

### **2. Tiến hành nhuộm**

- Ngâm tiêu bản trong dung dịch Toluen (15 phút), cồn 80° (5 phút) và cồn tuyệt đối (10 phút);

- Rửa dưới dòng nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Nhuộm dung dịch Hematoxylinferric: 5–10 phút;
- Rửa dưới nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Nhuộm trong dung dịch Picro Fuchsin: 3–5 phút;
- Rửa dưới nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Nhuộm dung dịch Solution Van Gieson: 1– 3 phút;
- Rửa dưới nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Nhúng trong cồn 95°: 10 giây;
- Loại bỏ nước bằng cồn tuyệt đối;
- Loại bỏ cồn, làm trong bằng Toluen;
- Gắn Boom Canada và sấy khô tiêu bản.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Việc nhận định kết quả được tiến hành trên kính hiển vi quang học. Các sợi Collagen có màu đỏ đậm trên nền nhân tế bào có màu xanh đen.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Tiêu bản không được đảm bảo gắn chặt trên lam, thời gian để khô chưa đạt;
- Rửa nước không kỹ sau mỗi bước nhuộm hóa chất;

- Thời gian nhuộm không đúng quy trình chuẩn, hoặc tùy kích thước của bệnh phẩm mà có thời gian nhuộm khác nhau;
- Kỹ năng chuyên môn của kỹ thuật viên chưa tốt.



**NHUỘM SỢI LIÊN VÕNG TRONG MÔ TỬY XƯƠNG**  
**(Phương pháp Gomori)**  
**(Gomori's trichrome stain on bone marrow biopsy)**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Nhuộm sợi liên võng trong mô tủy xương là phương pháp nhuộm nhằm phát hiện các sợi liên võng dựa trên việc sử dụng một muối Bạc không bền vững (thường là Nitrat bạc ammoniac) và một chất khử thông dụng là fomaldehyt, chất khử sẽ khử muối bạc thành bạc (Ag) loại có màu đen lắng đọng trên các sợi liên võng.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp có tăng sinh sợi liên võng trong tủy xương.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

01 Kỹ thuật viên hoặc Cử nhân kỹ thuật y có kiến thức chuyên khoa.

### **2. Phương tiện, hóa chất**

#### **2.1. Dụng cụ**

- Kính hiển vi quang học;
- Máy cắt tiêu bản;
- Bàn sấy 37°C;
- Lam kính sạch, mờ một đầu;
- Bể nhuộm tiêu bản dung tích 100ml: 07 chiếc;
- Bể nhuộm tiêu bản dung tích 200ml: 02 chiếc;
- Giá cài tiêu bản vừa bể nhuộm 200ml: 01 chiếc;
- Giá gỗ cài tiêu bản: 02 chiếc;
- Pipette Pasteur 05 chiếc;
- Gạc thấm nước: 03 chiếc;
- Bút chì: 01 chiếc;
- Lamén 22 x 24 hoặc 22 x 22.

#### **2.2. Hóa chất**

- Toluén 1,2,3: để sẵn trong 3 bể nhuộm 100ml;
- Cồn Etylic 80°, cồn tuyệt đối 1,2 để sẵn trong bể nhuộm 100ml;

- Dung dịch Fomaldehyt 20%;
- Dung dịch  $\text{KMnO}_4$  0,5%;
- Nước cất hai lần;
- Dung dịch Natribisulfit  $\text{Na}_2\text{SO}_5$  2%;
- Dung dịch Sulfatdefer triamonium 2%;
- Dung dịch Nitrat bạc amoniac;
- Dung dịch Cloruađor 0,2%;
- Dung dịch metabisulfit 2%;
- Dung dịch Hyposulfit 2%;
- Boom Canada: Để nóng chảy ở  $60^\circ\text{C}$  lượng vừa phải.

### 3. Bệnh phẩm

Lóc nền mảnh sinh thiết tủy xương.

### 4. Phiếu xét nghiệm

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Chuẩn bị tiêu bản

- Đúc khuôn parafin mảnh sinh thiết tủy xương đã được xử lý, làm nguội và để lạnh  $2-8^\circ\text{C}$ .

- Cắt tiêu bản mỏng  $0,2\ \mu\text{m}$ , dán trên lam kính.
- Sấy khô tiêu bản trong tủ ẩm  $37^\circ\text{C}$  trong thời gian 3 giờ.

### 2. Tiến hành nhuộm

- Ngâm tiêu bản trong dung dịch Toluene (15 phút), cồn  $80^\circ$  (5 phút) và Cồn tuyệt đối (10 phút);

- Rửa dưới nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Oxy hóa trong dung dịch  $\text{KMnO}_4$  0,5%: 1–2 phút;
- Rửa dưới dòng nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Biệt hóa trong dung dịch  $\text{Na}_2\text{SO}_5$  2%: 3–5 phút;
- Rửa dưới dòng nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Làm nhạy bằng dung dịch Sulfatdefer triamonium 2%: 5 phút;
- Rửa dưới dòng nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Tắm trong dung dịch Nitrat bạc amoniac: 1 phút;
- Ngâm trong nước cất: 20 phút;
- Khử trong dung dịch fomandehyt 20%: 3 phút;
- Rửa dưới dòng nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Ngâm trong dung dịch Cloruađor 0,2%: 10 phút;

- Rửa trong nước cất: 5 phút;
- Chuyển qua dung dịch metabisulfit 2%: 1 phút;
- Cố định trong Hyposulfit 2%: 1 phút;
- Rửa dưới nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Loại bỏ nước bằng cồn tuyệt đối;
- Ngâm trong toluen và gắn Boom canada;
- Sấy khô tiêu bản.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Việc nhận định kết quả được tiến hành trên kính hiển vi quang học. Sợi liên võng có màu nâu đen.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Tiêu bản không được đảm bảo gắn chặt trên lam, thời gian để khô chưa đạt;
- Rửa nước không kỹ sau mỗi bước nhuộm hóa chất;
- Nước cất không chuẩn;
- Dụng cụ thủy tinh, bề nhuộm không sạch.

### **Lưu ý:**

- Chỉ dùng dụng cụ là thủy tinh và sạch;
- Tuyệt đối không dùng dụng cụ kim loại;
- Chỉ dùng hóa chất tinh khiết;
- Nơi tiến hành kỹ thuật phải hạn chế bụi làm hỏng các dung dịch.

# **XÉT NGHIỆM TẾ BÀO TRONG DỊCH NÃO TỦY**

**(phương pháp thủ công)**  
**(Cerebrospinal fluid Test by manual method)**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Bình thường dịch não tủy trong suốt, có ít tế bào. Xét nghiệm tế bào trong dịch não tủy là xác định số lượng và thành phần tế bào có trong dịch này. Đây là xét nghiệm có ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán, theo dõi và điều trị bệnh.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

- Nghi ngờ viêm màng não tủy.
- Theo dõi trong điều trị bệnh máu (u lympho, lơ xê mi cấp...).

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên hoặc cử nhân kỹ thuật y có kiến thức chuyên khoa.

### **2. Phương tiện – Hóa chất**

#### **2.1 Dụng cụ**

- Kính hiển vi quang học;
- Máy ly tâm;
- Lam kính khô, sạch;
- Bàn sấy hoặc quạt sấy tiêu bản;
- Pipette Pasteur và quả bóp ;
- Ống nghiệm nhỏ khô sạch;
- Buồng đếm tế bào (loại buồng đếm tế bào trong dịch não tủy);
- khay inox quả đậu;
- Gạc sạch;
- Băng dính vải hoặc băng dính giấy;
- Dụng cụ lập công thức bạch cầu (bàn bấm hoặc có thể dùng viên bi, sỏi).

#### **2.2. Hóa chất**

- Cồn tuyệt đối ;
- Dung dịch Giemsa mẹ ;
- Acid axetic ;
- Nước cất ;

- Dầu soi kính hiển vi.

### **3. Bệnh phẩm**

Là mẫu bệnh phẩm dịch não tủy đựng trong ống nghiệm sạch đảm bảo các điều kiện:

- Miệng ống nghiệm được đậy nắp kín.
- Ống nghiệm có đầy đủ thông tin hành chính về tên, tuổi, giường, khoa của người bệnh phù hợp với giấy xét nghiệm.

### **4. Phiếu xét nghiệm**

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Trước khi đếm, xác định số lượng và màu sắc dịch, sau đó lắc nhẹ ống bệnh phẩm rồi hút dịch chia sang 2 ống nghiệm đều nhau. Tiến hành kỹ thuật với các trường hợp dưới đây:

### **1. Trường hợp không có tế bào trong dịch**

- Bước 1: Hút một ít dịch nhỏ lên lam kính và tiến hành soi tươi để xác định sự có mặt của tế bào trong dịch.
- Bước 2: Tiến hành trả lời kết quả xét nghiệm gồm các yếu tố: Số lượng dịch, màu sắc dịch và sự có mặt hay không tế bào trong dịch.

### **2. Trường hợp có tế bào trong dịch não tủy**

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

- Với buồng đếm Nageotte: Loại buồng đếm để đếm tế bào trong dịch não tủy có thể tích chung  $50\text{mm}^3$ . Chia làm 40 băng, kẻ theo chiều ngang của buồng đếm, mỗi băng có thể tích  $1.25\text{mm}^3$ . Đếm số lượng bạch cầu trên 4 băng không liên tiếp (mỗi băng đếm cách 1 băng liền kề) được bao nhiêu, chia cho 5 để có số lượng bạch cầu trong  $1\text{mm}^3$  dịch.

- Với buồng đếm Goriaep: Đếm số lượng bạch cầu trong các khu vực dùng để đếm bạch cầu, được bao nhiêu nhân với 62.5 rồi chia cho 25, ta được số lượng bạch cầu trong  $1\text{mm}^3$  dịch.

- Với buồng đếm Neubauer: Đếm số lượng bạch cầu ở khu vực dùng để đếm bạch cầu được bao nhiêu nhân 10 và chia cho 4, ta được số lượng bạch cầu trong  $1\text{mm}^3$  dịch.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

### **1. Trường hợp kết quả bình thường**

Cần trả lời kết quả đầy đủ bao gồm:

- Số lượng dịch: bao nhiêu ml ;
- Dịch não tủy trong suốt;
- Không tìm thấy tế bào trong dịch.

### **2. Trường hợp có tế bào trong dịch não tủy**

#### **2.1. Số lượng tế bào <10 bạch cầu/1mm<sup>3</sup> dịch**

Cần trả lời kết quả đầy đủ gồm:

- Số lượng dịch: bao nhiêu ml;
- Dịch não tủy trong hay đục;
- Tìm thấy bao nhiêu tế bào có trong 1mm<sup>3</sup> dịch.

#### **2.2. Số lượng tế bào >10 bạch cầu/1mm<sup>3</sup> dịch**

Ly tâm ống nghiệm thứ 2 với tốc độ 300 vòng/phút x 5 phút. Hút bỏ phần nước trong ở trên, lấy cặn làm tiêu bản giọt dày, đường kính khoảng 2cm → để khô → cố định bằng cồn tuyệt đối → để khô rồi nhuộm Giemsa nồng độ tỷ lệ 1/10 trong 10 phút → rửa bằng nước thường (chú ý không dội trực tiếp nước vào phần bệnh phẩm, tránh làm bong tiêu bản) → sấy khô tiêu bản → đọc trên kính hiển vi bằng vật kính x 100 để lập công thức bạch cầu và trả lời kết quả xét nghiệm gồm:

- Số lượng dịch: bao nhiêu ml.
- Dịch não tủy trong hay đục.
- Số lượng bạch cầu: bao nhiêu bạch cầu/mm<sup>3</sup> hoặc bao nhiêu G/l bạch cầu.
- Thành phần bạch cầu:
  - + Tế bào bất thường;
  - + Bạch cầu đoạn trung tính;
  - + Bạch cầu lymphocyte;
  - + Bạch cầu ưa acid;
  - + Bạch cầu ưa bazơ;
  - + Bạch cầu monocyct/ đại thực bào.
- Tăng ít: Có 3-10 bạch cầu/1mm<sup>3</sup> dịch.
- Tăng vừa: Trên 10 bạch cầu/1mm<sup>3</sup> dịch.
- Tăng cao: Trên 100 bạch cầu/1mm<sup>3</sup> dịch.

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

- Tỷ lệ tăng cao (thường >75%) gặp trong viêm màng não do lao, virus...

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

- Trường hợp có nhiều tế bào trong dịch não tủy còn thể hiện sự thâm nhiễm tế bào của một số bệnh máu ác tính.

- Cũng có trường hợp gặp một số tế bào biểu mô, nấm, hoặc một số tinh thể.

Lưu ý: Khi dịch não tủy có máu thì có thể do chảy máu trong quá trình thực hiện thủ thuật, trường hợp này xét nghiệm tế bào thường không có giá trị vì các tế bào máu có lẫn trong dịch. Lúc đó trả lời kết quả gồm số lượng dịch, dịch có màu đỏ máu.

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

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Nhầm bệnh phẩm, nhầm giấy xét nghiệm hoặc sai lệch thông tin giữa bệnh phẩm và giấy xét nghiệm;

- Dịch não tủy không được gửi đến phòng xét nghiệm ngay sau khi lấy;

- Không lắc đều bệnh phẩm trước khi đếm;

- Tiêu bản không đạt tiêu chuẩn.

# **XÉT NGHIỆM TẾ BÀO TRONG CÁC LOẠI DỊCH**

**(phương pháp thủ công)**  
**(others fluid Test by manual method)**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Các loại dịch thường gặp gồm: Dịch màng tim, dịch màng phổi, dịch màng bụng và dịch khớp.

Xét nghiệm tế bào trong các dịch là xác định về sự có mặt, tỷ lệ và phân tích hình thái các tế bào có trong dịch nhằm hỗ trợ công tác chẩn đoán, theo dõi và điều trị bệnh.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Nghi ngờ viêm hoặc thâm nhiễm tế bào ác tính các màng: màng phổi, màng tim, màng bụng, dịch khớp.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên hoặc cử nhân kỹ thuật y có kiến thức chuyên khoa.

### **2. Phương tiện – Hóa chất**

#### **2.1. Dụng cụ**

- Kính hiển vi quang học;
- Máy ly tâm;
- Lam kính khô, sạch;
- Đũa thủy tinh dẹt một đầu;
- Bàn sấy hoặc quạt sấy tiêu bản;
- Pipette Pasteur và quả bóp ;
- Ống nghiệm nhỏ khô sạch;
- Khay inox quả đậu;
- Gạc sạch;
- Băng dính vải hoặc băng dính giấy;
- Dụng cụ lập công thức bạch cầu (bàn bấm hoặc đá xây dựng).

#### **2.2. Hóa chất**

- Cồn tuyệt đối;
- Dung dịch Giemsa mẹ;



- Nước cất;
- Dầu soi kính hiển vi.

### **3. Bệnh phẩm**

Là mẫu dịch đựng trong ống nghiệm sạch đảm bảo các điều kiện:

- Miệng ống nghiệm được đậy nắp kín.
- Ống nghiệm có đầy đủ thông tin hành chính về tên, tuổi, giường, khoa của người bệnh phù hợp với giấy xét nghiệm.

### **4. Phiếu xét nghiệm**

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Trước khi đếm, xác định số lượng và màu sắc dịch. Tiến hành kỹ thuật với các trường hợp dưới đây:

### **1. Trường hợp dịch lỏng (màng bụng, màng tim, màng phổi,...)**

- Bước 1. Để lắng tự nhiên hoặc ly tâm nhẹ (1000 vòng/phút trong 10 phút)
- Bước 2. Lấy cặn nhỏ một giọt lên tiêu bản kính sạch.
- Bước 3. Dùng que thủy tinh đầu nhọn dẹt di giọt bệnh phẩm theo hình tròn đồng tâm, đường kính 1,5 - 2 cm.
- Bước 4. Để khô tự nhiên, cố định bằng cồn tuyệt đối, nhuộm Giemsa với tỷ lệ 1/5 trong 5-7 phút.
- Bước 5. Làm khô tiêu bản và nhận định kết quả.

### **2. Trường hợp dịch đặc và quánh**

- Bước 1. Nếu dịch có độ nhớt tương đương với máu thì làm tiêu bản giọt đàn như tiêu bản máu. Cố định và nhuộm như tiêu bản máu.
- Bước 2. Nếu dịch quánh, đặc: Dùng tăm bông lấy chất dịch cho lên tiêu lam kính. Dùng lam kéo dàn tiêu bản như làm tiêu bản máu đàn hoặc dùng tăm bông di nhẹ như làm tiêu bản giọt đặc.
- Bước 3. Để khô, đánh dấu, cố định và nhuộm.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Sau khi có tiêu bản, việc nhận định kết quả được tập trung vào các tiêu chí nhận xét.

- Màu sắc của dịch.
- Đánh giá về sự có mặt của tế bào trên tiêu bản nhuộm Giemsa (giàu hay nghèo tế bào).
- Phân tích đặc điểm hình thái của các loại tế bào có trong dịch.

- Kết luận sau khi phân tích hình thái tế bào (nếu đủ điều kiện).

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Nhầm bệnh phẩm, nhầm giấy xét nghiệm hoặc sai lệch thông tin giữa bệnh phẩm và giấy xét nghiệm.

- Bệnh phẩm không được gửi đến phòng xét nghiệm ngay sau khi lấy.
- Không lắc đều bệnh phẩm trước khi tiến hành kỹ thuật.
- Tiêu bản không đạt tiêu chuẩn.
- Thời gian nhuộm và nồng độ thuốc nhuộm không phù hợp.

# **XÉT NGHIỆM TẾ BÀO NƯỚC TIỂU**

## **(phương pháp thủ công)**

### **(Urine cells test by manual method)**

#### **I. NGUYÊN LÝ**

Bình thường nước tiểu chỉ có một số tế bào biểu mô và cặn theo biểu hiện sinh lý của cơ thể. Khi có dấu hiệu bệnh lý ở hệ tiết niệu sẽ có biểu hiện có nhiều tế bào hoặc tinh thể trong nước tiểu. Xét nghiệm tế bào trong nước tiểu theo phương pháp thủ công là xác định định tính các tế bào hoặc cặn, tinh thể có trong nước tiểu. Xét nghiệm này góp phần quan trọng trong công tác chẩn đoán, theo dõi và điều trị bệnh.

#### **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm cơ bản.

#### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

#### **IV. CHUẨN BỊ**

##### **1. Người thực hiện**

01 Kỹ thuật viên hoặc Cử nhân kỹ thuật y có kiến thức chuyên khoa.

##### **2. Phương tiện- Hóa chất**

###### **2.1. Dụng cụ**

- Kính hiển vi quang học;
- Khay hạt đậu;
- Lam kính khô sạch;
- Pipette Pasteur;
- Gạc hút;
- Giá cầm ống nước tiểu.

###### **2.2. Hóa chất**

Không có

##### **3. Bệnh phẩm**

Là mẫu nước tiểu được gửi đến phòng xét nghiệm từ bệnh phòng hoặc lấy trực tiếp tại nơi khám bệnh.

Bệnh phẩm phải đạt yêu cầu:

- Phù hợp thông tin của giấy xét nghiệm và ống nghiệm.
- Không có dị vật khác trong ống nghiệm.

- Bệnh phẩm nước tiểu mới bài tiết thường trong và có màu vàng nhạt do có sắc tố urobilin, để lắng một thời gian sẽ có màu vẩn đục do tế bào thượng bì và chất nhầy mucin tạo nên, ngoài ra còn do một số cặn uric, urat, phosphat,.. hoặc do protein, do mỡ, hoặc màu đỏ do lẫn máu, màu nâu do đái nhiều urobilin, màu vàng xẫm khi có nhiều bilirubin.

#### **4. Phiếu xét nghiệm**

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Để lắng 1-2 giờ kể từ khi nhận bệnh phẩm từ bệnh phòng. Trường hợp bệnh phẩm mới lấy, cần làm xét nghiệm ngay → đảo đều bệnh phẩm bằng Pipette paster → hút 5ml vào ống nghiệm sạch → ly tâm 2000 vòng/phút x 10 phút.

- Đổ phần trên (thao tác đổ dứt khoát), hút một giọt cặn, nhỏ lên phiến kính (hoặc lắc kỹ phần cặn → đổ trực tiếp từ ống nghiệm vào lam kính và kéo dài miệng ống nghiệm tạo thành tiêu bản nước dịch) và di đều lên lam kính → chờ 1-2 phút cho bệnh phẩm ổn định → đặt lên kính hiển vi đọc bằng vật kính x10.

- Kiểm tra tối thiểu 10 vi trường theo đường rích rắc để đánh giá trung cho cả cặn và tế bào.

### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

#### **1. Tế bào**

- Hồng cầu:

Ít : dưới 5 hc / vi trường

(+) : 5- 10 hc/ vi trường

(++) : 10 - 20 hc /vi trường

(+++): trên 20 hc /vi trường

- Bạch cầu:

Ít : dưới 10 bc / vi trường

(+) : 10 - 20 bc/ vi trường

(++) : trên 20 bc/ vi trường

(+++): trên 50 bc/ vi trường

- Tinh trùng: đánh giá định tính dựa trên mật độ tinh trùng có trong nước tiểu từ mức độ rải rác, (+) → (+++++) và dày đặc.

- Tế bào biểu mô niệu đạo: Tế bào to hình đa diện, nhân rõ.

- Tế bào biểu mô bàng quang: Tế bào to hình vệt, nhân rõ.

- Tế bào biểu mô thận: Tế bào to trung bình, hình bầu dục, nhân tròn rõ.

**2. Trụ niệu:** cấu tạo bởi chất nhày, tế bào của máu khi qua ống thận, đọng lại và mang khuôn của ống thận. Dựa vào thành phần cấu tạo người ta chia 2 loại trụ:

### **2.1. Trụ không có tế bào gồm**

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

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

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

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

### **2.2. Trụ có tế bào**

Thường gặp trong viêm cầu thận.

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

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

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

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

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

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

(-) : không có trụ

(+) : 1 trụ / 100 vi trường

(++) : 1 trụ / 1 vi trường

(+++): 10 trụ / 1 vi trường

(++++): 100 trụ / 1 vi trường

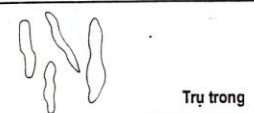
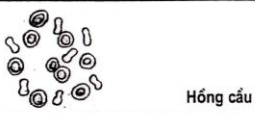
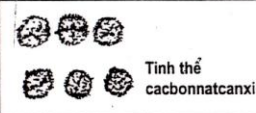
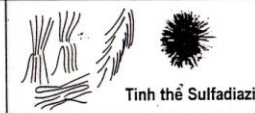
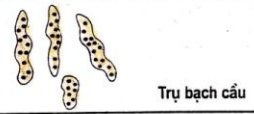
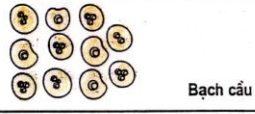
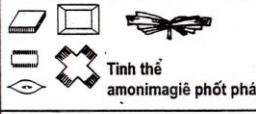

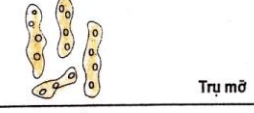
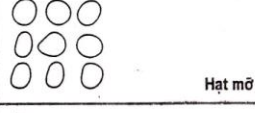
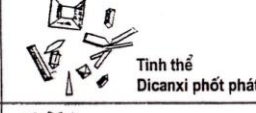

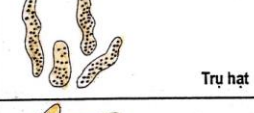
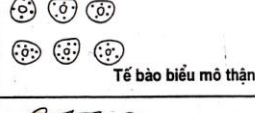
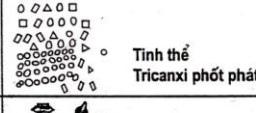


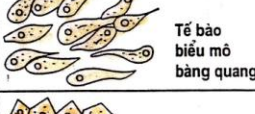

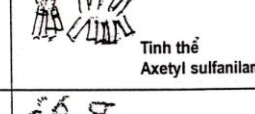



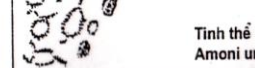
### **3. Cận tinh thể**

Đánh giá định tính dựa trên sự có mặt các loại cận, tinh thể có trong bệnh phẩm, từ rải rác, (+) → (++++) và dày đặc, thường gặp các loại sau:

- Sulfatcalci: hình kim dài, hoa thị, không màu.
- Oxalatcalci: hình phong bì, bánh qui, kích thước 10 - 20  $\mu\text{m}$ , hình củ lạc khoảng 50  $\mu\text{m}$ , rất chiết quang.
- Cacbonatcalci: hình cầu, tan trong acid.
- Cặn phosphat: hình chữ nhật, lá dương xỉ, hình sao. kích thước 30 - 150  $\mu\text{m}$ , không màu, chiết quang.
- Aciduric: hình thoi, mũi giáo, hoa thị cánh nhọn, hình ngôi sao, màu vàng hay nâu đỏ.
- Amoniurat: hình cầu gai, xương rồng, hình bó kim, kích thước 20  $\mu\text{m}$ , màu vàng, chiết quang.
- Phosphatricalci: hạt nhỏ, không có hình thù nhất định, tan trong acid.
- Sunfadiazin: hình bó mạ, hình chổi.
- Sunfathiazon: hình lục lăng.
- Sunfa pyridin: hình lá đu đủ.
- Cholesterol: là những bản mỏng, không màu trong suốt, chồng lên nhau.
- Phosphatdicalci: hình tam giác, góc nhọn, chụm thành hình hoa thị.

Có thể tham khảo, đối chiếu với các hình ảnh dưới đây để kết luận khi thực hiện xét nghiệm:

## NƯỚC TIỂU

TẾ BÀO		TINH THỂ	
 Trụ trong	 Hồng cầu	 Tinh thể cacbonnatcanxi	 Tinh thể Sulfadiazin
 Trụ bạch cầu	 Bạch cầu	 Tinh thể amonimagiê phốt phát	 Tinh thể Sulfapyridin
 Trụ mỡ	 Hạt mỡ	 Tinh thể Dicanxi phốt phát	 Tinh thể Sulfapyridin
 Trụ hạt	 Tế bào biểu mô thận	 Tinh thể Tricanxi phốt phát	 Tinh thể Oxalatcanxi
 Trụ xơ	 Tế bào biểu mô bàng quang	 Tinh thể Oxalatcanxi	 Tinh thể Axetyl sulfanilamid
 Tinh trùng	 Tế bào biểu mô niệu đạo	 Tinh thể Canxi sulfat	 Tinh thể Amoni urat

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Trong xét nghiệm này, ngoài các tiêu chí nhận định kết quả của các loại tế bào thì việc nhận định kết quả các loại cặn, tinh thể có mặt trên các vi trường quan sát cũng rất quan trọng. Vì vậy, kinh nghiệm của người làm kỹ thuật góp phần tích cực đến kết quả xét nghiệm. Các ảnh hưởng không tốt tới kết quả xét nghiệm được ghi nhận thường gặp ở các trường hợp:

- Bệnh phẩm để quá lâu mới mang tới phòng xét nghiệm (>3 giờ) và khi đó thường có biểu hiện nhiễm khuẩn.
- Sự trung thực của người lấy mẫu (có thể lẫn nước hoặc nguyên nước khi không muốn đi tiêu).
- Kỹ năng, kinh nghiệm của nhân viên thực hiện xét nghiệm.

**XÉT NGHIỆM TẾ BÀO NƯỚC TIỂU**  
**(Bằng máy tự động)**  
(Urine cells Test by automatic analyzer)

**I. NGUYÊN LÝ**

Xét nghiệm tế bào nước tiểu bằng máy tự động là kỹ thuật xét nghiệm hiện đại thể hiện sự tiến bộ khoa học và đồng bộ kỹ thuật chuyên môn. Mẫu nước tiểu sẽ được phân tích hoàn toàn nhờ khả năng hút mẫu – chụp ảnh và phân tích tế bào hoàn toàn tự động, dựa vào ngân hàng dữ liệu được cài đặt sẵn trong ổ cứng máy tính.

**II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm cơ bản.

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên hoặc cử nhân kỹ thuật y học.

**2. Phương tiện, dụng cụ**

**2.1. Dụng cụ**

- Giá cắm ống bệnh phẩm
- Ống nghiệm đựng nước tiểu có kích thước phù hợp với máy xét nghiệm.
- Cuvette phù hợp với máy xét nghiệm
- Dụng cụ vệ sinh vị trí xét nghiệm (gạc, nước sát khuẩn, cồn 70°).

**2.2. Hóa chất**

Dung dịch rửa phù hợp với máy.

**2.3. Máy và trang thiết bị**

a. Trước khi bật máy

- Bỏ sung cuvette (nếu cần)
  - Tạm tháo bỏ nắp cánh và phần giữ cuvette.
  - Bỏ sung hộp cuvette mới.
  - Kéo tháo bỏ dây băng ở đáy hộp.
  - Đóng cửa máy phía trước.
- Kiểm tra, đặt một túi nilon hoặc khăn giấy trong khay thải cuvette.
- Kiểm tra an toàn nguồn điện.

b. Bật máy

- Bật lần lượt theo thứ tự sau.



- Mở cổng kết nối (nếu sử dụng hệ thống LIS)
- Bật nút nguồn của máy xét nghiệm.
- Bật máy tính PC và màn hình.
- Phần mềm sẽ tự động kích hoạt sau khi cửa sổ (Windows) khởi động.  
Nếu có cửa sổ Login thì nhập tên người dùng (Username) và mật khẩu (Password).
- Hệ thống sẽ tự động kết nối và khởi động  
Nếu các đèn báo trên màn hình có màu xanh, báo hiệu máy sẵn sàng làm việc.

**3. Bệnh phẩm:** Mẫu nước tiểu được gửi đến từ bệnh phòng hoặc lấy trực tiếp tại nơi khám bệnh.

Bệnh phẩm đạt yêu cầu:

- Phù hợp thông tin giữa giấy xét nghiệm và ống nghiệm.
- Không có dị vật trong ống nghiệm.
- Bệnh phẩm nước tiểu mới bài tiết thường trong và có màu vàng nhạt do có sắc tố urobilin, để lắng một thời gian sẽ có màu vẩn đục do tế bào thượng bì và chất nhầy mucin tạo nên, ngoài ra còn do một số cặn uric, urat, phosphat hoặc do protein, do mỡ hoặc do lẫn máu, màu nâu do đái nhiều urobilin, màu vàng sẫm khi có nhiều bilirubin.

#### 4. Phiếu xét nghiệm

Phiếu xét nghiệm có nội dung chỉ định phù hợp và có chữ ký của Bác sĩ ra chỉ định.

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

#### 1. Chạy thường quy (đo bệnh phẩm)

- Đặt khay bệnh phẩm vào máy.
  - Đặt ống bệnh phẩm vào rack.
  - Cần ít nhất 2ml bệnh phẩm để đo.
  - Đặt tube vào rack với mặt barcode quay ra phía khe đọc.
  - Nhãn barcode nên đặt với độ cao phù hợp
- Nếu chạy theo thứ tự (Worklist) việc nhập đầu vào cho xét nghiệm được tuân thủ theo chương trình cụ thể của máy.
- Chọn chế độ phân tích mẫu tự động (Auto Sample) hoặc mẫu chạy bằng tay (Manual Sample) theo chủ trương của Labo xét nghiệm.
- Chọn [START] để bắt đầu đo.

Bệnh phẩm sẽ được đo một cách tuần tự và có thể dừng máy bằng cách chọn ấn [STOP].

Quá trình đo có thể không dừng một cách ngay tức khắc. Bệnh phẩm cuối cùng được hút từ ống nghiệm có thể vẫn sẽ tiếp tục đo trước khi có lệnh stop máy.

- Khi có kết quả xét nghiệm, mỗi bệnh phẩm tương ứng với một dòng mới khi được đo. Dòng tương ứng người bệnh này cũng hiển thị ngày giờ đo, số rack, số ống, ID, tên người bệnh và trạng thái đo.
- Kết quả có thể được xem xét và chỉnh sửa theo chương trình của máy xét nghiệm cụ thể.

## **2. Cuối ngày làm việc:** Tắt phần mềm và vệ sinh máy

- Thực hiện rửa tự động hàng ngày.
- Bỏ tất cả bệnh phẩm ra khỏi khay.
- Chạy chương trình rửa máy với hóa chất phù hợp
- Vệ sinh khay cuvette, trong lúc máy đang thực hiện chu trình rửa hàng ngày.
- Tắt máy:
  - Tắt máy xét nghiệm
  - Tắt máy tính.
- Vệ sinh khay chứa cuvette thải:
  - Mở khay chứa cuvette thải và rút khỏi chốt.
  - Bỏ hết cuvette bẩn ra khỏi khay một cách vệ sinh.
  - Thực hiện vệ sinh khay
  - Lắp lại khay thải cuvette và đóng cửa trước.
- Đổ bình nước thải:
  - Mở can thải, cẩn thận với các dây và ống dây.
  - Đổ nước thải khỏi can một cách vệ sinh.
  - Lắp lại can thải vào đúng vị trí.

## **3. Vệ sinh hàng tuần**

- Vệ sinh khay chuyển rack:
  - Tháo khay chuyển rack ra khỏi máy.
  - Lau sạch bằng gạc hoặc khăn sạch thấm với dung dịch khử khuẩn
  - Lắp lại khay.
- Vệ sinh thấu kính:
  - Xoay cánh tay kính hiển vi về một phía để có thể quan sát thấy thấu kính.
  - Vệ sinh nhẹ nhàng bằng gạc sợi mềm với cồn eltylic tuyệt đối.
  - Xoay trả lại vị trí cánh tay.
  - Đóng cánh cửa trước.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Nhấp đúp vào bất kỳ một dòng kết quả nào đó, ta có thể thấy tập hợp ảnh đo được của bệnh phẩm đó. Thư viện ảnh này cũng có thể mở bằng cách kích chọn dòng kết quả. Sau khi xem xong ấn [CLOSE] để thoát.

- Chỉnh sửa thông tin người bệnh hoặc kết quả xét nghiệm bằng cách nhấp đúp lên hình ảnh đo của bệnh phẩm và thao tác tùy theo giao diện của từng máy. Sau đó nhấp [CLOSE] để đóng lại.

- Để chuyển một kết quả tới LIS (Laboratory Information System – Hệ thống thông tin của phòng thí nghiệm), chọn [OUTPUTS] (xuất), sau đó chọn [TRANSFER](chuyển).

+ Để in một kết quả chọn [OUTPUTS] \ [PRINT] (xuất\in).

+ Để xuất một dữ liệu chọn [OUTPUTS] \ [EXPORT] (xuất dữ liệu).

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

Trong xét nghiệm này, việc sử dụng máy đòi hỏi tính ổn định và đồng bộ cả về dụng cụ, hóa chất và điều kiện làm việc. Vì vậy ở phòng xét nghiệm thường xảy ra một số ảnh hưởng đến kết quả xét nghiệm như:

- Nguồn điện không ổn định

- Nạp mẫu không đủ theo quy định hoặc bị sai bệnh phẩm với thông tin người bệnh.

- Dụng cụ không phù hợp với máy mà phòng xét nghiệm có (cuvette, ống nghiệm).

- Công tác bảo dưỡng không được thực hiện định kỳ (bảo dưỡng hàng ngày, hàng tuần...).

- Có sự sai khác về chương trình của máy xét nghiệm.

**ĐÉM SỐ LƯỢNG TIỂU CẦU BẰNG MÁY ĐÉM TỰ ĐỘNG THEO  
NGUYÊN LÝ TRỞ KHÁNG VÀ LASER; QUAN SÁT ĐỘ TẬP TRUNG  
TIỂU CẦU TRÊN TIÊU BẢN MÁU NGOẠI VI  
(Platelet count by automatic machine, observe platelet concentration on  
blood peripheral)**

**I. NGUYÊN LÝ**

- Đếm số lượng tiểu cầu trong một thể tích máu nhất định từ đó tính số lượng tiểu cầu có trong 1 lít máu toàn phần bằng máy tổng trở và laser dựa trên kích thước tiểu cầu và mật độ quang của tiểu cầu.

- Dựa trên đặc tính kết dính và ngưng tập của tiểu cầu trong mạch máu từ đó tiến hành kéo tiêu bản trực tiếp từ máu mao mạch để quan sát độ tập trung của tiểu cầu.

**II. CHỈ ĐỊNH**

- Xét nghiệm cơ bản;
- Nghi ngờ bệnh lý chức năng tiểu cầu.

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện**

01 Kỹ thuật viên hoặc cử nhân kỹ thuật y học chuyên khoa.

**2. Phương tiện - Hóa chất**

- Máy đếm tế bào tự động;
- Ống nghiệm được chống đông bằng EDTA;
- Lam kính;
- Bơm tiêm vô khuẩn;
- Cồn sát trùng;
- Hóa chất nhuộm Giemsa.

**3. Bệnh phẩm.**

Là mẫu bệnh phẩm được mang đến từ các khoa phòng xét nghiệm hoặc khoa lâm sàng.

**4. Phiếu xét nghiệm.**

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Lấy 2ml máu tĩnh mạch bằng bơm tiêm vô khuẩn cho vào ống nghiệm đã được chống đông bằng EDTA. Lắc đều.

- Bật máy đếm tế bào tự động.

- Kiểm tra hóa chất sử dụng.

- Chọn chế độ chạy (tùy loại máy và yêu cầu xét nghiệm)—> Enter (chọn).

- Lắc đều ống nghiệm, đưa ống nghiệm đến kim hút.

- Nhấn “Start” (Khởi động) khi chắc chắn bơm hút ở trong ống nghiệm và đầu kim hút ngập trong máu, đưa ống nghiệm ra khi máy báo “tít tít”.

- In kết quả và đọc kết quả: Các chỉ số tiểu cầu được biểu thị bằng các chỉ số PLT, MPV, PDW.

- Dùng kim chích máu (Lancet), chích máu ở đầu ngón tay (thường lấy ở ngón nhẫn), nhỏ giọt máu ra lam kính sạch. Kéo tiêu bản và nhuộm Giemsa. Đọc độ tập trung tiểu cầu trên lam kính bằng kính hiển vi quang học.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Dựa vào các chỉ số: PLT: Số lượng tiểu cầu (bình thường 150 – 450 G/l), PDW, MPV (bình thường 7 - 9 fL)

- Độ tập trung tiểu cầu đọc trên kính hiển vi quang học. Bình thường tiểu cầu tập trung thành từng cụm nhỏ, khoảng 5 - 10 tiểu cầu. Khi tập trung tiểu cầu thành đám lớn —> độ tập trung tiểu cầu tăng. Khi tiểu cầu đứng rải rác —> độ tập trung tiểu cầu giảm, thường gặp khi số lượng tiểu cầu giảm.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Có thể đếm nhầm hồng cầu kích thước nhỏ thành tiểu cầu (MCV nhỏ < 60fL). Nếu nghi ngờ cần kéo tiêu bản so sánh với số đếm tiểu cầu trên máy tự động.

- Kéo tiêu bản dùng máu đã chống đông sẽ không đánh giá được chính xác độ tập trung tiểu cầu.

# TÌM HỒNG CẦU CÓ CHẤM ƯA BASE (Basophilic stippling Test)

## I. NGUYÊN LÝ

Trong bệnh Thalassemia, thiếu máu do rượu, thiếu máu nguyên hồng cầu không lồ, nhiễm độc chì hoặc arsenic có sự ngưng tập của ribosome mịn, bắt màu xanh thẫm hoặc tím, kích thước không đều trong hồng cầu trên tiêu bản nhuộm giêmsa.

## II. CHỈ ĐỊNH

- Nghi ngờ bệnh Thalassemia;
- Các thiếu máu chưa rõ nguyên nhân.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Cán bộ thực hiện:

01 kỹ thuật viên hoặc cử nhân kỹ thuật chuyên khoa Huyết học – Truyền máu.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1 Dụng cụ

- Lam kính: khô, sạch, không mỡ, không mốc, không sút mẻ;
- Lam kéo: khô, sạch, không mẻ, không xước, 2 đầu bẻ góc 2mm;
- Bút chì thường, bút chì kính;
- Bể nhuộm, giá nhuộm;
- Bàn sấy tiêu bản, máy sấy tiêu bản;
- Giá gỗ cắm đứng tiêu bản;
- Pipette Pasteur;
- Quả bóp, gạc, que thủy tinh;
- Kính hiển vi quang học.

#### 2.2 Hóa chất

- Cồn tuyệt đối;
- Giemsa;
- Dung dịch pha loãng, nước trung tính hoặc nước cất.

### 3. Bệnh phẩm

- Máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA;
- Máu mao mạch lấy trực tiếp từ đầu ngón tay

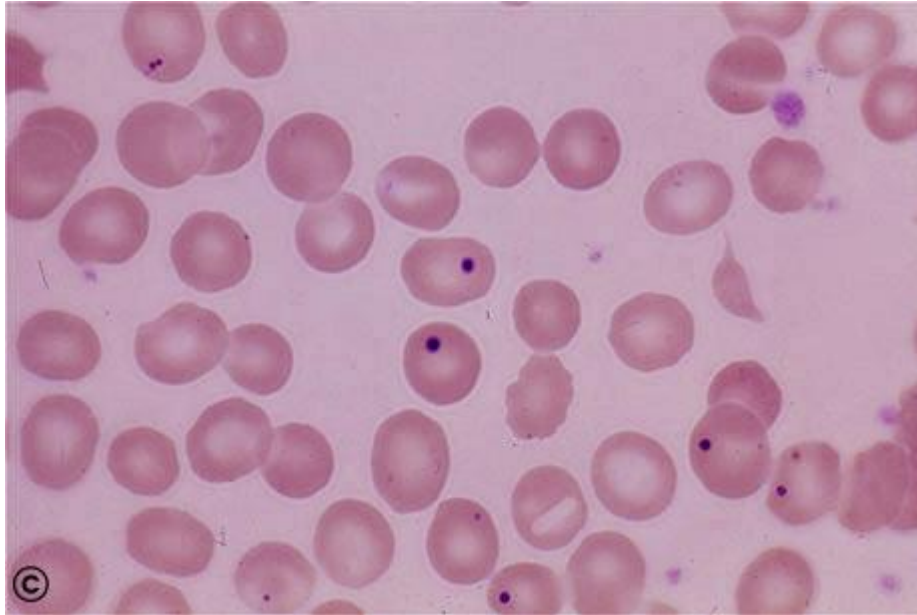
#### **4. Phiếu xét nghiệm.**

#### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Làm tiêu bản giọt đàn
- Nhuộm lam
- Nhận định kết quả

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Quan sát hình thái tế bào hồng cầu (màu hồng đậm), tìm và nhận định những chấm mịn, bắt màu xanh thẫm hoặc tím, kích thước không đều (hình sau).



#### **VII. MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KẾT QUẢ**

- Lam kính, lam kéo không đạt tiêu chuẩn;
- Kéo quá nhanh làm tiêu bản dày quá hoặc mỏng quá hoặc lượn sóng;
- Cồn, Giemsa không đủ tiêu chuẩn;
- Thời gian nhuộm không đảm bảo.

# TÌM MẢNH VỠ HỒNG CẦU

## (Red cell fragment Test)

### I. NGUYÊN LÝ

Do hồng cầu vỡ trong cục máu đông (trong các bệnh có đông máu rải rác trong lòng mạch-DIC), mạch máu bị tổn thương, qua van tim nhân tạo, bệnh lý vi mạch, bông nặng, sau ghép thận, viêm cầu thận... Vì vậy, tìm mảnh vỡ hồng cầu trên tiêu bản nhuộm Giemsa góp phần chẩn đoán bệnh.

### II. CHỈ ĐỊNH

Nghi ngờ có tan máu.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

01 kỹ thuật viên hoặc cử nhân kỹ thuật chuyên khoa Huyết học – Truyền máu.

#### 2. Phương tiện – Hóa chất

##### 2.1. Dụng cụ

- Lam kính: khô, sạch, không mỡ, không mốc, không sứt mẻ;
- Lam kéo: khô, sạch, không mẻ, không xước, 2 đầu bẻ góc 2mm;
- Bút chì thường, bút chì kính;
- Bể nhuộm, giá nhuộm;
- Bàn sấy tiêu bản, máy sấy tiêu bản;
- Giá gỗ cắm đứng tiêu bản;
- Pipette Pasteur;
- Quả bóp, gạc, que thủy tinh;
- Kính hiển vi quang học.

##### 2.2. Hóa chất

- Cồn tuyệt đối;
- Giemsa;
- Dung dịch pha loãng, nước trung tính hoặc nước cất.

#### 3. Bệnh phẩm

- Máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA;
- Máu mao mạch lấy trực tiếp từ đầu ngón tay.

#### 4. Phiếu xét nghiệm

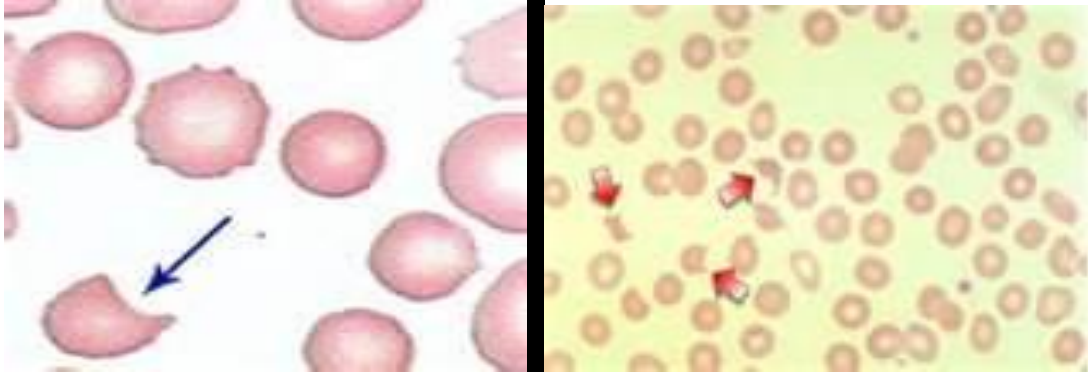


## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Làm tiêu bản giọt đàn;
- Nhuộm lam.

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Quan sát hình thái tế bào hồng cầu (màu hồng đậm), tìm và nhận định những tế bào có hình dạng bất thường như hình sau:



## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Lam kính, lam kéo không đạt tiêu chuẩn;
- Kéo quá nhanh làm tiêu bản dày quá hoặc mỏng quá hoặc lượn sóng;
- Cồn, Giemsa không đủ tiêu chuẩn;
- Thời gian nhuộm không đảm bảo.

# XÉT NGHIỆM HỒNG CẦU LƯỚI

(bằng máy đếm tế bào tự động)

(Reticulocyte automatic count)

## I. NGUYÊN LÝ

Hồng cầu lưới là giai đoạn trung gian giữa hồng cầu có nhân và hồng cầu trưởng thành. Hình ảnh mạng lưới là tàn dư của ARN riboxom được bắt màu bởi thuốc nhuộm fluorochromes.

## II. CHỈ ĐỊNH

- Xét nghiệm cơ bản.
- Các trường hợp thiếu máu và đang điều trị bệnh máu.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## VI. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

01 kỹ thuật viên tế bào.

### 2. Dụng cụ - Hóa chất

#### 2.1. Dụng cụ

- Máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA;
- Máy đếm tế bào laser.

#### 2.2. Hoá chất

Dung dịch thuốc nhuộm fluorochromes thương mại.

### 3. Bệnh phẩm

Là mẫu bệnh phẩm được gửi đến từ các phòng xét nghiệm hoặc các khoa lâm sàng.

### 4. Phiếu xét nghiệm

## IV. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Chuẩn bị mẫu

máu được lấy cho vào ống nghiệm chống đông bằng EDTA, mỗi lần phân tích máy sẽ tự động lấy 50µm.

### 2. Bật máy và chọn chế độ phân tích

- Bật máy bằng nút ON (Bật) ở phía sau thân máy.
- Sau khi khởi động, máy sẽ tự động rửa từ 3 đến 5 lần, sau đó sẽ phân tích mẫu trắng.

- Chọn chế độ phân tích bằng phím MODE, chọn chế độ chạy hồng cầu lưới R, bấm phím ENTER.

- Nhập số thứ tự mẫu bấm phím SAMPLE NO (Thứ tự mẫu), nhập số thứ tự từ bàn phím, bấm ENTER (Chọn).

### **3. Phân tích mẫu**

- Lắc đều ống nghiệm đựng mẫu khoảng 10 lần.

- Mở nắp đậy ống nghiệm.

- Đưa ống nghiệm vào kim hút và nhấn nút START (Khởi động).

- Máy sẽ hút mẫu, sau hai tiếng bíp, màn hình sẽ hiện ra dòng chữ ANALYSING (đang phân tích mẫu), khi đó rút ống nghiệm ra khỏi kim hút, máy sẽ bắt đầu phân tích.

- Khi kết thúc quá trình phân tích, trên màn hình sẽ hiện ra kết quả và máy sẽ thông báo READY (sẵn sàng) cho phân tích mẫu tiếp theo.

### **V. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Kết quả được hiển thị trên màn hình.

- In kết quả bằng máy in gắn sẵn.

### **VI. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

Lắc không đều ống nghiệm.

**XÉT NGHIỆM HỒNG CẦU LƯỚI**  
(Bằng kỹ thuật nhuộm xanh sáng Cresyl)  
(Reticulocyte count by Cresyl's stain)

**I. NGUYÊN LÝ**

Hồng cầu lưới là giai đoạn trung gian giữa hồng cầu có nhân và hồng cầu trưởng thành. Hình ảnh mạng lưới là tàn dư của ARN riboxom được bắt màu bởi thuốc nhuộm đặc biệt xanh cresyl.

**II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp thiếu máu và đang điều trị bệnh máu.

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên tế bào.

**2. Phương tiện - Hóa chất**

**2.1. Dụng cụ**

- Máu tĩnh mạch chống đông bằng EDTA;
- Ống nghiệm khô sạch có nút;
- Tiêu bản kính, tiêu bản kéo khô, sạch;
- Pipette Pasteur;
- Tủ ấm hoặc Bain marrie;
- Kính hiển vi quang học.

**2.2. Hoá chất**

Thuốc nhuộm xanh cresyl bão hoà.

**3. Bệnh phẩm**

Là mẫu bệnh phẩm được gửi đến từ các phòng xét nghiệm hoặc các khoa lâm sàng.

**4. Phiếu xét nghiệm**

**V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Dùng pipette nhỏ 2 giọt máu vào ống nghiệm.
- Dùng pipette khác nhỏ 2 giọt thuốc nhuộm xanh cresyl bão hoà vào ống nghiệm.

- Lắc đều ống nghiệm, để ống nghiệm vào Bain marrie 37°C trong 20 phút.

- Lắc đều ống nghiệm, dùng pipette nhỏ 1 giọt máu trên lam kính, làm tiêu bản máu đàn mỏng, để tiêu bản khô tự nhiên trong khoảng 15 đến 20 phút.

- Đặt tiêu bản lên kính hiển vi quang học, dưới vật kính dầu 100, hồng cầu lưới bắt màu thuốc nhuộm xanh cresyl có dạng lưới mỏng màu xanh ngọc.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Tính tỷ lệ hồng cầu lưới trên 100 hồng cầu trưởng thành.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Lắc không đều ống nghiệm khi ủ và khi làm tiêu bản.
- Thuốc nhuộm kém chất lượng.
- Đọc nhầm thể vùi.

# **XÉT NGHIỆM TÌM TẾ BÀO HARGRAVE**

## **(Hargrave cell Test)**

### **I. NGUYÊN LÝ**

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

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Nghi ngờ bệnh hệ thống.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

01 Kỹ thuật viên

#### **2. Phương tiện - Hóa chất**

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

#### **3. Bệnh phẩm**

Máu tĩnh mạch.

#### **4. Phiếu xét nghiệm**

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

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

- Lắc đều, ly tâm nhẹ lấy cặn kéo 4 tiêu bản và nhuộm Giemsa như tiêu bản máu đàn.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Tế bào Hargrave được tạo ra do bạch cầu đoạn trung tính thực bào một nhân đang thoái hóa.

- Trên tiêu bản nhuộm Giemsa: Nhân thoái hóa là một khối thuần nhất tròn, to, màu gạch non. Các đoạn nhân của bạch cầu thực bào bị đẩy dạt ra xung quanh khối thuần nhất tạo nên hình “hoa hồng”. Bào tương của bạch cầu đoạn trung tính thực bào rất mờ nhạt, khó quan sát.

- Phải đọc ít nhất 2 tiêu bản mới đủ kết luận. Khi trả lời kết quả thì trả lời là có hay không tìm thấy tế bào Hargrave. Nếu có thì mỗi tiêu bản có bao nhiêu tế bào Hargrave (tính trung bình).

# XỬ LÝ BỆNH PHẨM SINH THIẾT VÀ CHẨN ĐOÁN MÔ HỌC

## I. NGUYÊN LÝ

Là kỹ thuật làm tiêu bản và phương pháp nhuộm để phát hiện các bất thường của tổ chức hạch, lách, tủy xương giúp chẩn đoán các bệnh lý tủy xương liên quan.

## II. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

01 Kỹ thuật viên hoặc cử nhân kỹ thuật chuyên khoa Huyết học – Truyền máu.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1 Dụng cụ

- Máy cắt tiêu bản;
- Bàn sấy 37°C;
- Kính hiển vi quang học;
- Bể nhuộm tiêu bản dung tích 100ml: 06 chiếc;
- Bể nhuộm tiêu bản dung tích 200ml: 06 chiếc;
- Giá cài tiêu bản vừa bể nhuộm 200ml: 01 chiếc;
- Giá gỗ cài tiêu bản: 02 chiếc;
- Pipette Pasteur: 04 chiếc;
- Gạc thấm nước: 03 chiếc;
- Bút chì hoặc bút viết kính: 01 chiếc;
- Lamén 22 x 24 hoặc 22 x 22.

#### 2.2 Hóa chất

- Toluén 1,2,3: để sẵn trong 3 bể nhuộm 100ml;
- Còn tuyệt đối Etylic 1,2,3 để sẵn trong bể nhuộm 100ml;
- Còn 80° pha sẵn và để trong bể 100ml;
- Dung dịch Hematoxylin (thành phẩm): để sẵn trong bể 200 ml;
- Dung dịch Erythrosin: để sẵn trong bể nhuộm 200 ml;
- Axit HCL %: Để trong bể nhuộm 200 ml;
- Boom Canada: Lấy ra cốc nhỏ, để trong tủ 60°C.

### Cách pha hóa chất

#### Dung dịch Erythrosin

Erythrosin B ( $C_{20}H_{14}I_4Na_2O_5$ ): 0,1g



Nước cất: 100ml

Khuấy đều ta được dung dịch Erythrosin B( $C_{20}H_{14}Na_2O_5$ ) nồng độ 1‰

**Dung dịch Hematoxylin:** là hóa chất thành phẩm có trên thị trường.

**Dung dịch Hemalun demayer**

Công thức:

- Alunde K( $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ): 5g
- Hematine( $C_6H_{12}O_6$ ): 300mg
- Acid Acetic( $CH_3COOH$ ): 5ml
- Nước cất: 250ml

◆**Cách pha:**

Đun sôi nước cho Alunde K. ( $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ) vào đun tiếp khoảng 1→2 phút cho tan hết, sau đó cho tiếp Hematine ( $C_6H_{12}O_6$ ), đun thêm 1 phút và tắt bếp bắc ra để nguội → cho tiếp Acid Acetic ( $CH_3COOH$ ) vào ta được dung dịch Hemalun demayer.

**Dung dịch  $Na_2S_2O_3$  5%**

- $Na_2S_2O_3$ : 5g
- Nước cất: 100ml

Lắc đều cho tan hết  $Na_2S_2O_3$  sẽ được dung dịch  $Na_2S_2O_3$  5%:

**Dung dịch  $Na_2CO_3$  1%**

- $Na_2CO_3$ : 1g
- Nước cất: 100ml

Trộn dung môi và chất tan lẫn nhau, sau đó lắc đều cho tan hết  $Na_2CO_3$  ta được dung dịch cần pha.

**Dung dịch Lugol**

Công thức:

- KI: 2g
- Iốt tinh thể: 1g
- Nước cất: 100ml

◆**Cách pha:**

Cho KI hòa tan trong nước trước sau đó cho tiếp Iốt tinh thể vào, khuấy đều cho đến khi tan hết ta được dung dịch Lugol.

### **3. Bệnh phẩm**

Là các tiêu bản mảnh sinh thiết đã cắt sẵn, đảm bảo khô: Sau khi mảnh sinh thiết được đúc thành khuôn, tiến hành cắt dán trên lam kính và để khô trong tủ ẩm 37°C trong 3 giờ.

### **4. Phiếu xét nghiệm**

## **III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Quy trình xử lý bệnh phẩm sinh thiết**

- Cố định mảnh sinh thiết trong dung dịch (DD) Formol 10% trong 24 giờ;

- Chuyển trong hóa chất:

+ Rửa mẫu trong nước chảy nhẹ trong 1 giờ;

+ Đẩy nước bằng ngâm trong cồn;

Ngâm trong cồn 90°: 30 phút;

Ngâm trong cồn tuyệt đối I: 1 giờ;

Ngâm trong cồn tuyệt đối II: 1 giờ;

Ngâm trong cồn tuyệt đối II: 3 giờ;

- Loại cồn bằng Xylen → lấy mảnh sinh thiết thấm khô bằng giấy thấm

Ngâm trong Xylen I: 30 phút;

Ngâm trong Xylen II: 1 giờ;

Ngâm trong Xylen III: 1 giờ;

- Vùi mẫu trong parapin và đúc khuôn.

Lấy mẫu từ Xylen III và thấm khô bằng giấy thấm.

Ngâm trong Parafin nóng chảy trong 12 giờ.

Đúc mảnh sinh thiết trong khuôn Parafin nóng chảy.

Bảo quản khuôn mảnh sinh thiết trong ngăn tủ mát (2°C-8°C)

### **2. Nhuộm Giemsa mảnh sinh thiết**

- Cắt dán tiêu bản và để khô trong tủ 37°C trong 2 giờ;

- Tẩy Parafin bằng cách chuyển mẫu qua Toluen I,II,III → cồn tuyệt đối I,II và cồn 80°C. Mỗi loại 5 phút;

- Rửa dưới vòi nước chảy nhẹ: 5 phút;

- Tráng qua cồn tuyệt đối;

- Nhuộm Giemsa 1/10: 15 phút;

- Rửa dưới nước chảy nhẹ;

- Đẩy nước bằng cồn tuyệt đối ngâm trong Toluen;

- Gắn lamén và để khô.

### **3. Nhuộm HE mảnh sinh thiết hạch, lách.**

- Tẩy parafin bằng cách chuyển mẫu qua Toluene I, II, III → cồn 80°, cồn tuyệt đối I, II: Mỗi loại 5 phút;
- Rửa dưới nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Nhuộm trong Hematoxylin: 2 – 5 phút;
- Rửa dưới nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Tẩy qua axit HCL 1%: 4-8 giây (nếu cần);
- Rửa dưới nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Nhuộm trong Erythrosin: 30 - 60 giây;
- Rửa dưới nước chảy nhẹ: 5 phút;
- Đẩy nước bằng cồn tuyệt đối → ngâm tiêu bản trong Toluene;
- Gắn lammen, để khô và nhận định kết quả.

### **4. Nhuộm HE mảnh sinh thiết tử cung**

- Chuyển xylen 1,2,3, cồn 1,2 và cồn 80° mỗi loại 5 phút;
- Rửa dưới dòng nước chảy 10 phút và rửa sạch parafin;
- Nhuộm Lugol :10 phút;
- Rửa nước chảy:10 phút;
- Nhuộm  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ : 5 phút;
- Rửa dưới dòng nước chảy:10 phút;
- Nhúng vào Hemalundemaye: 4 phút;
- Rửa nước chảy:10 phút;
- Tẩy cồn HCL 1 % 8 giây;
- Rửa dưới dòng nước chảy 10 phút (nước có sẵn trong công);
- Làm xanh tiêu bản bằng  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  :1 phút;
- Rửa dưới dòng nước chảy:10 phút;
- Nhúng nền bằng Erythrosin: 2– 4 giây;
- Rửa nước chảy 5 phút;
- Gắn lammen: rửa sạch tiêu bản, tráng lại bằng nước cất, tẩy nước bằng cồn tuyệt đối, nhúng qua xylen 1,2,3 (đã để trong tủ ẩm) và gắn lammen.

### **IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Trên tiêu bản đẹp: thấy rõ các tế bào có đủ nhân, nguyên sinh chất và các hạt của các dòng tế bào. Bên cạnh đó thấy được hình thái và tính chất của tổ chức như lớp vỏ, lớp tủy và các đặc điểm của mỗi phần.

- Việc nhận xét hình thái tế bào và tổ chức học đòi hỏi nhân viên phải có kiến thức về Tế bào - Tổ chức học và giải phẫu bệnh. Vì vậy nhân viên làm kỹ thuật quan tâm nhiều đến việc sau khi nhuộm thì các tế bào và cấu trúc tổ chức có bắt màu tốt hay không cũng như các đặc điểm.

#### **V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Nhuộm các thì hóa chất không phù hợp
- Hóa chất đã bị thay đổi nồng độ.

# CHỤP ẢNH TRÊN KÍNH HIỂN VI KỸ THUẬT SỐ VÀ GHI ĐĨA

## I. NGUYÊN LÝ

Chụp ảnh tiêu bản bệnh phẩm (máu, dịch hút tủy xương, sinh thiết tủy xương, hạch, các dịch sinh học khác..) và in ra đĩa CD.

## II. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

01 Kỹ thuật viên hoặc Cử nhân kỹ thuật, bác sĩ chuyên khoa Huyết học – Truyền máu.

### 2. Phương tiện

- Kính hiển vi quang học có cấu hình camera và phần mềm chụp ảnh, xử lý ảnh.
- Máy tính có ổ DVD Write (DVD – RW) hoặc VCD Write
- Đĩa CD theo chỉ định
- Phần mềm ghi đĩa Nero 6.0 hoặc 7.0

### 3. Bệnh phẩm

Tiêu bản bệnh phẩm (máu, dịch hút tủy xương, sinh thiết tủy xương, hạch, các dịch sinh học khác..).

### 4. Phiếu xét nghiệm

## III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1 Thao tác chụp ảnh

- Bật máy tính và KHV.
- Chọn vi trường tế bào cần chụp ảnh trên KHV.
- Chỉnh nét ảnh bằng xoay nhẹ ốc vi cấp của KHV, quan sát tế bào hay vi trường
- cần chụp ảnh trên màn hình máy vi tính.
- Chọn phần mềm AXIO vision Release 4.6 trên máy tính.
- Chọn Live trên thanh công cụ của cửa sổ AXIO vision.
- Vào Propertise / Adjust Chỉnh mức độ màu: 0,51 Cyan - Red  
0,51 Yellow - Blue  
0,00 Magenta – Green
- Chụp ảnh bằng cách vào Snap
- Chọn Prrocessing ở thanh công cụ chuẩn.

- + Vào Sharpen / Enhance Contour. Chọn Apply/ Cancel.
- + Vào Smooth / Gause/ Chọn Apply /Cancel.
- + Không lưu các ảnh: Snap và IP- Enhance Contour Image.
- + Lưu ảnh cuối cùng IP Gause Image.
- Lưu ảnh bằng cách vào File/Chọn Save as hoặc Save/ Tên BN mã số.

## **2. Thao tác ghi đĩa**

- Cho đĩa vào đầu ghi
- Khởi động phần mềm Nero
- Chọn biểu tượng Data/ Make Data CD(📀)

Tại cửa sổ Disc Content → chọn ⊕ Add sẽ xuất hiện cửa sổ để chọn nơi lưu ảnh. Chọn ảnh bằng chuột trái hoặc Clrt+A → nhấn Add → finish hoặc Close để thoát khỏi cửa sổ chọn ảnh.

- Nhấn Next: Tại vị trí Current reccorde chọn ổ đĩa để ghi (thường là CD-R/RW). Sau đó là chọn chế độ ghi (thường là chọn 24 bit/s...)

- Nhấn biểu tượng và chữ Burn.

- Khi hoàn tất máy sẽ yêu cầu → chọn Ok → khay đĩa đẩy ra và lấy đĩa CD.

- Thoát khỏi chương trình Nero (máy sẽ hỏi có lưu hay không lưu nội dung đã ghi).

## **IV. YÊU CẦU CHẤT LƯỢNG.**

Chụp được đúng tế bào, vi trường... cần chụp, ảnh rõ nét, đẹp.

# CHỤP ẢNH TRÊN KÍNH HIỂN VI KỸ THUẬT SỐ

## I. NGUYÊN LÝ

Chụp ảnh tiêu bản bệnh phẩm (máu, dịch hút tủy xương, sinh thiết tủy xương, hạch, các dịch sinh học khác..).

## II. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

01 Kỹ thuật viên hoặc Cử nhân kỹ thuật, bác sĩ chuyên khoa Huyết học - Truyền máu.

### 2. Phương tiện

- Kính hiển vi quang học có cấu hình camera và phần mềm chụp ảnh, xử lý ảnh.

- Máy tính, máy in màu.

### 3. Bệnh phẩm

Tiêu bản bệnh phẩm (máu, dịch hút tủy xương, sinh thiết tủy xương, hạch, các dịch sinh học khác..).

### 4. Phiếu xét nghiệm

## III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Bật máy tính và KHV.
- Chọn vi trường tế bào cần chụp ảnh trên KHV.
- Chỉnh nét ảnh bằng xoay nhẹ ốc vi cấp của KHV, quan sát tế bào hay vi trường cần chụp ảnh trên màn hình máy vi tính.
- Chọn phần mềm AXIO vision Release 4.6 trên máy tính.
- Chọn Live trên thanh công cụ của cửa sổ AXIO vision.
- Vào Propertise / Adjust Chỉnh mức độ màu: 0,51 Cyan \_ Red  
0,51 Yellow \_ Blue  
0,00 Magenta \_ Green
- Chụp ảnh bằng cách vào Snap
- Chọn Prrocessing ở thanh công cụ chuẩn.
- + Vào Sharpen / Enhance Contour. Chọn Apply/ Cancel.
- + Vào Smooth / Gause/ Chọn Apply /Cancel.
- + Không lưu các ảnh: Snap và IP- Enhance Contour Image.
- + Lưu ảnh cuối cùng IP Gause Image.
- Lưu ảnh bằng cách vào File/Chọn Save as hoặc Save/ Tên BN mã số.

#### **IV. YÊU CẦU CHẤT LƯỢNG**

Chụp được đúng tế bào, vi trường... cần chụp, ảnh rõ nét, đẹp.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- 1. Đỗ Trung Phần (2013), “Kỹ thuật xét nghiệm huyết học cơ bản”, Nhà xuất bản Y học.**
- 2. SM Lewis, BJ Bain et al (2006), “*Pratice Hematology*”, 10<sup>th</sup> editon**
- 3 . Wintrobe’s Clinical Hematology 12th Edition (2009)**



## CHƯƠNG II: ĐÔNG CÂM MÁU (Hemostasis)

### THỜI GIAN MÁU CHẢY (Bleeding Time)

(phương pháp Ivy)

#### I. NGUYÊN LÝ

Là thời gian từ lúc tạo vết thương chuẩn ở vùng mặt trước cẳng tay đến khi máu ngừng chảy dưới áp suất 40mmHg trong suốt quá trình làm xét nghiệm; Đây là xét nghiệm được sử dụng để đánh giá giai đoạn cầm máu ban đầu.

#### II. CHỈ ĐỊNH

Tất cả những trường hợp nghi ngờ có bất thường giai đoạn cầm máu ban đầu: các bệnh lý về thành mạch (thiếu vitamin C...) bệnh lý về số lượng, chất lượng tiểu cầu (xuất huyết giảm tiểu cầu, von Willebrand, Glanzmann...).

#### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

#### IV. CHUẨN BỊ

##### 1. Người thực hiện

1 kỹ thuật viên xét nghiệm.

##### 2. Phương tiện, hóa chất

- Máy đo huyết áp;
- Kim chích chuyên dụng;
- Đồng hồ bấm giây;
- Giấy thấm;
- Băng thấm, dung dịch sát trùng (ether, cồn).

##### 3. Người bệnh

Không cần chuẩn bị gì đặc biệt.

##### 4. Hồ sơ bệnh án

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán.

#### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Người bệnh ở tư thế nằm hoặc ngồi, thoải mái;
- Dùng máy đo huyết áp bơm và giữ ổn định áp lực ở mức 40mmHg;

- Chọn ở mặt trước trong cẳng tay vùng không có lông, không có mạch máu, tiến hành sát trùng nhẹ nhàng bằng cồn hoặc ether;

- Đợi 1- 2 phút cho dung dịch sát trùng bay hơi hết, sử dụng kim đặc chủng tạo 3 vết cắt cách nhau 2cm, có kích thước tương tự, có độ sâu khoảng 3mm. Khởi động đồng hồ bấm giây ngay khi mỗi vết thương được tạo thành;

- Cứ 30 giây 1 lần, dùng giấy thấm, thấm máu chảy ra từ vết cắt cho đến khi máu ngừng chảy; Bấm đồng hồ dừng lại, ghi thời gian máu chảy của từng vết thương.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Ghi kết quả vào giấy xét nghiệm;

- Điền đầy đủ ngày, tháng năm và kỹ thuật viên tiến hành xét nghiệm ký tên.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Kích thước vết chích không đạt tiêu chuẩn: quá nông hoặc quá sâu;

- Động tác thấm máu từ vết chích quá mạnh gây bong nút tiểu cầu vừa mới hình thành.

# **NGHIỆM PHÁP DÂY THẮT (Tournique Test)**

*(phương pháp tăng áp)*

## **I. NGUYÊN LÝ**

Đánh giá sức bền của mao mạch qua các nốt xuất huyết dưới da sau khi tăng áp lực của máu bằng cách tạo ra một sự ứ đọng tĩnh mạch. Đây là một trong những xét nghiệm được sử dụng để đánh giá giai đoạn cầm máu ban đầu.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Tất cả những trường hợp nghi ngờ suy giảm sức bền mao mạch.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

1 kỹ thuật viên xét nghiệm.

### **2. Phương tiện, hóa chất**

- Máy đo huyết áp;
- Đồng hồ.

### **3. Người bệnh**

Không cần chuẩn bị gì đặc biệt.

### **4. Hồ sơ bệnh án**

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Kiểm tra nốt xuất huyết trên tay người bệnh (Nếu có, cần ghi rõ để phân biệt với nốt xuất huyết mới xuất hiện sau khi tiến hành kỹ thuật);
- Đo huyết áp người bệnh;
- Duy trì áp lực bằng máy đo huyết áp ở trị số trung bình giữa huyết áp tối đa và tối thiểu trong 10 phút;
- Tháo nhanh máy đo huyết áp, giơ cao tay người bệnh để máu lưu thông bình thường.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Đọc kết quả bằng cách đếm các nốt xuất huyết mới ở vùng phía dưới dải quấn đo huyết áp;

- Ghi kết quả: bình thường không có nốt xuất huyết mới. Khi có >10 nốt xuất huyết mới trên diện tích 10cm<sup>2</sup> dấu hiệu dây thắt được gọi là dương tính và tùy theo số nốt xuất huyết xuất hiện mà kết quả được biểu thị (+), (++), (+++);

- Điền đầy đủ ngày, tháng năm và kỹ thuật viên tiến hành xét nghiệm ký tên.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

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

## **PHÁT HIỆN KHÁNG ĐÔNG ĐƯỜNG NGOẠI SINH (Prothrombin time 1:1 mix)**

### **I. NGUYÊN LÝ**

Thời gian đông của xét nghiệm PT (prothrombin time) đánh giá đường ngoại sinh kéo dài do 2 nhóm nguyên nhân chính: thiếu hụt hoặc có chất ức chế một hoặc nhiều yếu tố đông máu tham gia con đường đông máu này. Tiến hành xét nghiệm PT với mẫu trộn huyết tương người bệnh với huyết tương bình thường theo tỷ lệ 1: 1 (PT 1:1 mix test) để phân biệt 2 nhóm nguyên nhân này: PT của mẫu trộn sẽ điều chỉnh về bình thường nếu thiếu hụt yếu tố đông máu, PT của mẫu trộn không điều chỉnh về bình thường trong trường hợp có chất ức chế.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Tất cả những trường hợp kết quả xét nghiệm đánh giá đường đông máu ngoại sinh kéo dài bất thường.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên xét nghiệm; 01 bác sĩ xét nghiệm Huyết học.

#### **2. Phương tiện, hóa chất**

- Tủ lạnh;
- Máy ly tâm;
- Bình cách thủy 37°C/ máy đông máu bán tự động/ máy đông máu tự động;
- Đồng hồ bấm giây;
- Bơm tiêm nhựa lấy máu;
- Bông cotton sát trùng, dây garo;
- Ống nghiệm tan máu kích thước 75 x 9,5mm;
- Ống nghiệm plastic có chống đông citrat natri 3,2% hoặc 3,8%;
- Pipette 100µl;
- Đồng hồ bấm giây;
- Nước cất;
- Thromboplastin canxi;
- Huyết tương chứng.

### **3. Người bệnh**

Không cần chuẩn bị gì đặc biệt.

### **4. Hồ sơ bệnh án**

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên đầy đủ, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Garo, sát trùng, lấy khoảng 2ml máu tĩnh mạch của người bệnh và 2ml máu tĩnh mạch của chứng bình thường (nếu không có mẫu chứng thương mại);
- Trộn đều máu với chất chống đông citrate natri 3,2% hoặc 3,8% theo tỷ lệ 1 thể tích chống đông trộn với 9 thể tích máu;
- Ly tâm mạnh để thu huyết tương nghèo tiểu cầu bệnh và chứng;
- Tiến hành xét nghiệm PT đồng thời với 3 mẫu huyết tương trong cùng điều kiện:
  - + Mẫu huyết tương chứng;
  - + Mẫu huyết tương bệnh;
  - + Mẫu huyết tương hỗn hợp chứng và bệnh theo tỷ lệ 1:1.
- Ghi thời gian đông của cả 3 mẫu.

### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- + PT của hỗn hợp bệnh và chứng điều chỉnh về bình thường: kháng đông ngoại sinh âm tính;
- + PT của hỗn hợp bệnh và chứng không điều chỉnh về bình thường: kháng đông ngoại sinh dương tính;
- Ghi kết quả kháng đông ngoại sinh dương tính hay âm tính vào giấy xét nghiệm;
- Điền đầy đủ ngày, tháng năm, kỹ thuật viên tiến hành và bác sĩ nhận định kết quả xét nghiệm ký tên.

### **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Mẫu huyết tương chứng không đảm bảo chất lượng;
- Mẫu huyết tương hỗn hợp bệnh và chứng không đảm bảo tỷ lệ.
- Các mẫu kiểm tra: huyết tương bệnh, chứng và huyết tương hỗn hợp bệnh và chứng không được tiến hành xét nghiệm PT cùng thời điểm, cùng hóa chất...

# **ĐỊNH LƯỢNG FIBRINOGEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIÁN TIẾP (PT-BASED ASSAYS) BẰNG MÁY BÁN TỰ ĐỘNG/TỰ ĐỘNG**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Tiến hành xét nghiệm PT mẫu máu cần kiểm tra, nồng độ fibrinogen sẽ được suy ra từ mức độ thay đổi mật độ quang so với đường cong chuẩn; Đường cong chuẩn được thành lập dựa vào mức độ thay đổi mật độ quang học khi tiến hành xét nghiệm PT ở các nồng độ pha loãng khác nhau của mẫu huyết tương chuẩn đã biết trước nồng độ fibrinogen.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Tất cả những trường hợp định lượng fibrinogen nhằm mục đích sàng lọc bất thường đông cầm máu.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên xét nghiệm.

### **2. Phương tiện, hóa chất**

- Tủ lạnh;
- Máy ly tâm;
- Máy đông máu bán tự động/tự động;
- Pipette 100 $\mu$ l, 1000  $\mu$ l;
- Đồng hồ bấm giây;
- Bơm tiêm nhựa lấy máu;
- Bông cotton sát trùng, dây garo;
- Ống nghiệm plastic có chống đông citrat natri 3,2% hoặc 3,8%;
- Thromboplastin canxi;
- Nước cất.

### **3. Người bệnh**

Không cần chuẩn bị gì đặc biệt.

### **4. Hồ sơ bệnh án**

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Bật máy đông máu, chờ đủ nhiệt độ;
- Garo, sát trùng, lấy khoảng 2ml máu tĩnh mạch của người bệnh;
- Trộn máu và chất chống đông citrat natri 3,2% hoặc 3,8% theo tỷ lệ 1 thể tích chống đông trộn với 9 thể tích máu;
- Ly tâm mạnh thu huyết tương nghèo tiểu cầu;
- Tách lấy huyết tương cho vào cup đựng mẫu hoặc đặt trực tiếp ống máu đã ly tâm vào khay mẫu của máy (tùy theo loại máy);
- Chọn chương trình PT - Fib. trên máy đông máu;
- Chuẩn bị thromboplastin canxi theo hướng dẫn của nhà sản xuất;
- Đặt hóa chất đã chuẩn bị vào đúng vị trí ở khay hóa chất của máy;
- Tiến hành kỹ thuật theo đúng các bước được hướng dẫn trên màn hình của từng loại máy.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Ghi kết quả vào giấy xét nghiệm.
- Điền đầy đủ ngày, tháng năm và kỹ thuật viên tiến hành xét nghiệm ký tên.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Mẫu máu bị đông, vỡ hồng cầu;
- Thromboplastin canxi không đảm bảo chất lượng.



## **ĐỊNH LƯỢNG YẾU TỐ XII (FACTOR XII ASSAY)**

(phương pháp 1 thì)

### **I. NGUYÊN LÝ**

Thiếu hụt yếu tố XII sẽ làm xét nghiệm APTT bị kéo dài, APTT sẽ được điều chỉnh khi bổ sung huyết tương có yếu tố XII và mức độ cần bổ sung phụ thuộc nồng độ yếu tố XII có trong huyết tương cần kiểm tra. Dựa vào đó, người ta tiến hành APTT của mẫu huyết tương cần kiểm tra sau khi cho thêm huyết tương có đầy đủ các yếu tố đông máu tham gia đường đông máu nội sinh trừ yếu tố XII. Nồng độ yếu tố XII sẽ được tính dựa vào đồ thị chuẩn được thành lập với các nồng độ pha loãng khác nhau của huyết tương chứng.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Tất cả những trường hợp nghi ngờ thiếu hụt yếu tố XII.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện:**

01 kỹ thuật viên xét nghiệm; 01 bác sĩ xét nghiệm Huyết học.

#### **2. Phương tiện, hóa chất**

- Tủ lạnh;
- Máy ly tâm;
- Bình cách thủy 37°C/ máy đông máu bán tự động/ máy đông máu tự động;
- Đồng hồ bấm giây;
- Pipette: 50µl, 100 µl, 1.000 µl;
- Bơm kim tiêm nhựa lấy máu;
- Băng, cồn sát trùng, dây garo;
- Ống nghiệm tan máu kích thước 75 x 9,5mm;
- Ống nghiệm plastic có chống đông citrat natri 3,2% hoặc 3,8%;
- Nước cất;
- Huyết tương chứng đã biết nồng độ yếu tố XII;
- Huyết tương không có yếu tố XII;
- Canxi clorua M/40;
- Cephalin kaolin.

### 3. Người bệnh

Không cần chuẩn bị gì đặc biệt.

### 4. Hồ sơ bệnh án

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, điều trị.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Gáo, sát trùng, lấy khoảng 2ml máu tĩnh mạch của người bệnh và 2ml máu tĩnh mạch của chứng bình thường (nếu không có mẫu chứng thương mại);

- Trộn đều máu với chất chống đông citrate natri 3,2% hoặc 3,8% theo tỷ lệ 1 thể tích chống đông trộn với 9 thể tích máu;

- Ly tâm mạnh để thu huyết tương nghèo tiểu cầu bệnh và chứng.

+ *Trường hợp tiến hành bằng tay:*

\* Pha loãng huyết tương chứng ít nhất ở 3 nồng độ: 1/10, 1/20, 1/40;

\* Pha loãng huyết tương bệnh 1/10;

\* *Xây dựng đồ thị chuẩn:* chuẩn bị 3 ống nghiệm tan máu:

(1) Mỗi ống cho vào 100  $\mu$ l huyết tương chứng ở mỗi nồng độ đã pha loãng, 100  $\mu$ l huyết tương không có yếu tố XII, 100  $\mu$ l hỗn dịch cephalin-kaolin;

(2) Ủ ở bình cách thuỷ 37°C trong 2 phút;

(3) Cho thêm 100  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> M/40; Bấm đồng hồ, theo dõi thời gian đông.

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

\* *Xét nghiệm mẫu kiểm tra:* Trong 1 ống nghiệm tan máu chuẩn, cho vào:

(1) 100  $\mu$ l huyết tương bệnh pha loãng 1/10 và 100  $\mu$ l huyết tương không có yếu tố XII, 100  $\mu$ l hỗn dịch cephalin-kaolin;

(2) Ủ ở bình cách thuỷ 37°C trong 2 phút;

(3) Cho thêm 100  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> M/40; Bấm đồng hồ, theo dõi thời gian đông.

Từ thời gian đông của mẫu huyết tương cần kiểm tra, qua đồ thị chuẩn, sẽ tính được nồng độ yếu tố XII.

+ *Trường hợp tiến hành trên máy đông máu tự động:*

- Chọn chương trình tạo đồ thị chuẩn: máy sẽ tự động pha loãng và cho ra kết quả ; Dựa vào chỉ số r để quyết định chấp nhận đồ thị này hay không.

- Tiến hành định lượng yếu tố XII của mẫu kiểm tra: chọn chương trình factor XII assay và tiến hành các bước theo hướng dẫn trên màn hình tùy từng loại máy.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Dựa vào đồ thị chuẩn để tính nồng độ yếu tố XII;

- Kết quả: ghi % hoạt tính yếu tố XII vào giấy xét nghiệm;

- Điền đầy đủ ngày, tháng năm, kỹ thuật viên tiến hành và bác sĩ nhận định kết quả xét nghiệm ký tên.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Mẫu máu bị đông;

- Chất lượng huyết tương không có yếu tố XII không đạt chuẩn;

- Đồ thị chuẩn không tốt.

# NGHIỆM PHÁP SINH THROMBOPLASTIN

(Thromboplastin Generation Test: TGT)

## I. NGUYÊN LÝ

Sử dụng huyết tương đã được hấp phụ  $Al(OH)_3$  cung cấp các yếu tố V, VIII và huyết thanh cung cấp các yếu tố IX, X, XI, XII cùng với sự có mặt của cephalin (yếu tố 3 tiểu cầu) để tiến hành đánh giá khả năng tạo thromboplastin nội sinh, qua đó phân biệt sự bất thường con đường đông máu nội sinh do thiếu hụt nhóm yếu tố V, VIII hay nhóm yếu tố IX, X, nhóm yếu tố XI, XII.

## II. CHỈ ĐỊNH

Tất cả những trường hợp bất thường đường đông máu nội sinh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện:

01 kỹ thuật viên xét nghiệm; 01 bác sĩ xét nghiệm Huyết học.

### 2. Phương tiện, hóa chất

- Tủ lạnh;
- Máy ly tâm;
- Bình cách thủy  $37^{\circ}C$ ;
- Đồng hồ bấm giây;
- Pipette: 50 $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1.000  $\mu$ l;
- Bơm kim tiêm nhựa lấy máu;
- Bông, cồn sát trùng, dây garo;
- Ống nghiệm tan máu kích thước 75 x 9,5mm;
- Ống nghiệm plastic có chống đông citrat natri 3,2% hoặc 3,8%;
- Nước muối sinh lý 0,9%;
- Đệm glyoxalin;
- Huyền dịch nhôm :  $Al(OH)_3$ ;
- Canxi M/40;
- Cephalin kaolin.

### 3. Người bệnh

Không cần chuẩn bị gì đặc biệt.

### 4. Hồ sơ bệnh án

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, điều trị.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Garo, sát trùng, lấy khoảng 5ml máu người bệnh, trong đó 2ml trộn đều máu với chất chống đông citrate natri 3,2% hoặc 3,8% theo tỷ lệ 1 thể tích chống đông trộn với 9 thể tích máu, ly tâm mạnh để thu huyết tương nghèo tiểu cầu; 3ml còn lại cho đều vào 2 ống thủy tinh, đặt ở bình cách thủy 37°C để thu huyết thanh;

- Garo, sát trùng, lấy khoảng 5ml máu chứng (người bình thường), trong đó 2ml trộn đều máu với chất chống đông citrate natri 3,2% hoặc 3,8% theo tỷ lệ 1 thể tích chống đông trộn với 9 thể tích máu, 3ml còn lại cho đều vào 2 ống thủy tinh, đặt ở bình cách thủy 37°C để thu huyết thanh chứng;

- Sau khi ly tâm mạnh để thu huyết tương chứng nghèo tiểu cầu, tiến hành hút bởi huyền dịch nhôm;

- Mẫu huyết tương chứng sau khi hút bởi huyền dịch nhôm, được pha loãng ở nồng độ 1/5 bằng nước muối sinh lý 0,9%;

- Mẫu huyết thanh chứng được pha loãng ở nồng độ 1/10 bằng đệm glyoxaline;

- Chuẩn bị 1 dãy các ống nghiệm tan máu, cho sẵn 0,2 ml canxi clorua M/40, đặt ở bình cách thủy 37°C;

- Trong 1 ống nghiệm tan máu khác, cho vào:

(1) 0,4 ml huyết tương đã hấp phụ nhôm, 0,4 ml huyết thanh, 0,4 ml cephalin;

(2) Đặt ở bình cách thủy 37°C trong 30 giây;

(3) Cho thêm 0,4ml canxi clorua M/40, khởi động đồng hồ ngay;

(4) Ở thời điểm 50 giây, hút 0,1ml ở ống hỗn dịch trên, cho vào ống đã có sẵn 0,2ml canxi clorua M/40 đang đặt ở bình cách thủy 37°C;

(5) Ở thời điểm 60 giây, cho thêm 0,2ml huyết tương cơ chất vào ống vừa chuẩn bị ở bước 4, khởi động đồng hồ bấm giây, ghi thời gian đông.

Tiếp tục lặp lại bước 4 và 5 ở những khoảng thời gian nhất định.

*Kỹ thuật này được thực hiện 4 lần với các thành phần sau:*

*Huyết tương*

*Huyết thanh*

1. Bình thường

+

Bình thường

- 2. Bình thường + Bệnh
- 3. Bệnh + Bình thường
- 4. Bệnh + Bệnh

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Kết quả: ghi rõ bất thường đông máu nội sinh do thiếu hụt nhóm yếu tố nào: V và VIII hay IX và X hoặc XI và XII tùy theo kết quả, cụ thể:

<i>Huyết tương hấp phụ</i>	<i>Huyết thanh</i>	<i>Kết quả</i>	<i>Nhận định</i>
Bình thường	Bệnh	Kéo dài	Thiếu hụt yếu tố IX hoặc X
Bệnh	Bình thường	Kéo dài	Thiếu hụt yếu tố V hoặc VIII
Bệnh	Bệnh	Kéo dài	Thiếu hụt yếu tố XI hoặc XII

- Điền đầy đủ ngày, tháng năm, kỹ thuật viên tiến hành và bác sĩ nhận định kết quả xét nghiệm ký tên.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Tách huyết thanh chứng và bệnh khi ống máu đông chưa đủ thời gian để 4 giờ ở bình cách thủy 37°C;

- Huyết tương cơ chất không đảm bảo chất lượng.

## **ĐỊNH LƯỢNG ỨC CHẾ YẾU TỐ IX (FACTOR IX INHIBITOR ASSAY)**

### **I. NGUYÊN LÝ**

Bằng cách trộn huyết tương người bệnh với chế phẩm yếu tố IX cô đặc đã biết trước nồng độ yếu tố IX, sau đó định lượng yếu tố IX còn lại trong chế phẩm cô đặc, sẽ biết được nồng độ ức chế có trong huyết tương cần đánh giá. Định lượng ức chế IX rất hữu ích trong điều trị cũng như theo dõi người bệnh có chất ức chế này.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Tất cả những trường hợp kết quả xét nghiệm định tính ức chế yếu tố IX cho kết quả dương tính.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên xét nghiệm; 01 bác sĩ xét nghiệm Huyết học.

#### **2. Phương tiện, hóa chất**

- Tủ lạnh;
- Máy ly tâm;
- Bình cách thủy 37°C/ máy đông máu bán tự động/ máy đông máu bán tự động tự động;
- Đồng hồ bấm giây;
- Giấy log kép để tính nồng độ yếu tố IX (trường hợp sử dụng phương pháp thủ công);
- Bơm tiêm nhựa lấy máu;
- Bông cotton sát trùng, dây garo;
- Ống nghiệm tan máu kích thước 75 x 9,5mm;
- Ống nghiệm plastic có chống đông citrat natri 3,2% hoặc 3,8%;
- Pipette 100µl, 200µl, 1.000µl;
- Đồng hồ bấm giây;
- Nước cất;
- CaCl<sub>2</sub> M/40;
- Cephalin - kaolin;

- Chế phẩm yếu tố IX cô đặc;
- Huyết tương không có yếu tố IX.

### **3. Người bệnh**

Nhịn ăn sáng, trừ trường hợp cấp cứu.

### **4. Hồ sơ bệnh án**

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán, điều trị...

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Gáo, sát trùng, lấy khoảng 2ml máu tĩnh mạch của bệnh và 2ml máu tĩnh mạch của chứng bình thường (nếu không có mẫu chứng thương mại);
- Trộn đều máu với chất chống đông citrate natri 3,2% hoặc 3,8% theo tỷ lệ 1 thể tích chống đông trộn với 9 thể tích máu;
- Ly tâm mạnh để thu huyết tương nghèo tiểu cầu chứng và bệnh;
- Chuẩn bị 2 ống nghiệm: 1 ống cho 0,4ml huyết tương bệnh và ống còn lại: 0,4ml huyết tương chứng;
- Cho thêm vào mỗi ống 0,1 ml chế phẩm IX cô đặc, trộn đều;
- Tiến hành kỹ thuật định lượng yếu tố IX cho 2 ống ở trên;
- Tính nồng độ yếu tố IX trong hỗn dịch huyết tương bệnh và so sánh với mẫu huyết tương chứng.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Ghi kết quả: Ghi nồng độ ức chế IX vào giấy xét nghiệm;
- Điền đầy đủ ngày, tháng năm, kỹ thuật viên tiến hành và bác sĩ nhận định kết quả xét nghiệm ký tên.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Chất lượng chế phẩm yếu tố IX cô đặc không đảm bảo;
- Đồ thị chuẩn không tốt;
- Thời gian từ khi pha loãng huyết tương đến khi tiến hành kỹ thuật quá lâu.



# **ĐỊNH LƯỢNG HOẠT TÍNH PLASMINOGEN (PLASMINOGEN ACTIVITY ASSAY)**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Thiếu hụt plasminogen thường gây nên tình trạng huyết khối; Tiến hành định lượng hoạt tính plasminogen bằng phương pháp sử dụng streptokinase để hoạt hóa plasminogen có mặt trong mẫu huyết tương cần kiểm tra, sau đó phức hợp plasminogen - streptokinase được phát hiện bằng cơ chất tạo màu.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Những trường hợp nghi ngờ thiếu hụt plasminogen bẩm sinh hoặc mắc phải: huyết khối tĩnh mạch, điều trị thuốc tiêu cục đông, DIC...

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên xét nghiệm; 01 bác sĩ xét nghiệm Huyết học.

### **2. Phương tiện, hóa chất**

- Máy đông máu có kênh so màu;
- Bơm tiêm nhựa lấy máu;
- Bông cotton sát trùng, dây garo;
- Ống nghiệm plastic có chống đông citrat natri 3,2% hoặc 3,8%;
- Pipette 100 $\mu$ l, 200 $\mu$ l, 1.000 $\mu$ l;
- Bộ kit định lượng hoạt tính plasminogen bao gồm: cơ chất tạo màu, streptokinase, đệm.

### **3. Người bệnh**

Không cần chuẩn bị gì đặc biệt.

### **4. Hồ sơ bệnh án**

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán...

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Lấy 02 ml máu tĩnh mạch, trộn đều với chất chống đông citrat natri 3,2% hoặc 3,8% theo tỷ lệ 1 thể tích chống đông cho 9 thể tích máu;
- Ly tâm mạnh, thu huyết tương nghèo tiểu cầu;

- Bật máy đông máu, chờ đủ nhiệt độ;
- Chuẩn bị bộ kit định lượng hoạt tính plasminogen theo chỉ dẫn của nhà sản xuất;
- Tiến hành kỹ thuật theo các bước được hướng dẫn cụ thể tùy theo từng loại máy đông máu mà phòng xét nghiệm hiện có.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Ghi kết quả nồng độ hoạt tính plasminogen của mẫu kiểm tra và trị số bình thường vào giấy xét nghiệm;
- Điền đầy đủ ngày, tháng năm, kỹ thuật viên tiến hành và bác sĩ nhận định kết quả xét nghiệm ký tên.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Mẫu máu bị đông, vỡ hồng cầu;
- Garô tĩnh mạch quá lâu trước khi lấy máu xét nghiệm.

## **ĐO ĐỘ QUÁNH MÁU/ HUYẾT TƯƠNG (WHOLE BLOOD/PLASMA VISCOSITY TEST)**

### **I. NGUYÊN LÝ**

Đo độ quánh của máu toàn phần hoặc huyết tương bằng kỹ thuật FOR (Free Oscillation Rheometry), dựa vào sự thay đổi tần số và biên độ dao động tự do và so sánh với đồ thị chuẩn để tính ra độ quánh của mẫu cần đo.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Tất cả những trường hợp nghi ngờ tăng độ quánh máu/huyết tương: đa hồng cầu, đa u tủy xương...

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

1 kỹ thuật viên xét nghiệm.

#### **2. Phương tiện, hóa chất**

- Garo, bông cotton sát trùng, bơm kim tiêm lấy máu;
- Ống nhựa có chất chống đông EDTA;
- Máy đo độ quánh;
- Pipet man loại 1ml, 0,5ml, 0,1ml;
- Máy ly tâm.

#### **3. Người bệnh**

Không cần chuẩn bị gì đặc biệt.

#### **4. Hồ sơ bệnh án**

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Garo, sát trùng và lấy khoảng 2ml máu tĩnh mạch;
- Trộn máu với chất chống đông EDTA;
- Ly tâm 3.000v/phút trong 20 phút thu huyết tương nghèo tiểu cầu nếu đo độ quánh huyết tương;
- Bật máy đo độ quánh;

- Hút 1ml máu toàn phần nếu đo độ quán máu, 0,6ml huyết tương nếu đo độ quán huyết tương cho vào công đo chuyên dụng, đặt công đo đã chứa mẫu đo vào buồng ủ;

- Chọn chương trình đo thích hợp với từng loại mẫu đo;
- Vào chương trình đo độ quán thích hợp.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Ghi kết quả độ quán đo được của mẫu cần kiểm tra và trị số bình thường vào giấy xét nghiệm;

- Điền đầy đủ ngày, tháng năm và kỹ thuật viên tiến hành xét nghiệm ký tên.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Mẫu máu bị đông;
- Chọn điều kiện nhiệt độ để đo độ quán không đúng.

## **PHÁT HIỆN KHÁNG ĐÔNG ĐƯỜNG CHUNG (THROMBIN TIME 1:1 MIX)**

### **I. NGUYÊN LÝ**

Thời gian đông của xét nghiệm thời gian thrombin (TT) kéo dài do 2 nhóm nguyên nhân chính: thiếu hụt yếu tố đông máu hoặc do có chất ức chế con đường đông máu này. Tiến hành xét nghiệm TT với mẫu trộn huyết tương người bệnh với huyết tương bình thường theo tỷ lệ 1: 1 (TT 1:1 mix test) để phân biệt 2 nhóm nguyên nhân này: TT của mẫu trộn sẽ điều chỉnh về bình thường nếu thiếu hụt yếu tố đông máu, TT của mẫu trộn không điều chỉnh về bình thường trong trường hợp có chất ức chế.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Tất cả những trường hợp kết quả xét nghiệm đánh giá đường đông máu chung (Thrombin time) kéo dài.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên; 01 bác sĩ xét nghiệm Huyết học.

#### **2. Phương tiện, hóa chất**

- Tủ lạnh;
- Máy ly tâm;
- Bình cách thủy 37°C/ máy đông máu bán tự động/ máy đông máu tự động;
- Đồng hồ bấm giây;
- Bơm tiêm nhựa lấy máu;
- Bông cotton sát trùng, dây garo;
- Ống nghiệm tan máu kích thước 75 x 9,5mm;
- Ống nghiệm plastic có chống đông citrat natri 3,2% hoặc 3,8%;
- Pipette 100µl, 1.000 µl;
- Thrombin pha loãng nồng độ thích hợp để tiến hành kỹ thuật thời gian thrombin.

#### **3. Người bệnh**

Không cần chuẩn bị gì đặc biệt.

#### **4. Hồ sơ bệnh án**

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán...

#### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Gáo, sát trùng, lấy khoảng 2ml máu tĩnh mạch người bệnh và 2ml máu tĩnh mạch chứng bình thường (nếu không có mẫu chứng thương mại);

- Trộn đều máu với chất chống đông citrate natri 3,2% hoặc 3,8% theo tỷ lệ 1 thể tích chống đông trộn với 9 thể tích máu;

- Ly tâm mạnh để thu huyết tương nghèo tiểu cầu chứng và bệnh;

- Trộn huyết tương chứng và bệnh theo tỷ lệ 1:1;

- Tiến hành xét nghiệm TT đồng thời với 3 mẫu huyết tương trong cùng điều kiện:

+ Mẫu huyết tương chứng;

+ Mẫu huyết tương bệnh;

+ Mẫu huyết tương hỗn hợp chứng và bệnh theo tỷ lệ 1:1.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

+ TT hỗn hợp bệnh và chứng điều chỉnh về bình thường: kháng đông đường chung âm tính;

+ TT hỗn hợp bệnh và chứng không điều chỉnh: kháng đông đường chung dương tính;

- Ghi kết quả kháng đông đường chung dương tính hay âm tính vào giấy xét nghiệm;

- Điền đầy đủ ngày, tháng năm, kỹ thuật viên tiến hành và bác sĩ nhận định kết quả xét nghiệm ký tên.

#### **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Mẫu huyết tương chứng không đảm bảo chất lượng;

- Mẫu huyết tương hỗn hợp bệnh và chứng không đảm bảo tỷ lệ.

- Các mẫu kiểm tra: huyết tương bệnh, chứng và huyết tương hỗn hợp bệnh và chứng không được tiến hành xét nghiệm TT cùng thời điểm, cùng lô hóa chất...

# **XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN GIẢM TIỂU CẦU DO HEPARIN**

(Heparin Induced Thrombocytopenia: HIT)

## **I. NGUYÊN LÝ**

Khi người bệnh được điều trị heparin, thuốc này có thể kết hợp với yếu tố 4 tiểu cầu tạo phức hợp có tính kháng nguyên và trong một số trường hợp, cơ thể người bệnh tạo kháng thể chống lại kháng nguyên này, gây nên tình trạng giảm tiểu cầu ở người bệnh và được gọi là tình trạng giảm tiểu cầu do heparin. Sử dụng kỹ thuật ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) hoặc miễn dịch hóa phát quang (chemiluminescent testing) để phát hiện kháng thể kháng tiểu cầu do heparin.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Tất cả những trường hợp nghi ngờ có tình trạng giảm tiểu cầu do heparin.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên; 01 bác sĩ xét nghiệm Huyết học.

### **2. Phương tiện, hóa chất**

- Máy Acustar hoặc hệ thống ELISA;
- Tủ lạnh;
- Máy ly tâm;
- Bơm tiêm nhựa lấy máu;
- Bông cồn sát trùng, dây garo;
- Ống nghiệm tan máu kích thước 75 x 9,5mm;
- Ống nghiệm plastic có chống đông citrat natri 3,2% hoặc 3,8%;
- Pipette 100µl, 1.000 µl;
- Hóa chất sinh phẩm: HemosIL AcuStar HIT-IgG(PF4-H) và HemosIL

AcuStar HIT-Ab(PF4-H) hoặc HIA IgG và HIA IgGAM ELISA.

### **3. Người bệnh**

Không cần chuẩn bị gì đặc biệt.

### **4. Hồ sơ bệnh án**

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán...

#### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Gáo, sát trùng, lấy khoảng 2ml máu tĩnh mạch người bệnh;
- Trộn đều máu với chất chống đông citrate natri 3,2% hoặc 3,8% theo tỷ lệ 1 thể tích chống đông trộn với 9 thể tích máu;
- Ly tâm mạnh để thu huyết tương nghèo tiểu cầu;
- Bật máy, chờ đủ nhiệt độ;
- Đặt mẫu huyết tương cần kiểm tra vào vị trí khay mẫu;
- Đặt hóa chất sinh phẩm vào đúng vị trí trên máy;
- Tiến hành các thao tác chạy máy theo các bước theo quy định.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Đánh giá kết quả dựa vào giá trị cut off;
- Ghi kết quả vào giấy xét nghiệm;
- Điền đầy đủ ngày, tháng năm, kỹ thuật viên tiến hành xét nghiệm và bác sĩ nhận định kết quả xét nghiệm ký tên.



# **ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG NGUYÊN CHẤT ỨC CHẾ HOẠT HÓA PLASMINOGEN 1**

(Plasminogen Activator Inhibitor type 1 Antigen: PAI -1 Antigen)

## **I. NGUYÊN LÝ**

Các chất hoạt hóa plasminogen đóng vai trò trung tâm trong điều hòa hệ thống tiêu sợi huyết, được kiểm soát bởi các chất ức chế hoạt hóa plasminogen (plasminogen Activator Inhibitor: PAI). PAI -1 là chất ức chế sinh lý chính của t-PA (tissue type plasminogen activator) có trong huyết tương. Kháng nguyên PAI -1 được định lượng bằng phương pháp ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Tất cả những trường hợp nghi ngờ tăng hoặc giảm PAI - 1.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

01 kỹ thuật viên; 01 bác sĩ xét nghiệm Huyết học.

### **2. Phương tiện, hóa chất**

- Tủ lạnh đựng hóa chất sinh phẩm;
- Máy ly tâm;
- Hệ thống ELISA;
- Bơm tiêm nhựa lấy máu;
- Bông cotton sát trùng, dây garo;
- Ống nghiệm plastic có chống đông citrat natri 3,2% hoặc 3,8%;
- Pipette 100µl, 1.000 µl;
- Sinh phẩm định lượng kháng nguyên PAI - 1 thương mại;

### **3. Người bệnh**

Không cần chuẩn bị gì đặc biệt.

### **4. Hồ sơ bệnh án**

Chỉ định xét nghiệm được ghi rõ trong bệnh án; Giấy chỉ định xét nghiệm ghi đầy đủ thông tin về người bệnh: họ tên, tuổi, giường bệnh, khoa phòng, chẩn đoán...

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Gáo, sát trùng, lấy khoảng 2ml máu tĩnh mạch;
- Trộn đều máu với chất chống đông citrate natri 3,2% hoặc 3,8% theo tỷ lệ: 1 thể tích chống đông trộn với 9 thể tích máu;
- Ly tâm mạnh để thu huyết tương nghèo tiểu cầu;
- Chuẩn bị đầy đủ hóa chất sinh phẩm thương mại định lượng kháng nguyên PAI -1;
- Tiến hành định lượng kháng nguyên PAI - 1 theo các bước được hướng dẫn.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Ghi kết quả nồng độ kháng nguyên PAI - 1 của mẫu kiểm tra và giá trị bình thường (khoảng 4-40 ng/mL) vào giấy xét nghiệm;
- Điền đầy đủ ngày, tháng năm, kỹ thuật viên tiến hành xét nghiệm và bác sĩ nhận định kết quả xét nghiệm ký tên.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Trần Văn Bé (1989), “Kỹ thuật đông máu”, Thực hành Huyết học và Truyền máu, Nhà xuất bản Y học năm 2013, tr. 225-350.
2. Mike Laffan, Richard Manning (2010), “Investigation of Hemostasis”, Practical Haematology, Churchill Livingstone, Tenth edition, pp379-440.
3. Nguyễn Ngọc Minh (1997), Cầm máu và đông máu: Kỹ thuật và ứng dụng trong lâm sàng, Nhà xuất bản Y học Hà nội năm 1997.
4. Đỗ Trung Phần và cộng sự (2013), Kỹ thuật xét nghiệm Huyết học và Truyền máu ứng dụng trong lâm sàng (tái bản lần thứ 2), Nhà xuất bản Y học năm 2013.
5. Bạch Quốc Tuyên và cs (1978), “Các xét nghiệm đông máu”, Kỹ thuật xét nghiệm Huyết học và Truyền máu, ĐHY Hà nội, tr.142-179.
6. Wayne L.Chandler, Albert R.Laspada (2005), Handbook of diagnostic Hemostasis and Thrombosis tests, University of Washington, Third edition 2005.

# CHƯƠNG III: MIỄN DỊCH-DI TRUYỀN-SINH HỌC PHÂN TỬ (DÀNH CHO CHUYÊN NGÀNH HUYẾT HỌC-TRUYỀN MÁU)

## Immunology genetics -Molecular biology for Hematology

### ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG nDNA BẰNG KỸ THUẬT MIỄN DỊCH GẮN MEN (ELISA)

*(Anti –nDNA quantitative test by ELISA)*

#### I. NGUYÊN LÝ

Kháng nguyên nDNA được gắn sẵn trong các giếng nhựa sẽ kết hợp với kháng thể đặc hiệu anti – nDNA IgG-IgM (nếu có) trong huyết thanh người bệnh khi ủ tạo nên phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể đặc hiệu. Sau khi rửa bỏ huyết thanh thừa, cho chất cộng hợp (còn gọi là conjugate) có bản chất là hỗn hợp anti IgG và anti IgM người gắn enzym peroxidase. Khi đó cộng hợp sẽ gắn đặc hiệu vào phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể (nếu có). Sau khi rửa bỏ lượng cộng hợp dư thừa không gắn với phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể, cho tiếp vào giếng phản ứng một lượng xác định cơ chất TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enzym peroxidase trong giếng phản ứng (nếu có) sẽ xúc tác tạo phản ứng giữa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và TMB tạo màu xanh lá cây. Phản ứng được ngừng lại bằng dung dịch a-xít H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> loãng, lúc này màu xanh của dung dịch chuyển thành màu vàng chanh, đậm độ màu tương quan thuận với nồng độ kháng thể IgG và IgM có trong huyết thanh. Xác định mức độ màu bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 450 nm hoặc bước sóng kép 450 nm/620 nm.

#### II. CHỈ ĐỊNH

Các trường hợp nghi đến bệnh tự miễn.

#### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

#### IV. CHUẨN BỊ

##### 1. Người thực hiện

- Kỹ thuật viên và cử nhân đã được đào tạo thực hiện kỹ thuật;
- Bác sĩ xét nghiệm: đọc kết quả, đánh giá, kiểm tra chất lượng.

##### 2. Phương tiện - Hóa chất

###### 2.1. Phương tiện

- Máy ly tâm ống máu.

- Pipet và đầu pipet loại 25 $\mu$ l và 1000 $\mu$ l.
- Bàn máy ELISA (tự động hoặc bán tự động).
- Găng tay.

## 2.2. Hóa chất

Kít định tính nDNA IgG/IgM gồm các thành phần sau:

- Dung dịch pha loãng mẫu;
- Dung dịch rửa;
- Chứng âm (negative control);
- Chứng dương (positive control);
- Chứng ngưỡng (cut-off calibrator);
- Các nồng độ kháng thể chuẩn (calibrator): thường có 6 nồng độ chuẩn, giá trị cụ thể của các ống nồng độ chuẩn tùy thuộc vào hãng sản xuất;
- Dung dịch cộng hợp (conjugate): 1 lọ cộng hợp gồm cả IgG và IgM dùng để phát hiện kháng thể IgG và IgM;
- Cơ chất tạo màu (TMB substrate);
- Dung dịch dừng phản ứng (stop solution);
- Các giếng phản ứng trên phiến nhựa ELISA;
- Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypochlorite.

## 3. Mẫu bệnh phẩm

- Mẫu dùng là huyết thanh;
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng;
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm;
- Mẫu huyết thanh bảo quản ở nhiệt độ 2°C đến 8°C có thể dùng làm xét nghiệm trong vòng 7 ngày. Nếu muốn để lâu hơn mới xét nghiệm cần phải bảo quản ở tủ lạnh sâu ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ). Tuy nhiên với mẫu bảo quản lạnh sâu cần tránh đông-tan nhiều lần.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Pha loãng mẫu 100 lần bằng dung dịch pha loãng mẫu (cung cấp theo kit).
2. Nhỏ 100 $\mu$ l các nồng độ chuẩn (calibrator), mẫu chứng âm, chứng dương, các mẫu thử vào các giếng trên phiến theo sơ đồ định sẵn.
3. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.

4. Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa, 300 $\mu$ l /giếng/lần.
5. Nhỏ 100 $\mu$ l cộng hợp (conjugate) vào các giếng.
6. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.
7. Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa, 300 $\mu$ l /giếng/lần.
8. Nhỏ 100 $\mu$ l cơ chất tạo màu (TMB substrate) vào mỗi giếng.
9. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.
10. Nhỏ 100 $\mu$ l dung dịch dừng phản ứng (stop solution) vào mỗi giếng theo đúng trình tự nhỏ TMB.
11. Ủ tối thiểu 5 phút. Gõ nhẹ vào thành giếng trong 5 giây để trộn đều.
12. Đọc phiên ở bước sóng 450/620 nm (tốt hơn thì dùng bước sóng kép 450/ 620 nm) trong vòng 30 phút sau khi ủ dung dịch ngừng phản ứng.
13. Phân tích kết quả.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Căn cứ vào nồng độ chuẩn ghi trên các ống calibrator và mật độ quang đo được (chỉ số OD), nhập số liệu vào chương trình Excel để tính nồng độ kháng thể kháng nDNA (IgG và IgM) trong các mẫu thử.

- Giá trị biện luận: Tốt nhất phải căn cứ vào các hướng dẫn biện luận và đơn vị tính đã được chuẩn hóa chất lượng của nhà sản xuất kit. Một trong những kit nDNA tốt và phổ biến trên thị trường có thông số biện luận như sau:

- + Ngưỡng bình thường : < 12 U/ml;
- + Ngưỡng nghi ngờ : từ 12 – 18 U/ml;
- + Ngưỡng dương tính : > 18 U/ml.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất, máu bị đông;

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại thông tin giữa mẫu và giấy chỉ định, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Sai sót do nhỏ mẫu vào phiến phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Xử trí: Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu.

- Chứng dương âm tính hoặc chứng âm dương tính: Nếu xảy ra hiện tượng này đều không dùng được kết quả của lần xét nghiệm này. Nguyên nhân có thể do hóa chất không đảm bảo chất lượng, do không thực hiện đủ và đúng

các bước trong quy trình xét nghiệm, nhiệt độ phản ứng không phù hợp, thực hiện bước rửa kém hiệu quả.

Xử trí: làm lại xét nghiệm, kiểm tra chỉ dùng hóa chất còn hạn sử dụng và được bảo quản đúng điều kiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25-30°C).

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Aesku Diagnostics GmbH. 2007. *AESKULISA nDNA instruction manual*.

**ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG THỂ KHÁNG ds-DNA  
BẰNG KỸ THUẬT MIỄN DỊCH GẮN MEN (ELISA)  
(Anti –dsDNA quantitative test by ELISA)**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Kháng nguyên dsDNA được gắn sẵn trong các giếng nhựa sẽ kết hợp với kháng thể đặc hiệu anti – dsDNA IgG-IgM (nếu có) trong huyết thanh người bệnh khi ủ tạo nên phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể đặc hiệu. Sau khi rửa bỏ huyết thanh thừa, cho chất cộng hợp (còn gọi là conjugate) có bản chất là hỗn hợp anti IgG và anti IgM người gắn enzym peroxidase. Khi đó cộng hợp sẽ gắn đặc hiệu vào phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể (nếu có). Sau khi rửa bỏ lượng cộng hợp dư thừa không gắn với phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể, cho tiếp vào giếng phản ứng một lượng xác định cơ chất TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enzym peroxidase trong giếng phản ứng (nếu có) sẽ xúc tác tạo phản ứng giữa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và TMB tạo màu xanh lá cây. Phản ứng được ngừng lại bằng dung dịch a-xít H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> loãng, lúc này màu xanh của dung dịch chuyển thành màu vàng chanh, đậm độ màu tương quan thuận với nồng độ kháng thể IgG và IgM có trong huyết thanh. Xác định mức độ màu bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 450 nm hoặc bước sóng kép 450 nm/620 nm.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp nghi đến bệnh tự miễn.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên và cử nhân đã được đào tạo thực hiện kỹ thuật;
- Bác sĩ xét nghiệm: đọc kết quả, đánh giá, kiểm tra chất lượng.

### **2. Phương tiện – Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Máy ly tâm ống máu;
- Pipet và đầu pipet loại 25 $\mu$ l và 1000 $\mu$ l;
- Dàn máy ELISA (tự động hoặc bán tự động);
- Găng tay.

#### **2.2. Hóa chất**

Kít định lượng dsDNA IgG/IgM gồm các thành phần sau:

- Dung dịch pha loãng mẫu;
- Dung dịch rửa;
- Chứng âm (negative control);
- Chứng dương (positive control);
- Chứng ngưỡng (cut-off calibrator);
- Các nồng độ kháng thể chuẩn (calibrator): thường có 6 nồng độ chuẩn, giá trị cụ thể của các ống nồng độ chuẩn tùy thuộc vào hãng sản xuất;
- Dung dịch cộng hợp (conjugates): 1 lọ cộng hợp IgG và IgM dùng để phát hiện kháng thể lớp IgG và IgM;
- Cơ chất tạo màu (TMB substrate);
- Dung dịch dừng phản ứng (stop solution);
- Các giếng phản ứng trên phiến nhựa ELISA;
- Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypochlorite.

### **3. Mẫu bệnh phẩm**

- Mẫu dùng là huyết thanh.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng.
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.
- Mẫu huyết thanh bảo quản ở nhiệt độ 2°C đến 8°C có thể dùng làm xét nghiệm trong vòng 7 ngày. Nếu muốn để lâu hơn mới xét nghiệm cần phải bảo quản ở tủ lạnh sâu ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ). Tuy nhiên với mẫu bảo quản lạnh sâu cần tránh đông-tan nhiều lần.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

1. Pha loãng mẫu 100 lần bằng dung dịch pha loãng mẫu.
2. Nhỏ 100 $\mu\text{l}$  các nồng độ chuẩn (calibrator), mẫu chứng âm, chứng dương, và các mẫu thử vào các giếng trên phiến theo sơ đồ định sẵn.
3. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.
4. Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa, 300 $\mu\text{l}$  /giếng/lần.
5. Nhỏ 100 $\mu\text{l}$  cộng hợp (conjugate) vào các giếng.
6. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.
7. Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa, 300 $\mu\text{l}$  /giếng/lần.
8. Nhỏ 100 $\mu\text{l}$  cơ chất tạo màu (TMB substrate) vào mỗi giếng.



9. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

10. Nhỏ 100 $\mu$ l dung dịch dùng phản ứng (stop solution) vào mỗi giếng theo đúng trình tự nhỏ TMB.

11. Ủ tối thiểu 5 phút. Gõ nhẹ vào thành giếng trong 5 giây để trộn đều.

12. Đọc phiên ở bước sóng 450/620 nm (tốt hơn thì dùng bước sóng kép 450/ 620 nm) trong vòng 30 phút sau khi ủ dung dịch ngừng phản ứng.

13. Phân tích kết quả.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Căn cứ vào nồng độ chuẩn ghi trên các ống calibrator và mật độ quang đo được (chỉ số OD), nhập số liệu vào chương trình Excel để tính nồng độ kháng thể kháng dsDNA (IgG và IgM) trong các mẫu thử.

- Giá trị biện luận: Tốt nhất phải căn cứ vào các hướng dẫn biện luận và đơn vị tính đã được chuẩn hóa chất lượng của nhà sản xuất kit. Một trong những kit dsDNA tốt và phổ biến trên thị trường có thông số biện luận như sau:

+ Ngưỡng bình thường : < 12 U/ml;

+ Ngưỡng nghi ngờ : từ 12 – 18 U/ml;

+ Ngưỡng dương tính : > 18 U/ml.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất, máu bị đông.

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại thông tin trên giấy chỉ định và trên ống nghiệm, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Sai sót do nhỏ mẫu vào phiên phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Xử trí: Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu.

- Chứng dương âm tính hoặc chứng âm dương tính: Nếu xảy ra hiện tượng này đều không dùng được kết quả của lần xét nghiệm này. Nguyên nhân có thể do hóa chất không đảm bảo chất lượng, do không thực hiện đủ và đúng các bước trong quy trình xét nghiệm, nhiệt độ phản ứng không phù hợp, thực hiện bước rửa kém hiệu quả.

Xử trí: làm lại xét nghiệm, kiểm tra chỉ dùng hóa chất còn hạn sử dụng và được bảo quản đúng điều kiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25-30°C).

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Aesku Diagnostics GmbH. 2007. *AESKULISA dsDNA instruction manual.*

# **ĐỊNH TÍNH KHÁNG THỂ KHÁNG dsDNA BẰNG KỸ THUẬT NGỪNG KẾT LATEX**

*(Anti-dsDNA test by Latex)*

## **I. NGUYÊN LÝ**

Khi ủ với huyết thanh bệnh nhân, kháng nguyên dsDNA được phủ sẵn trên các hạt nhựa latex sẽ kết hợp với kháng thể đặc hiệu anti dsDNA IgG và IgM người (nếu có) trong huyết thanh tạo nên phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể gây phản ứng ngưng kết hạt latex sau khi ủ. Kết quả có thể nhận định bằng mắt thường.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp nghi đến bệnh tự miễn.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên và cử nhân đã được đào tạo thực hiện kỹ thuật;
- Bác sĩ xét nghiệm: giám sát, đánh giá, kiểm tra chất lượng.

### **2. Phương tiện - Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Máy ly tâm ống máu;
- Găng tay.

#### **2.2 Hóa chất**

Kít định tính dsDNA gồm các thành phần sau:

- Phiến kính đen chuyên dụng cho phản ứng ngưng kết hạt latex;
- Lọ nhỏ giọt chứng âm (negative control);
- Lọ nhỏ giọt chứng dương (positive control);
- Lọ nhỏ giọt nhũ dịch latex;
- Ống hút huyết thanh;
- Hoá chất khử trùng Natri hypochlorite.

### **3. Mẫu bệnh phẩm**

- Mẫu dùng là huyết thanh.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng.

- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

- Mẫu huyết thanh bảo quản ở nhiệt độ 2°C đến 8°C có thể dùng làm xét nghiệm trong vòng 7 ngày. Nếu muốn để lâu hơn mới xét nghiệm cần phải bảo quản ở tủ lạnh sâu ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ). Tuy nhiên với mẫu bảo quản lạnh sâu cần tránh đông-tan nhiều lần.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Nhỏ 1 giọt nhũ dịch latex vào các ô phản ứng trên phiến chuyên dụng.

- Dùng ống hút mẫu hút và nhỏ 1 giọt huyết thanh hoặc nhỏ 1 giọt chứng âm hoặc 1 giọt chứng dương vào các ô phản ứng tương ứng đã nhỏ trước 1 giọt nhũ dịch Latex.

- Dùng đầu dẹt của ống hút khuấy trộn đều nhũ dịch với phần huyết thanh vừa nhỏ, lắc nhẹ nhàng phiến và đọc kết quả sau 2 phút. Thực hiện xét nghiệm ở nhiệt độ phòng.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Bình thường kết quả âm tính. Mẫu âm tính nếu: trong vùng phản ứng trên phiến kính đen thấy huyền dịch mịn màu trắng đục đồng nhất.

- Mẫu dương tính nếu: trong vùng phản ứng trên phiến kính đen thấy huyền dịch có hiện tượng ngưng kết thành đám lớn màu trắng đục hoặc thành các hạt nhỏ lấm tấm màu trắng đục. Mẫu dương tính chứng tỏ trong huyết thanh bệnh nhân có kháng thể tự miễn kháng dsDNA.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất, máu bị đông.

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại thông tin trên giấy chỉ định và trên ống nghiệm, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Sai sót do nhỏ mẫu vào phiến phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Xử trí: Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu.

- Gặp phản ứng âm tính giả (chứng dương không ngưng kết) hoặc dương tính giả (chứng âm ngưng kết).

Xử trí: làm lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước của quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng thí nghiệm ( $25-30^{\circ}\text{C}$ ). Nếu hiện tượng âm tính giả hoặc

dương tính giả vẫn tiếp diễn phải chuyển sang dùng hộp hóa chất mới, còn hạn và bảo quản đúng cách.

- Nhận định kết quả không chính xác.

Xử trí: Luôn làm chứng âm và chứng dương trong mỗi lần xét nghiệm.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

OMEGA Diagnostic (Mỹ). 2000. *Avitex SLE Ref OD093/ OD043 Introduction and Intended Use.*

# **ĐỊNH TÍNH KHÁNG THỂ KHÁNG NHÂN BẰNG KỸ THUẬT MIỄN DỊCH GẮN MEN (ELISA)**

*(Anti Nuclear Antibody -ANA qualitative test by ELISA)*

## **I. NGUYÊN LÝ**

Kháng nguyên nhân (nuclear antigen) được gắn sẵn trong các giếng nhựa sẽ kết hợp với kháng thể đặc hiệu kháng nhân (anti nuclear antibodies) lớp IgG và IgM (nếu có) trong huyết thanh người bệnh khi ủ tạo nên phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể. Sau khi rửa bỏ huyết thanh thừa, cho chất cộng hợp (còn gọi là conjugate) có bản chất là hỗn hợp anti IgG và anti IgM người gắn enzym peroxidase. Khi đó cộng hợp sẽ gắn đặc hiệu vào phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể (nếu có). Sau khi rửa bỏ lượng cộng hợp dư thừa không gắn với phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể, cho tiếp vào giếng phản ứng một lượng xác định cơ chất TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Enzym peroxidase trong giếng phản ứng (nếu có) sẽ xúc tác tạo phản ứng giữa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> và TMB tạo màu xanh lá cây. Phản ứng được ngừng lại bằng dung dịch a-xít H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> loãng, lúc này màu xanh của dung dịch chuyển thành màu vàng chanh, đậm độ màu tương quan thuận với nồng độ kháng thể IgG và IgM có trong huyết thanh. Xác định mức độ màu bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 450 nm hoặc bước sóng kép 450 nm/620 nm.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp nghi đến bệnh tự miễn.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên và cử nhân đã được đào tạo thực hiện kỹ thuật;
- Bác sĩ xét nghiệm: đọc kết quả, đánh giá, kiểm tra chất lượng.

### **2. Phương tiện – Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Máy ly tâm ống máu;
- Pipet và đầu pipet loại 25µl và 1000µl;
- Bàn máy ELISA (tự động hoặc bán tự động);
- Găng tay.

#### **2.2. Hóa chất**

Kít định lượng ANA IgG/IgM gồm các thành phần sau:

- Dung dịch pha loãng mẫu;
- Dung dịch rửa;
- Chứng âm (negative control);
- Chứng dương (positive control);
- Chứng ngưỡng (cut-off calibrator);
- Dung dịch cộng hợp (conjugates) IgG và IgM;
- Cơ chất tạo màu (TMB substrate);
- Dung dịch dừng phản ứng (stop solution);
- Các giếng phản ứng trên phiến nhựa ELISA.
- Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypochlorite.

### **3. Mẫu bệnh phẩm**

- Mẫu dùng là huyết thanh.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng.

- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.

- Mẫu huyết thanh bảo quản ở nhiệt độ 2°C đến 8°C có thể dùng làm xét nghiệm trong vòng 7 ngày. Nếu muốn để lâu hơn mới xét nghiệm cần phải bảo quản ở tủ lạnh sâu ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ) Tuy nhiên với mẫu bảo quản lạnh sâu cần tránh đông-tan nhiều lần.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

1. Pha loãng mẫu 100 lần bằng dung dịch pha loãng mẫu.
2. Nhỏ 100 $\mu\text{l}$  các mẫu chứng âm, chứng dương và mẫu thử vào các giếng tương ứng trên phiến theo sơ đồ định sẵn.
3. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.
4. Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa, 300 $\mu\text{l}$  /giếng/lần.
5. Nhỏ 100 $\mu\text{l}$  cộng hợp (conjugate) IgG và IgM vào các giếng tương ứng.
6. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.
7. Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa, 300 $\mu\text{l}$  /giếng/lần.
8. Nhỏ 100 $\mu\text{l}$  cơ chất tạo màu (TMB substrate) vào mỗi giếng.
9. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.
10. Nhỏ 100 $\mu\text{l}$  dung dịch dừng phản ứng (stop solution) vào mỗi giếng theo đúng trình tự nhỏ TMB.

11. Ủ tối thiểu 5 phút. Gõ nhẹ vào thành giếng trong 5 giây để trộn đều.
12. Đọc phiên ở bước sóng 450/620 nm (tốt hơn thì dùng bước sóng kép 450/ 620 nm) trong vòng 30 phút sau khi ủ dung dịch ngừng phản ứng.
13. Phân tích kết quả.

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Căn cứ vào mật độ quang đo được ở các giếng cut-of calibrator, chứng âm, chứng dương, và các mẫu thử để nhận định kết quả xét nghiệm như sau

+ Âm tính:  $OD_{\text{mẫu}} < OD_{\text{cut-off}} - 10\%$

+ Dương tính:  $OD_{\text{mẫu}} > OD_{\text{cut-off}} + 10\%$

+ Vùng xám:  $OD_{\text{cut-off}} - 10\% < OD_{\text{mẫu}} < OD_{\text{cut-off}} + 10\%$

- Giá trị biện luận: Bình thường mẫu âm tính. Nếu mẫu dương tính chứng tỏ trong huyết thanh bệnh nhân có kháng thể tự miễn kháng nhân tế bào (ANA). Nếu mẫu trong khoảng nghi ngờ (vùng xám), cần xét nghiệm lại sau 1-3 tháng.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất, máu bị đông.

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại thông tin trên giấy chỉ định và trên ống máu, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Sai sót do nhỏ mẫu vào phiên phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Xử trí: Vệ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu.

- Chứng dương âm tính hoặc chứng âm dương tính. Nếu xảy ra đều không dùng kết quả này được. Nguyên nhân có thể do hóa chất không đảm bảo chất lượng, do không thực hiện đủ và đúng các bước trong quy trình xét nghiệm, nhiệt độ phản ứng không phù hợp, thực hiện bước rửa kém hiệu quả.

Xử trí: làm lại xét nghiệm, kiểm tra chỉ dùng hóa chất còn hạn sử dụng và được bảo quản đúng điều kiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25-30° C).

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aesku Diagnostics GmbH. 2007. *AESKULISA ANA-8S instruction manual REF 3100*.



**ĐỊNH LƯỢNG ANTI -  $\beta_2$  GLYCOPROTEIN**  
**BẰNG KỸ THUẬT MIỄN DỊCH GẮN MẸN (ELISA)**  
*(Anti –  $\beta_2$  Glycoprotein quantitative test by ELISA)*

## **I. NGUYÊN LÝ**

$\beta_2$  GLYCOPROTEIN là một loại protein tích điện âm. Kháng thể kháng  $\beta_2$  GLYCOPROTEIN được cho là có ý nghĩa trong chẩn đoán hội chứng Kháng phospholipid.

Kháng nguyên  $\beta_2$  GLYCOPROTEIN được gắn sẵn trong các giếng nhựa sẽ kết hợp với kháng thể đặc hiệu anti –  $\beta_2$  GLYCOPROTEIN IgG hoặc IgM (nếu có) trong huyết thanh người bệnh khi ủ tạo nên phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể. Sau khi rửa bỏ huyết thanh thừa, cho chất cộng hợp (còn gọi là conjugate) có bản chất là hỗn hợp anti IgG hoặc anti IgM người gắn enzym peroxidase. Khi đó cộng hợp sẽ gắn đặc hiệu vào phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể. Sau khi rửa bỏ lượng cộng hợp dư thừa không gắn với phức hợp Kháng nguyên-Kháng thể, cho tiếp vào giếng phản ứng một lượng xác định cơ chất TMB/ $H_2O_2$ . Enzym peroxidase trong giếng phản ứng sẽ xúc tác tạo phản ứng giữa  $H_2O_2$  và TMB tạo màu xanh lá cây. Phản ứng được ngừng lại bằng dung dịch a-xít  $H_2SO_4$  loãng, lúc này màu xanh của dung dịch chuyển thành màu vàng chanh, đậm độ màu tương quan thuận với nồng độ kháng thể IgG và IgM có trong huyết thanh. Xác định mức độ màu bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 450 nm hoặc bước sóng kép 450 nm/620 nm.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp nghi đến hội chứng anti-phospholipid

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên và cử nhân đã được đào tạo thực hiện kỹ thuật.
- Bác sĩ xét nghiệm: đọc kết quả, đánh giá, kiểm tra chất lượng.

### **2. Phương tiện – Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Máy ly tâm ống máu.
- Pipet và đầu pipet loại 25 $\mu$ l và 1000 $\mu$ l.

- Dàn máy ELISA (tự động hoặc bán tự động);
- Găng tay.

## **2.2. Hóa chất**

Kít định lượng  $\beta_2$  GLYCOPROTEIN IgG/IgM gồm các thành phần sau:

- Dung dịch pha loãng mẫu;
- Dung dịch rửa;
- Chứng âm (negative control);
- Chứng dương (positive control);
- Chứng ngưỡng (cut-off calibrator);
- Các nồng độ kháng thể chuẩn (calibrator): thường có 6 nồng độ chuẩn, giá trị cụ thể của các ống nồng độ chuẩn tùy thuộc vào hãng sản xuất;
- Dung dịch cộng hợp (conjugate): 1 lọ cộng hợp IgG và 1 lọ cộng hợp IgM riêng biệt dùng để phát hiện IgG hoặc IgM tương ứng;
- Cơ chất tạo màu (TMB substrate);
- Dung dịch dừng phản ứng (stop solution);
- Các giếng phản ứng trên phiến nhựa ELISA.
- Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypochlorite.

## **3. Mẫu bệnh phẩm**

- Mẫu dùng là huyết thanh.
- Cần tách huyết thanh càng sớm càng tốt để tránh hiện tượng tan máu làm ảnh hưởng đến kết quả phản ứng.
- Nếu có lẫn hồng cầu hoặc những thành phần hữu hình trong mẫu huyết thanh thì cần ly tâm mẫu để loại bỏ các thành phần đó trước khi xét nghiệm.
- Mẫu huyết thanh bảo quản ở nhiệt độ 2°C đến 8°C có thể dùng làm xét nghiệm trong vòng 7 ngày. Nếu muốn để lâu hơn mới xét nghiệm cần phải bảo quản ở tủ lạnh sâu ( $\leq -20^\circ\text{C}$ ). Tuy nhiên với mẫu bảo quản lạnh sâu cần tránh đông-tan nhiều lần.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

1. Pha loãng mẫu 100 lần bằng dung dịch pha loãng mẫu.
2. Nhỏ 100 $\mu\text{l}$  các nồng độ chuẩn (calibrator), mẫu chứng âm, chứng dương, các mẫu thử vào các giếng trên phiến theo sơ đồ định sẵn, mỗi loại 2 giếng (1 sẽ dùng cho IgG, 1 dùng cho IgM).
3. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.
4. Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa, 300 $\mu\text{l}$  /giếng/lần.

5. Nhỏ 100 $\mu$ l cộng hợp (conjugate) IgG hoặc IgM vào các giếng tương ứng.
6. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.
7. Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa, 300 $\mu$ l /giếng/lần.
8. Nhỏ 100 $\mu$ l cơ chất tạo màu (TMB substrate) vào mỗi giếng.
9. Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.
10. Nhỏ 100 $\mu$ l dung dịch dừng phản ứng (stop solution) vào mỗi giếng theo đúng trình tự nhỏ TMB.
11. Ủ tối thiểu 5 phút. Gõ nhẹ vào thành giếng trong 5 giây để trộn đều.
12. Đọc phiên ở bước sóng 450/620 nm (tốt hơn thì dùng bước sóng kép 450/ 620 nm) trong vòng 30 phút sau khi ủ dung dịch ngừng phản ứng.
13. Phân tích kết quả.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Căn cứ vào nồng độ chuẩn ghi trên các ống calibrator và mật độ quang đo được (chỉ số OD), nhập số liệu vào chương trình Exel để tính nồng độ kháng thể kháng  $\beta$ 2-glycoprotein (IgG hoặc IgM) trong các mẫu thử.

- Giá trị biện luận: Tốt nhất phải căn cứ vào các hướng dẫn biện luận và đơn vị tính đã được chuẩn hóa chất lượng của nhà sản xuất kit. Một trong những kit  $\beta$ 2-glycoprotein tốt và phổ biến trên thị trường có thông số biện luận như sau:

- + Ngưỡng bình thường : < 12 U/ml
- + Ngưỡng nghi ngờ : Từ 12 – 18 U/ml
- + Ngưỡng dương tính : > 18 U/ml

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy chỉ định xét nghiệm và trên ống máu không thống nhất, máu bị đông.

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại thông tin trên giấy chỉ định và trên ống máu, nếu cần phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Sai sót do nhỏ mẫu vào phiên phản ứng không thống nhất thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Xử trí: Vẽ sơ đồ nhỏ mẫu trước khi làm xét nghiệm. Kiểm tra đối chiếu thông tin vị trí nhỏ mẫu trước khi nhỏ mẫu.

- Chứng dương âm tính hoặc chứng âm dương tính: Nếu xảy ra hiện tượng này đều không dùng được kết quả lần xét nghiệm đó. Nguyên nhân có thể

do hóa chất không đảm bảo chất lượng, do không thực hiện đủ và đúng các bước trong quy trình xét nghiệm, nhiệt độ phản ứng không phù hợp, thực hiện bước rửa kém hiệu quả.

Xử trí: thực hiện lại xét nghiệm, kiểm tra chỉ dùng hóa chất còn hạn sử dụng và được bảo quản đúng điều kiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, tuân thủ đúng các bước quy trình, kiểm soát tốt nhiệt độ phòng xét nghiệm (25-30°C).

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Aesku Diagnostics GmbH. 2007. *AESKULISA Beta2- Glycoprotein GM instruction manual*.

# **ĐẾM TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU CD34<sup>+</sup> BẰNG MÁY PHÂN TÍCH TẾ BÀO DÒNG CHẢY (FLOW CYTOMETER)**

*(Hematopoietic stem cell CD34<sup>+</sup> enumeration test by flow cytometry)*

## **I. NGUYÊN LÝ**

Tế bào gốc tạo máu có kháng nguyên CD34 trên bề mặt. Nếu ủ kháng thể anti CD34 với mẫu bệnh phẩm có tế bào gốc tạo máu, kháng thể này sẽ gắn đặc hiệu lên bề mặt các tế bào gốc tạo máu mang CD34. Dùng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang phân tích trên máy phân tích tế bào dòng chảy (flow cytometer) có thể đếm chính xác số lượng và tỷ lệ % tế bào gốc tạo máu CD34 trong mẫu bệnh phẩm.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp cần đếm số lượng tế bào gốc tạo máu CD34<sup>+</sup>.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên và cử nhân đã được đào tạo thực hiện kỹ thuật;
- Bác sĩ xét nghiệm: đọc kết quả, đánh giá, kiểm tra chất lượng.

### **2. Phương tiện - Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Máy phân tích tế bào dòng chảy (có thể phân tích các kênh màu huỳnh quang 7ADD, FITC và PE).
- Máy ly tâm ống máu.
- Pipet và đầu pipet loại 25 $\mu$ l và 1000 $\mu$ l.
- Găng tay.

#### **2.2. Hóa chất**

- Bộ kit đếm CD34 gồm có các hóa chất sau: 7AAD, CD45-FITC/CD34-PE, CD45-FITC/Isotype Control-PE, hạt tham chiếu (có nồng độ xác định), dung dịch ly giải hồng cầu.

- Các dung dịch chạy máy và dung dịch rửa máy để vận hành máy phân tích tế bào dòng chảy;

- Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypochlorite.

### **3. Bệnh phẩm**

Bệnh phẩm có thể là mẫu máu ngoại vi, mẫu máu cuống rốn, mẫu lấy từ khối tế bào gốc máu ngoại vi tươi hoặc khối tế bào gốc máu ngoại vi đông lạnh sau rã đông, hoặc mẫu dịch hút tủy xương.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

- Lấy tối thiểu 0,5 ml mẫu bệnh phẩm. Nếu mẫu bệnh phẩm là máu ngoại vi thì chống đông bằng EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid). Mẫu bệnh phẩm đảm bảo chất lượng là mẫu bệnh phẩm không đông vón và không lâu quá 1 giờ sau khi lấy khỏi tĩnh mạch hoặc sau khi rã đông.

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

- Đếm số lượng bạch cầu có trong mẫu thử, pha loãng mẫu thử về nồng độ  $10 \times 10^9$  tế bào/lít, ghi lại hệ số pha loãng (số lần pha loãng).

- Lấy 100  $\mu$ l mẫu thử đã pha loãng cho vào các ống 1, 2 và 3.

- Thêm 20  $\mu$ l 7AAD vào cả 3 ống 1, 2, 3.

- Thêm 20  $\mu$ l CD45-FITC/CD34-PE vào ống 1 và ống 2.

- Thêm 20  $\mu$ l Control (CD45-FITC/Isotype PE) vào ống số 3.

- Vortex đều các ống và ủ nhiệt độ phòng trong 20 phút, tránh ánh sáng.

- Thêm 2000  $\mu$ l dung dịch ly giải hồng cầu, ủ nhiệt độ phòng 10 phút.

- Ngay lập tức thêm 100  $\mu$ l huyền dịch hạt tham chiếu vào các ống 1, 2, 3.

- Trộn lắc đều các ống.

- Phân tích flow cytometry bằng chương trình đếm CD34 có sẵn trên máy flow cytometry.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

### **1. Đọc kết quả**

Kết quả do chương trình máy tính tự động xuất ra dưới dạng chỉ số CD34%, số đếm CD34 tuyệt đối (tế bào/  $\mu$ l).

### **2. Nhận định kết quả**

Nếu kết quả thu được giữa ống 1 và ống 2 khác nhau dưới hoặc bằng 10% thì kết quả chấp nhận tốt. Nếu khác biệt trên 10% cần phải làm lại xét nghiệm, phải chú ý thực hiện thật tốt kỹ thuật hút mẫu và hút hóa chất bằng pipet.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy xét nghiệm và trên ống mẫu không thống nhất, mẫu bị đông, mẫu không ghi giờ lấy.

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại các thông tin cần thiết, nếu mẫu bị đông hoặc đã để quá lâu thì phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Đặt nhằm vị trí giữa mẫu chứng âm (Isotype Control) với các mẫu thử.

Xử trí: kiểm tra đối chiếu vị trí đặt ống đúng thứ tự trước khi phân tích

- Máy chỉ cho ra kết quả CD34%, không tính ra được kết quả tế bào CD34/  $\mu$ l. Thường do quên không nhập trị số nồng độ hạt tham chiếu vào phần mềm.

Xử trí: Chạy máy phân tích lại (không cần ủ lại mẫu), kiểm tra xác định đã nhập trị số nồng độ hạt tham chiếu trước khi phân tích trên máy.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Beckman Coulter. 2011. *Haematopoietic Stem Cell CD34+ Enumeration Kit Instruction Manual*.

# **ĐỘ CHÉO TRONG GHÉP BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH TẾ BÀO DÒNG CHẢY (FLOW CYTOMETRY)**

*(Flow cytometry Lympho Cross-match test)*

## **I. NGUYÊN LÝ**

Bệnh nhân có thể đã miễn cảm với các kháng nguyên hệ HLA đồng loài từ trước hoặc bị miễn cảm với kháng nguyên hệ HLA trong quá trình điều trị trước ghép đồng loài (ghép tạng hoặc ghép tế bào gốc tạo máu). Khi đó trong máu bệnh nhân có thể sẽ hình thành các kháng thể miễn dịch đặc hiệu chống lại HLA đã miễn cảm. Nếu trong máu bệnh nhân ghép có kháng thể đặc hiệu chống lại HLA người cho thì kết quả sau ghép rất xấu, thường bị thải ghép tối cấp. Để tránh tình trạng thải ghép tối cấp, trước khi ghép cần làm xét nghiệm độ chéo nhằm phát hiện trong máu bệnh nhân dự kiến ghép có kháng thể đặc hiệu kháng lại HLA người cho hay không. Kháng nguyên hệ HLA có 2 lớp, HLA lớp 1 và HLA lớp 2. HLA lớp 1 xuất hiện trên bề mặt tất cả các tế bào có nhân, HLA lớp 2 có mặt chủ yếu trên các tế bào lympho B, tế bào mono, và tế bào tua gai (dendritic cell). Do vậy nếu ủ huyết thanh bệnh nhân (người nhận) với lympho người cho, kháng thể đặc hiệu HLA lớp 1 và/hoặc lớp 2 (nếu có) sẽ gắn lên bề mặt tế bào lympho (lympho T và/hoặc lympho B) người cho. Xét nghiệm độ chéo lympho dùng để phát hiện kháng thể kháng HLA của người nhận ghép trong lựa chọn người cho, trong theo dõi phản ứng sau ghép. Để xét nghiệm độ chéo lympho trước kia người ta hay dùng kỹ thuật vi độc tế bào lympho. Tuy nhiên hiện nay do tính ưu việt về độ nhạy, độ chính xác, và tốc độ phân tích, kỹ thuật phân tích tế bào dòng chảy được dùng nhiều hơn.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Bệnh nhân trước ghép và sau ghép tạng, ghép tủy.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên và cử nhân đã được đào tạo thực hiện kỹ thuật;
- Bác sĩ xét nghiệm: đọc kết quả, đánh giá, kiểm tra chất lượng.

### **2. Phương tiện - Hóa chất**



### **2.1. Phương tiện**

- Máy phân tích tế bào dòng chảy (4 màu huỳnh quang trở lên);
- Máy ly tâm ống máu;
- Pipet và đầu pipet loại 25 $\mu$ l và 1000 $\mu$ l;
- Các ống vi ly tâm (ống Eppendorf) 1,5 ml.
- Găng tay.

### **2.2. Hóa chất**

- Dung dịch đệm PBS;
- Hỗn hợp kháng thể CD45/CD3/CD19/anti Human IgG, mỗi loại kháng thể gắn 1 màu huỳnh quang khác nhau;
- Dung dịch ly giải hồng cầu;
- Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypochlorite.

### **3. Bệnh phẩm**

Bệnh phẩm cần lấy là mẫu máu ngoại vi của bệnh nhân và của người cho.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

- Lấy 2 ml máu chống đông bằng EDTA của người cho.
- Lấy 2 ml máu đông của bệnh nhân và 2 ml máu đông của người cho.

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

- Chuẩn bị tế bào người cho:
  - + Lấy 100  $\mu$ l máu toàn phần người cho vào mỗi ống vi ly tâm 1,5 ml (cần làm 2 ống).
  - + Thêm 1000  $\mu$ l dung dịch ly giải hồng cầu, ủ nhiệt độ phòng 10 phút.
  - + Ly tâm 3000 vòng/phút x 3 phút, đổ bỏ dịch nổi, giữ cặn tế bào.
  - + Thêm 1 ml dung dịch PBS, tái huyền dịch cặn tế bào, ly tâm rửa 3000 vòng/phút x 3 phút, đổ bỏ dịch nổi
- Chuẩn bị huyết thanh bệnh nhân và huyết thanh người cho: ly tâm ống máu đông, tách huyết thanh.
- Ủ huyết thanh bệnh nhân hoặc huyết thanh người cho với tế bào người cho.
  - + Nhỏ 100  $\mu$ l huyết thanh bệnh nhân hoặc huyết thanh người cho vào các ống Eppendorf chứa tế bào người cho. Trộn đều và ủ 37°C trong 1 giờ. Ống ủ huyết thanh bệnh nhân với tế bào người cho là ống thử phát hiện kháng thể kháng HLA, ống ủ huyết thanh người cho với tế bào người cho là ống tự chứng.

+ Thêm 1 ml PBS, trộn đều trong 15 giây. Ly tâm 3000 vòng/phút x 3 phút. Hút bỏ dịch nổi. Lặp lại quy trình trên 2 lần

- Ủ kháng thể: Nhỏ 20 µl hỗn hợp kháng thể anti CD45/anti CD3/anti CD19/anti human IgG, ủ 20 phút nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

- Phân tích: Phân tích flow cytometry bằng chương trình Cross match đã lập sẵn trên máy flow cytometry.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

### **1. Đọc kết quả**

Đọc kết quả ở các vùng lympho T và lympho B. Kết quả âm tính khi quần thể tế bào cần phân tích nằm trong vùng âm tính. Kết quả dương tính khi quần thể tế bào phân tích nằm trong vùng dương tính, có thể biểu hiện kết quả bằng tỷ lệ % quần thể phân tích nằm trong vùng dương tính.

### **2. Nhận định kết quả**

Bình thường: độ chéo lympho B và lympho T đều âm tính.

Có kháng thể thường trực kháng lympho người cho: độ chéo lympho B dương tính và/hoặc độ chéo lympho T dương tính.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy xét nghiệm và trên ống mẫu không thống nhất, mẫu bị đông, mẫu không ghi giờ lấy.

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại các thông tin cần thiết, nếu mẫu bị đông hoặc đã để quá lâu thì phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Các vùng tế bào lympho không nằm trong cửa sổ chương trình chạy. Nguyên nhân có thể do thực hiện không đúng, lượng kháng thể ủ không đủ, thực hiện không đủ các bước của quy trình, ủ không đủ thời gian, hút pipet không tốt, tắc kim hút trên máy...

Xử trí: Làm lại xét nghiệm và tuân thủ theo đúng quy trình. Kiểm tra máy trước khi phân tích, phải rửa máy, đuổi bọt khí và thông kim hút (nếu cần) theo hướng dẫn đi theo máy.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Harmer A.W., Garner S., Bell A.E. et al. 1996. Evaluation of the flow cytometric crossmatch. Preliminary results of a multicentre study. Transplantation 61, 1108-11.
2. Beckman Coulter. 2011. IOTest CD45 Used manual

3. Beckman Coulter. 2011. IOTest CD3 Used manual
4. Beckman Coulter. 2011. IOTest CD19 Used manual
5. Beckman Coulter. 2011. IOTest Human IgG Used manual

# **ĐẾM TẾ BÀO LYMPHO T-CD3, T-CD4, T-CD8 BẰNG KỸ THUẬT PHÂN TÍCH TẾ BÀO DÒNG CHẢY**

*(Lympho T-CD3, -CD4, -CD8 enumeration by flow cytometry)*

## **I. NGUYÊN LÝ**

CD3 là kháng nguyên lympho T chung. CD3 có trên bề mặt tất cả các tế bào lympho T. Kháng nguyên CD4 có trên bề mặt tế bào lympho T hỗ trợ, tế bào mono, và một số bạch cầu hạt hoạt hóa. Kháng nguyên CD8 có trên bề mặt các tế bào lympho T gây độc và lympho T ức chế. Do vậy, sử dụng kỹ thuật phân tích tế bào dòng chảy dùng các kháng thể đơn dòng kháng CD3, CD4, CD8 có gắn màu huỳnh quang khác nhau có thể đồng thời phát hiện và xác định chính xác các dấu ấn trên bề mặt các tế bào lympho cũng như có thể đếm được tỷ lệ phần trăm và số lượng tuyệt đối các tế bào lympho T-CD3, T-CD4, và T-CD8 trong mẫu bệnh phẩm.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp cần đánh giá tình trạng miễn dịch tế bào, cần đếm CD3, 4, 8.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên và cử nhân đã được đào tạo thực hiện kỹ thuật;
- Bác sĩ xét nghiệm: đọc kết quả, đánh giá, kiểm tra chất lượng.

### **2. Phương tiện - Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Máy phân tích tế bào dòng chảy (4 màu huỳnh quang trở lên);
- Máy ly tâm ống máu;
- Pipet và đầu pipet loại 25 $\mu$ l và 1000 $\mu$ l;
- Ống nghiệm chuyên dụng cho phân tích trên máy đếm tế bào dòng chảy;
- Găng tay.

#### **2.2. Hóa chất**

- Dung dịch đệm PBS;
- Kháng thể đơn dòng kháng CD45-PC5, CD3-ECD, CD4-PE, CD8-FITC;
- Hạt Flow count;

- Dung dịch ly giải hồng cầu.
- Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypochlorite,

### 3. Bệnh phẩm

Là mẫu máu ngoại vi của người bệnh.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Lấy bệnh phẩm

- Lấy 2 ml máu ngoại vi chống đông bằng EDTA.

### 2. Tiến hành kỹ thuật

- Lấy 100 µl máu ngoại vi chống đông cho vào 1 ống phân tích tế bào dòng chảy đã ghi tên người bệnh.

- Thêm 20 µl mỗi loại kháng thể CD45-PC5, CD3-ECD, CD4-PE, CD8-FITC.

- Trộn đều, ủ nhiệt độ phòng trong 20 phút, tránh ánh sáng.

- Thêm 2000 µl dung dịch ly giải hồng cầu, ủ nhiệt độ phòng trong 10 phút.

- Ngay sau khi kết thúc bước ủ trên, thêm 100 µl huyền dịch hạt tham chiếu, trộn đều và đem phân tích trên máy phân tích tế bào dòng chảy.

- Phân tích bằng chương trình đếm T-CD3\_T-CD4\_T-CD8 có sẵn trên máy phân tích tế bào dòng chảy (lưu ý nhập liệu số lượng bạch cầu có trong mẫu và nồng độ hạt tham chiếu).

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

### 1. Đọc kết quả

Kết quả do chương trình máy tính tự động xuất ra dưới dạng số lượng tuyệt đối T-CD3, T-CD4, T-CD8 và tỷ lệ % T-CD3, T-CD4, T-CD8.

### 2. Nhận định kết quả

- Lưu ý số lượng tuyệt đối và tỷ lệ T-CD4 được lấy từ quần thể tế bào lympho có CD3+CD4+, số lượng tuyệt đối và tỷ lệ T-CD8 được lấy từ quần thể tế bào lympho có CD3+CD8+.

- |                |        |                    |          |
|----------------|--------|--------------------|----------|
| - Bình thường: | T-CD3: | 800-2300 tế bào/uL | (55-80%) |
|                | T-CD4: | 400-1300 tế bào/uL | (35-55%) |
|                | T-CD8: | 250-800 tế bào/uL  | (20-35%) |

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy xét nghiệm và trên ống mẫu không thống nhất, mẫu bị đông, mẫu không ghi giờ lấy.

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại các thông tin cần thiết, nếu mẫu bị đông hoặc đã để quá lâu thì phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Các vùng tế bào lympho không nằm trong cửa sổ chương trình chạy. Nguyên nhân có thể do thực hiện không đúng, lượng kháng thể ủ không đủ, thực hiện không đủ các bước của quy trình, ủ không đủ thời gian, hút pipet không tốt, tắc kim hút trên máy...

Xử trí: Làm lại xét nghiệm và tuân thủ theo đúng quy trình. Kiểm tra máy trước khi phân tích, phải rửa máy, đuổi bọt khí và thông kim hút (nếu cần) theo hướng dẫn đi theo máy.

- Chỉ ra kết quả tỷ lệ % T-CD3, T-CD4, T-CD8 mà không có số lượng tuyệt đối T-CD3, T-CD4, T-CD8. Thường do quên không nhập thông số về số lượng bạch cầu trong mẫu và nồng độ hạt tham chiếu.

Xử trí: Phân tích lại ống mẫu đã ủ. Lưu ý nhập thông số về số lượng bạch cầu trong mẫu và nồng độ hạt tham chiếu.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Beckman Coulter. 2011. IOTest CD45-PC5 Used manual.
2. Beckman Coulter. 2011. IOTest CD3-ECD Used manual.
3. Beckman Coulter. 2011. IOTest CD4-PE Used manual.
4. Beckman Coulter. 2011. IOTest CD8-FITC Used manual.

## **XÉT NGHIỆM CD55/CD59 BẠCH CẦU**

*(White blood cell CD55/CD59 analysis by flow cytometry)*

### **I. NGUYÊN LÝ**

- Đái huyết sắc tố kích phát ban đêm là một bệnh rối loạn tế bào gốc tạo máu. Đột biến xảy ra ở tế bào gốc tạo máu làm mất gen GPI-A, gen này tổng hợp protein gắn màng glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Do mất hoặc thiếu hụt các GPI nên các protein gắn màng (như CD55, CD59) gắn ít hoặc không gắn được lên màng tế bào hồng cầu do vậy không bảo vệ được tế bào trước sự tấn công của bổ thể, dẫn tới các tế bào hồng cầu dễ bị hoạt hóa bởi bổ thể và gây vỡ hồng cầu.

- Trên phân tích tế bào dòng chảy, tế bào máu ngoại vi ủ với anti CD45 sau ly giải hồng cầu sẽ phân bố thành 3 vùng quần thể rõ rệt: vùng bạch cầu hạt, vùng mono, và vùng lympho.

- Dựa trên các đặc tính này, kỹ thuật flow cytometry sử dụng các kháng thể đặc hiệu gắn huỳnh quang để phát hiện sự có mặt, thiếu hụt, hoặc mất các thụ thể CD55 và/hoặc CD59 trên các quần thể tế bào bạch cầu. Từ đó góp phần chẩn đoán xác định bệnh đái huyết sắc tố kích phát ban đêm.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Suy tủy xương, nghĩ đến bệnh đái huyết sắc tố kích phát ban đêm.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên và cử nhân đã được đào tạo thực hiện kỹ thuật;
- Bác sĩ xét nghiệm: đọc kết quả, đánh giá, kiểm tra chất lượng.

#### **2. Phương tiện, hóa chất.**

##### **2.1. Phương tiện**

- Máy phân tích tế bào dòng chảy (máy flow cytometer);
- Máy ly tâm;
- Máy lắc trộn;
- Pipet man và đầu pipet loại 250 µl và 1000 µl;
- Ống nghiệm flow cytometry (chuyên dụng cho máy phân tích tế bào dòng chảy).
- Găng tay.

## **2.2. Hóa chất**

- Anti CD45-PC5;
- Anti CD55-PE;
- Anti CD59-FITC;
- Dung dịch ly giải hồng cầu;
- Dung dịch sheath chạy máy flow;
- Dung dịch đệm PBS.
- Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypochlorite.

## **3. Bệnh phẩm**

- Là mẫu máu ngoại vi chống đông bằng EDTA. Mẫu được lấy từ các người bệnh nghi ngờ đái huyết sắc tố kịch phát ban đêm và người bệnh có hội chứng rối loạn sinh tủy.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

- 2ml máu ngoại vi chống đông bằng EDTA;
- Mẫu cần được ủ kháng thể ngay trong vòng 6 giờ sau lấy mẫu.

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

#### **2.1. Chuẩn bị mẫu**

- Lấy 100 µl máu cho vào 1 ống nghiệm flow cytometry.  
- Ly giải hồng cầu bằng 1 ml dung dịch ly giải hồng cầu, ủ nhiệt độ phòng trong 10 phút.

- Ly tâm rửa huyền dịch tế bào sau ly giải hồng cầu 2 lần, mỗi lần làm như sau: thêm 3 ml dung dịch PBS vào ống flow cytometry, trộn lắc đều và ly tâm 2000 vòng/phút trong 3 phút. Đổ bỏ dịch nổi, để lại cặn tế bào và lượng dịch còn lại (khoảng 100 µl). Trộn đều cặn và lượng dịch còn lại.

#### **2.2. Ủ kháng thể**

- Cho kháng thể anti CD45-PC5, anti CD55-PE, anti CD59-FITC (mỗi loại 20 µl) vào ống flow cytometry chứa cặn tế bào đã phá hồng cầu ở bước trên. Trộn đều và ủ nhiệt độ phòng 20 phút, tránh ánh sáng.

- Rửa bỏ kháng thể thừa: sau ủ, thêm 3 ml dung dịch PBS vào ống flow cytometry, trộn đều và ly tâm 2000 vòng/phút trong 3 phút. Đổ bỏ dịch nổi, để lại cặn tế bào.

- Thêm 1 ml PBS vào ống cặn tế bào, trộn đều. Lúc này ống đã sẵn sàng cho phân tích.



### **2.3. Phân tích CD55, CD59 bạch cầu trên máy flow cytometry**

- Đưa ống flow cytometry vào vị trí đọc trên máy.
- Mở chương trình phân tích CD55, CD59 bạch cầu đã lập sẵn trên máy.

Nhập vị trí ống phân tích và chạy chương trình phần mềm phân tích.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Chủ yếu quan sát phân tích trên quần thể bạch cầu mono và bạch cầu hạt, vùng bạch cầu lympho không thấy rõ sự biến đổi.

- Nếu mức độ dương tính CD55 và/hoặc CD59 của quần thể bạch cầu hạt và bạch cầu mono nằm trong giới hạn bình thường (dương tính >95%): không có thiếu hụt hoặc mất CD55, CD59 bạch cầu.

- Nếu mức độ dương tính CD55 và/hoặc CD59 của quần thể bạch cầu hạt và bạch cầu mono thấp  $\leq 95\%$  (dương tính  $\leq 95\%$ ): có thiếu hụt và mất CD55 và/hoặc CD59 bạch cầu. Đây là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán bệnh Đái huyết sắc tố kịch phát ban đêm.

Bình thường: Không có thiếu hụt CD55 và/hoặc CD59 ở các quần thể bạch cầu hạt và mono (CD55/CD59 bạch cầu dương tính >95%).

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy xét nghiệm và trên ống mẫu không thống nhất, mẫu bị đông, mẫu không ghi giờ lấy.

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại các thông tin cần thiết, nếu mẫu bị đông hoặc đã để quá lâu thì phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Các tế bào bạch cầu nằm không đúng vùng tế bào trong cửa sổ chương trình chạy. Nguyên nhân có thể do thực hiện không đúng, lượng kháng thể ủ không đủ, thực hiện không đủ các bước của quy trình, ủ không đủ thời gian, hút pipet không tốt, tắc kim hút trên máy...

Xử trí: Làm lại xét nghiệm và tuân thủ theo đúng quy trình. Kiểm tra máy trước khi phân tích, phải rửa máy, đuổi bọt khí và thông kim hút (nếu cần) theo hướng dẫn đi theo máy.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Beckman Coulter. 2011. *IOTest CD45-PC5 Used manual*.
2. Beckman Coulter. 2011. *IOTest CD55-PE Used manual*.
3. Beckman Coulter. 2011. *IOTest CD59-FITC Used manual*.

**ĐIỆN DI HUYẾT SẮC TỐ**  
**TRÊN MÁY ĐIỆN DI MAO QUẢN**  
*(Hemoglobin analysis by capillary electrophoresis)*

## **I. NGUYÊN LÝ**

Trong môi trường pH kiềm, các phân tử huyết sắc tố (hemoglobine) tích điện âm sẽ di chuyển về cực dương dưới tác dụng của dòng điện 1 chiều. Quá trình điện di sẽ làm phân tách chúng thành các thành phần khác nhau dựa trên điện tích của chúng.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp nghi ngờ bệnh lý huyết sắc tố

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên và cử nhân được đào tạo thực hiện kỹ thuật;
- Bác sĩ: đọc kết quả, đánh giá, kiểm tra chất lượng.

### **2. Phương tiện, hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Máy điện di mao quản (ví dụ như máy Capilarys 2 hoặc máy Minicap của Sebia, Pháp);
- Giá đỡ mẫu (đi theo máy);
- Máy ly tâm ống máu;
- Que thủy tinh.
- Găng tay, giấy thấm.

#### **2.2. Hóa chất**

- Dung dịch đệm (đi theo máy);
- Dung dịch rửa (đi theo máy);
- Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypochlorite.

### **3. Bệnh phẩm**

Là mẫu máu ngoại vi chống đông bằng EDTA.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

- Lấy 2ml máu toàn phần vào ống có chứa chất chống đông EDTA, ghi rõ thông tin người bệnh: tên, tuổi, số giường, khoa phòng, đúng với thông tin trên phiếu chỉ định.

- Mẫu máu dùng cho xét nghiệm có thể bảo quản 7 ngày ở nhiệt độ 2-8°C.

## **2. Khởi động máy điện di mao quản**

- Bật máy tính và máy máy điện di mao quản, chọn chương trình điều khiển máy điện di mao quản.

- Chọn chương trình điện di hemoglobin trong phần mềm.

- Đặt khay hóa chất điện di hemoglobin vào vị trí khay hóa chất trên máy điện di.

- Đổ dịch trong bình nước thải; Lắp các bình dung dịch rửa và bình dung dịch đệm vào vị trí khay dịch rửa và khay dung dịch đệm.

- Trong phần mềm điều khiển máy và phân tích mẫu, nhập thông tin bệnh nhân tương ứng với từng mẫu.

## **3. Chạy điện di**

- Đặt ống mẫu bệnh phẩm vào các vị trí trên giá nạp bệnh phẩm tương ứng với các vị trí phân tích đã quy định khi nhập thông tin bệnh nhân vào phần mềm.

- Bấm nút phân tích trong phần mềm để máy tự động phân tích ghi nhận kết quả chạy máy.

- Sau khi máy kết thúc phân tích, dùng phần mềm kiểm tra thông tin và kết quả tương ứng của từng bệnh nhân. Lựa chọn bệnh nhân cần in kết quả, bấm nút in để in kết quả của bệnh nhân đó.

## **4. Rửa máy**

- Thay thế bình dung dịch đệm bằng bình nước cất để rửa máy.

- Bấm nút rửa máy trên phần mềm để máy tự động rửa.

## **5. Tắt máy**

Sau khi kết thúc quy trình rửa máy, tiến hành tắt phần mềm điều khiển máy, tắt máy tính và tắt máy điện di mao quản.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Sau khi phân tích máy sẽ cho ra kết quả là các loại hemoglobin phân tích được và tỷ lệ % của các hemoglobin (Hb) này. Bình thường thành phần huyết sắc tố ở người trưởng thành có: HbA1 (> 96%), HbA2(< = 4%). Ở trẻ em dưới 1 tuổi có thêm HbF (<1%). Khi có rối loạn tổng hợp hemoglobin có thể thấy tăng,

giảm hoặc mất một vài thành phần huyết sắc tố bình thường; cũng có thể kết hợp với xuất hiện các thành phần huyết sắc tố mới (ví dụ HbH, HbE...).

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy xét nghiệm và trên ống mẫu không thống nhất, mẫu bị đông, mẫu không ghi giờ lấy.

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại các thông tin cần thiết, nếu mẫu bị đông hoặc đã để quá lâu thì phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Sai sót về hóa chất: khay hóa chất bị khô hoặc có bọt khí.

Xử trí: phải kiểm tra kỹ hóa chất trước khi chạy máy, nếu hóa chất không đủ phải thay khay hóa chất khác, nếu hóa chất trong khay có bọt phải loại hết bọt khí mới được dùng.

- Sai sót do nhập vào máy không đúng thông tin về thứ tự bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích.

Xử trí: kiểm tra đối chiếu thông tin bệnh nhân và thứ tự mẫu phân tích trước khi chạy máy.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

SEBIA. 2006. **Capillarys 2 instruction manual** (Ref. 1222)

# **SỨC BỀN HỒNG CẦU**

*(Erythrocyte Osmotic Fragility test)*

## **I. NGUYÊN LÝ**

Sức bền hồng cầu là sức chịu đựng của hồng cầu dưới tác dụng làm tan máu của các dung dịch muối khi hạ thấp dần nồng độ. Sức bền hồng cầu phụ thuộc vào tính thấm của màng hồng cầu.

Màng hồng cầu là màng bán thấm, do vậy khi cho hồng cầu vào dung dịch nhược trương, nước sẽ từ ngoài vào trong hồng cầu để cân bằng áp lực thẩm thấu, làm trương to hồng cầu. Dung dịch càng nhược trương nước sẽ vào càng nhiều và hồng cầu càng dễ vỡ. Lợi dụng tính chất đó người ta cho hồng cầu vào một loạt các dung dịch nhược trương có nồng độ khác nhau, ở pH = 7,4 để ở nhiệt độ phòng xét nghiệm. Sau một thời gian nhất định quan sát mức độ tan của hồng cầu để đánh giá tính bền vững của màng hồng cầu.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp nghi đến bệnh lý huyết sắc tố, bệnh thiếu máu tan máu.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **II. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên xét nghiệm đã được đào tạo.

### **2. Phương tiện - Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Máy ly tâm ống máu;
- Pipet và đầu pipet loại 25 $\mu$ l và 1000 $\mu$ l;
- Các ống nghiệm thủy tinh loại 5 ml;
- Nền trắng bằng giấy hoặc nhựa đục.
- Găng tay, giấy thấm.

#### **2.2. Hóa chất**

Dung dịch muối đệm với các nồng độ khác nhau. Cách pha như sau:

- Chuẩn bị dung dịch mẹ là một dung dịch đệm muối chloride có áp lực thẩm thấu tương đương với 100g/l (1,71 mol/l) NaCl như sau: hòa tan trong nước 90 gram NaCl; 13,65g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và 2,34g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O và điều chỉnh thể tích về 1 lít. Dung dịch mẹ này dùng trong 1 tháng, bảo quản lạnh 4 độ C

(trong quá trình bảo quản lạnh có thể xuất hiện kết tinh thể trong lọ dung dịch. Khi đó phải để dung dịch mẹ ra nhiệt độ phòng và hòa tan tinh thể trước khi dùng).

- Từ dung dịch mẹ này trước hết pha loãng 10 lần với nước cất thành dung dịch 10‰ (10g/l), sau đó từ dung dịch này pha loãng thành các dung dịch muối ở các nồng độ thấp hơn: 7‰, 6‰, 5.5‰, 5.0‰, 4.75‰, 4.5‰, 4.25‰, 4.0‰, 3.75‰, 3.5‰, 3.25‰, 3‰, 2.75‰, 2.5‰, 2‰, 1‰.

- Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypochlorite.

### **3. Bệnh phẩm**

Là mẫu máu ngoại vi của các đối tượng người bệnh bị bệnh máu và có chỉ định của lâm sàng.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

- Lấy 3ml máu tĩnh mạch, chống đông bằng Heparin (không nên dùng chất chống đông EDTA, Citrate hoặc Oxalate vì như vậy là cho thêm muối vào môi trường làm thay đổi áp lực thẩm thấu).

- Nếu bảo quản mẫu ở nhiệt độ phòng, cần làm xét nghiệm trong vòng 2 giờ kể từ khi lấy máu. Nếu bảo quản mẫu ở nhiệt độ 4 độ C, có thể làm xét nghiệm trong vòng 6 giờ kể từ khi lấy máu.

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

- Lấy 16 ống nghiệm thủy tinh loại 5ml xếp vào giá, ghi tên tuổi người bệnh, đánh số thứ tự từ 1 đến 16.

- Cho lần lượt 3ml dung dịch nhược trương với các nồng độ lần lượt từ 1‰ đến 7‰ vào 16 ống.

- Đảo nhẹ nhàng ống máu vài lần để trộn kỹ máu trong ống. Nhỏ 100 µl máu đã trộn vào mỗi ống dung dịch nhược trương.

- Lấy bông không thấm nước bịt ống nghiệm, nhẹ nhàng đảo ống vài lần để trộn đều máu và dung dịch trong ống.

- Để các ống nghiệm thẳng đứng trên giá ở nhiệt độ phòng từ 1-2 giờ, sau đó đọc kết quả tan máu tại các ống.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

### **1. Đọc kết quả**

- Bất đầu tan: là nồng độ muối tại ống mà khi quan sát thấy phần dịch nổi ở ống đáy chuyển sang màu hồng, ở đáy ống nhìn thấy cục hồng cầu.

- Tan hoàn toàn: là nồng độ muối tại ống mà khi quan sát thấy phần dịch nổi ở ống đáy có màu đỏ trong suốt và không còn nhìn thấy cục hồng cầu ở đáy ống.

## 2. Nhận định kết quả

Bình thường:	Bắt đầu tan từ: 4,5-5‰; Tan hoàn toàn từ: 3-3,5‰
Sức bền hồng cầu tăng:	Bắt đầu tan từ: <4,5‰; Tan hoàn toàn từ: <3‰
Sức bền hồng cầu giảm:	Bắt đầu tan từ: >5‰; Tan hoàn toàn từ >3,5‰

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy xét nghiệm và trên ống mẫu không thống nhất, mẫu bị đông, mẫu không ghi giờ lấy.

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại các thông tin cần thiết, nếu mẫu bị đông hoặc đã để quá lâu thì phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Sai sót trong quá trình nhận định kết quả.

Xử trí: Kiểm tra cẩn thận, nếu cần thiết phải đọc màu dịch nổi trên nền giấy trắng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dacie J. V., Lewis S. M. *Osmotic fragility, as measured by lysis in hypotonic saline*. In “Practical Haematology”. Longman, 1994; 8<sup>th</sup> Edition: 216-20.
2. Laboratory Network. *Haemophilia 2005*; 11:387-97.

**TIỀN MÃN CẢM**  
**BẢNG KỸ THUẬT MIỄN DỊCH GẮN MEN (ELISA)**  
*(Panel reactive antibody test by ELISA)*

### **I. NGUYÊN LÝ**

Kháng thể kháng HLA có thể hình thành trong cơ thể người bệnh do đã được tiếp xúc với kháng nguyên trước.

Huyết thanh của người bệnh được ủ với một phiến phản ứng gồm nhiều giếng, các giếng đó được phủ các loại kháng nguyên hệ HLA khác nhau. Nếu có phản ứng kháng nguyên-kháng thể đặc hiệu xảy ra, kháng thể đó sẽ được phát hiện bằng hệ thống kháng thể thứ hai kháng IgG người vì hệ thống phát hiện bao gồm có cơ chất tạo màu và enzym xúc tác (theo nguyên lý ELISA). Nếu phản ứng tạo màu xảy ra ở giếng nào (có màu xuất hiện) thì chứng tỏ trong huyết thanh người bệnh có kháng thể đặc hiệu phản ứng với một hoặc một vài kháng nguyên có trong giếng đó. Xét nghiệm này thường được chỉ định để phát hiện kháng thể kháng HLA bất thường trước ghép, hoặc để kiểm tra đánh giá sự hình thành của kháng thể kháng HLA sau ghép.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Các trường hợp chuẩn bị ghép đồng loại.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên và cử nhân xét nghiệm được đào tạo thực hiện kỹ thuật;
- Bác sĩ: đọc kết quả, đánh giá, kiểm tra chất lượng.

#### **2. Phương tiện - Hóa chất**

##### **2.1. Phương tiện**

- Máy đọc ELISA vi giếng (đọc được phiến Terasaki);
- Bộ pipet man 10, 20, 200, và 1000 µl;
- Máy ly tâm ống máu;
- Que thủy tinh.
- Găng tay, giấy thấm.

##### **2.2. Hóa chất**

- Bộ kit tiền miễn cảm bao gồm:
- + Dung dịch rửa;



- + Dung dịch pha loãng mẫu;
- + Huyết thanh chứng dương;
- + Dung dịch cộng hợp;
- + Dung dịch cơ chất tạo màu;
- + Dung dịch ngưng phản ứng;
- + Phiến nhựa vi giếng có gắn sẵn các hỗn hợp kháng nguyên hệ HLA.

(thường hãng sản xuất cung cấp tài liệu dạng sơ đồ cho biết kháng nguyên trong có từng giếng).

- Nước cất, hoá chất khử trùng Natri hypoclorite.

### **3. Mẫu bệnh phẩm**

- Mẫu dùng là mẫu huyết thanh tách từ máu không chống đông.
- Mẫu cho xét nghiệm có thể bảo quản 7 ngày ở nhiệt độ 2-8°C. Muốn bảo quản lâu hơn, mẫu huyết thanh phải được giữ âm sâu ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ).

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Chuẩn bị mẫu**

- Lấy 2ml máu ngoại vi vào ống nghiệm không chống đông, ghi rõ thông tin người bệnh: tên, tuổi, số giường, khoa phòng, đúng với thông tin trên phiếu chỉ định.

- Tách huyết thanh: để mẫu đông tự nhiên. Dùng que thủy tinh tách lớp huyết thanh đông khỏi thành ống.

- Ly tâm ống máu đông 2000 vòng/phút trong 3 phút, sẽ thu được lớp huyết thanh màu vàng nổi lên phía trên.

- Pha loãng huyết thanh người bệnh bằng dung dịch pha loãng mẫu theo hướng dẫn của nhà sản xuất kit.

### **2. Chuẩn bị hóa chất**

- Đưa hóa chất ra nhiệt độ phòng, pha dung dịch rửa, huyết thanh chứng, cộng hợp, và cơ chất tạo màu về nồng độ phản ứng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

### **3. Tiến hành xét nghiệm**

- Đưa phiến phản ứng ra nhiệt độ phòng 15 phút.
- Nhỏ bệnh phẩm, dung dịch pha loãng kháng thể (giếng blank), và huyết thanh vào các vị trí đã quy định trên phiến (theo hướng dẫn của nhà sản xuất).
- Ủ 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

- Rửa 3 lần bằng dung dịch rửa, 20 uL/giếng, mỗi lần để 2 phút.
- Nhỏ 10 uL cộng hợp vào mỗi giếng, ủ 40 phút.
- Rửa 2 lần bằng dung dịch rửa, 20 uL/giếng, mỗi lần để 2 phút.
- Nhỏ 10 uL Substrate vào mỗi giếng, ủ 15 phút.
- Nhỏ 10 uL dung dịch ngưng phản ứng vào mỗi giếng. Đọc kết quả trên máy đo ELISA dùng cho phiên Terasaki, dùng phần mềm của hãng sản xuất kit. Kết quả được xuất dưới dạng các giếng âm tính và dương tính.

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Mẫu xét nghiệm được đọc kết quả như sau:
  - + Các giếng chứng dương xuất hiện màu rõ (thường là màu xanh lam).
  - + Các giếng chứng âm không bắt màu.
- Nếu không đạt các yêu cầu trên thì xét nghiệm phải tiến hành lại.
- Cách đọc kết quả: kết quả được đọc dưới dạng « âm tính » hoặc « % dương tính ». Cách tính toán như sau:

***% dương tính = (số giếng dương tính) / Tổng số giếng phản ứng cho 1 người bệnh.***

***Ghi chú:*** Giếng dương tính: là giếng có phản ứng cho màu xanh lam. Tổng số giếng phản ứng: là tổng số giếng dùng cho 1 người bệnh đã loại đi các giếng dùng làm chứng âm, chứng dương và chứng blank.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Sai sót mẫu bệnh phẩm: tên bệnh nhân trên giấy xét nghiệm và trên ống mẫu không thống nhất, mẫu bị đông, mẫu không ghi giờ lấy.

Xử trí: yêu cầu nơi đưa mẫu xác minh lại các thông tin cần thiết, nếu mẫu bị đông hoặc đã để quá lâu thì phải lấy lại mẫu bệnh phẩm.

- Các mẫu chứng dương lại âm tính dương hoặc mẫu chứng âm lại dương tính. Thường do hóa chất hết hạn hoặc do chuẩn bị hóa chất sai.

Xử trí: kiểm tra hạn sử dụng của hóa chất, không dùng hóa chất hết hạn. Làm lại xét nghiệm và tuân thủ đúng các bước trong quy trình.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

One Lambda, 2010. *Lamda Antigen Tray Class I and Class II 88 antigen panel. User manual.*

# XÉT NGHIỆM GEN BẰNG KỸ THUẬT FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)

## GENE ANALYSIS BY FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật FISH được tiến hành dựa trên cơ sở của phản ứng lai ghép. Trong tế bào, phân tử ADN tồn tại dưới dạng phân tử kép gồm 2 chuỗi đơn gắn kết bổ sung với nhau thông qua liên kết hydro. Liên kết hydro là liên kết yếu nên dễ dàng bị đứt gãy dưới tác động của nhiệt độ hay pH cao. Lúc đó, phân tử ADN bị tách thành 2 chuỗi đơn. Tuy nhiên khi nhiệt độ hay pH giảm, các chuỗi đơn lại ghép nhau theo nguyên tắc bổ sung.

Dựa trên đặc tính này, kỹ thuật FISH sử dụng các probe là đoạn ADN đặc hiệu có gắn huỳnh quang để lai ghép với các đoạn ADN tương đồng trên nhiễm sắc thể. Từ đó, chúng ta có thể phát hiện bất thường nhiễm sắc thể một cách chính xác và nhanh chóng.

### II. CHỈ ĐỊNH

Xét nghiệm này được chỉ định ở giai đoạn chẩn đoán bệnh hoặc giai đoạn theo dõi điều trị bệnh cho tất cả người bệnh mắc bệnh máu ác tính liên quan đến các bất thường nhiễm sắc thể đặc hiệu.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Kỹ thuật viên xét nghiệm Di truyền - Sinh học phân tử đã được đào tạo.

#### 2. Phương tiện, hóa chất

##### 2.1. Phương tiện

- Thiết bị: bể ổn nhiệt, máy lai, máy ly tâm, máy trộn mẫu, và kính hiển vi huỳnh quang;

- Dụng cụ: kẹp kim loại, 10 cốc Coplin, nhiệt kế, coverslip 22x22, pipetman 100 µl, 10 µl, xi măng cao su, ống đong, giấy thấm.

##### 2.2. Hóa chất

- Probe phù hợp tương ứng với đoạn gen cần phát hiện;  
- Dung dịch 10% formamide: 5 ml formamide + 30 ml H<sub>2</sub>O + 15 ml 20X SSC;

- Dung dịch 2X SSC;
- Dung dịch rửa 0,1% NP40: 2X SSC + 0,1% NP40;
- Dung dịch rửa 0,3% NP-40: 0,4X SSC + 0,3% NP40;
- Cồn 70°, 85°, 100°.

### **3. Bệnh phẩm**

2ml máu ngoại vi hoặc dịch hút tủy xương được đựng trong bơm tiêm có tráng chất chống đông heparin 5.000 đơn vị/ml.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

- 2ml máu ngoại vi hoặc dịch hút tủy xương được đựng trong bơm tiêm có tráng chất chống đông heparin 5.000 đơn vị/ml. Máu hoặc tủy xương được nuôi cấy trong 24 giờ.

- Sau 24 giờ, tiến hành thu hoạch huyền dịch tế bào.

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

#### **2.1. Chuẩn bị tiêu bản**

- Nếu sử dụng kỹ thuật FISH trên các cụm kỳ giữa (metaphase) thì cần nuôi cấy và chuẩn bị tiêu bản như kỹ thuật xét nghiệm công thức nhiễm sắc thể. Trong trường hợp sử dụng trên nhân tế bào thì có thể bỏ qua bước nuôi cấy.

- Nhỏ huyền dịch tế bào lên tiêu bản.

Yêu cầu: hình thái nhân rõ ràng, tế bào dàn đều, các cụm nhiễm sắc thể kỳ giữa to và bung đẹp.

- Dùng bút kim cương đánh dấu trên bề mặt tiêu bản những vùng đáp ứng được yêu cầu trên.

#### **2.2. Rửa tiêu bản**

- Ngâm tiêu bản vào dung dịch 2X SSC ở  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  trong 15 phút;
- Rửa tiêu bản qua cốc chứa dung dịch 2X SSC ở nhiệt độ phòng trong 5 phút;
- Chuyển tiêu bản qua cốc chứa dung dịch formaldehyde 10% ở nhiệt độ phòng trong 5 phút;
- Rửa tiêu bản qua cốc chứa dung dịch 2X SSC ở nhiệt độ phòng trong 5 phút;
- Chuyển tiêu bản qua cốc chứa cồn 70° trong 1 phút;
- Chuyển tiêu bản qua cốc chứa cồn 85° trong 1 phút;
- Chuyển tiêu bản qua cốc chứa cồn 100° trong 1 phút;

- Để tiêu bản khô hoàn toàn ở nhiệt độ phòng.

### 2.3. Chuẩn bị probe

- Trộn đều các dung dịch sau trong 1 ống PCR (1  $\mu$ l probe + 7  $\mu$ l LSI + 2  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O) /1tiêu bản.
- Ly tâm nhẹ.

### 2.4. Lai

- Nhỏ 10  $\mu$ l dung dịch probe vào khu vực đánh dấu trên tiêu bản sau đó che phủ bằng coverslip.

Yêu cầu: dung dịch probe thấm đều trên tiêu bản, không có bọt khí.

- Phủ kín coverslip bằng cao su xi măng.
- Đặt tiêu bản vào máy lai, chọn chương trình biến tính ở 73°C trong 3 phút và ủ 37°C trong 16 - 20 giờ.

### 2.5. Rửa sau khi lai

- Gỡ bỏ xi măng cao su và coverslip;
- Ngâm và lắc mạnh tiêu bản lần lượt qua các công Coplin sau.
  - + Dung dịch (0,4X SSC/ 0.3% NP40): 2 phút, 73°C;
  - + Dung dịch (2X SSC/ 0,1% NP40): 1phút, nhiệt độ phòng.
- Làm khô tiêu bản.

### 2.6. Chống mất màu probe

- Nhỏ 10-20  $\mu$ l dung dịch DAPI/antifade (1:20) lên bề mặt tiêu bản để chống mất màu probe và nhuộm nhân tế bào.

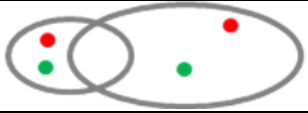
- Phủ kín tiêu bản bằng coverslip.



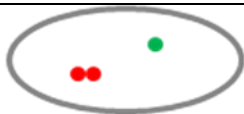
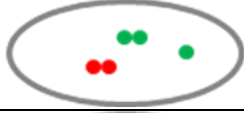

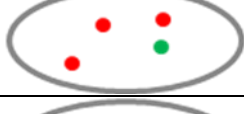

Yêu cầu: dung dịch dàn đều trên tiêu bản và không có bọt khí

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, với kỹ thuật dual colour FISH, chúng ta sẽ thấy 3 màu.

- + Màu xanh da trời đậm: màu nhân tế bào
- + Màu xanh lá cây: màu của probe
- + Màu đỏ: màu của probe
- Nguyên tắc phân tích kết quả được liệt kê trong bảng sau

<b>Hướng dẫn đọc kết quả trong Dual colour FISH</b>	
1	 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;">Không đếm. Hai nhân tế bào xếp chồng lên nhau.</div>

2		Một tín hiệu đỏ và một tín hiệu xanh. Tín hiệu đỏ bị khuyếch tán .
3		Không đếm. Các nhân tế bào quá gần nhau, không xác định được ranh giới.
4		Một tín hiệu đỏ và một tín hiệu xanh. Tín hiệu đỏ bị phân hóa.
5		Một tín hiệu đỏ và hai tín hiệu xanh. Một tín hiệu xanh và một tín hiệu đỏ bị phân hóa.
6		Hai tín hiệu đỏ và một tín hiệu xanh.
7		Ba tín hiệu đỏ và một tín hiệu xanh.
8		Bốn tín hiệu đỏ.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Vấn đề	Nguyên nhân	Cách khắc phục
Không có tín hiệu hoặc tín hiệu yếu	Kính hiển vi không thích hợp hoặc có sự cố	Kiểm tra lại kính và các vật kính
	Probe không biến tính hoàn toàn	Kiểm tra nhiệt độ bể ấm có đúng $(73 \pm 1)^\circ\text{C}$
	Điều kiện lai không thích hợp	Kiểm tra nhiệt độ tủ ấm có đúng $37^\circ\text{C}$ hay không. Tăng thời gian lai lên 1 giờ.
	Điều kiện rửa không thích hợp	Kiểm tra nhiệt độ bể ấm có đúng $73^\circ\text{C}$ Kiểm tra các thành phần dung dịch rửa (pH...)
	Xuất hiện bọt khí giữa tiêu bản và coverslip	Loại bỏ bọt khí
	Bảo quản probe không đúng cách	Bảo quản probe ở $-20^\circ\text{C}$ , không ánh sáng
Tín hiệu	Điều kiện lai không thích hợp	Kiểm tra nhiệt độ tủ ấm có đúng $37^\circ\text{C}$

đặc trưng yếu	Nhiệt độ dung dịch rửa quá thấp	Duy trì nhiệt độ dung dịch rửa ở $(73\pm 1)^{\circ}\text{C}$
Nền quá bẩn	Tiêu bản làm già quá mức cho phép hoặc chứa nhiều tế bào chết	Tăng thời gian biến tính của tiêu bản lên 10 phút
	Tiêu bản không sạch hoặc nhiều mảnh vỡ tế bào trên tiêu bản	Chuẩn bị lại tiêu bản
	Các mảnh ADN không sạch	Thực hiện lại bước rửa tiêu bản sau khi lai với formamide
	Dung dịch rửa sai thành phần và nhiệt độ	Kiểm tra lại dung dịch rửa
Hình thái các nhiễm sắc thể bị co cụm, biến dạng	Đề tiêu bản bị quá khô	Tăng độ ẩm hoặc tăng nhiệt độ bể ươm trong quá trình tiến hành thí nghiệm
	Tiêu bản chưa được sấy khô trước khi biến tính	Chuẩn bị lại xét nghiệm với tiêu bản mới Làm già tiêu bản trước khi tiến hành FISH 24 giờ
	Tiêu bản chưa khô sau biến tính	Sấy tiêu bản ở nhiệt độ $45^{\circ}\text{C}$ trong 10-15 phút sau biến tính
	Nhiệt độ bể ươm quá cao	Kiểm tra nhiệt độ bể ươm có đúng $(73\pm 1)^{\circ}\text{C}$
	Thời gian biến tính quá lâu	Giảm thời gian biến tính 1 phút
Tín hiệu quá mạnh	Nồng độ probe sử dụng quá cao so với dải màu của KHV	Cố gắng chỉnh kính thay thế bằng các dải màu trung lập

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu hướng dẫn sử dụng của công ty Vysis.
2. Lynda J. Cambell, ( 2011), “Cancer cytogenetic”, Human Press.

# NHUỘM BĂNG G NHIỄM SẮC THỂ

## G-BAND STAINING

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật nhuộm băng G được sử dụng để nhuộm nhiễm sắc thể ở kỳ giữa. Nhiễm sắc thể (nhiễm sắc thể) ở kỳ giữa được xử lý bằng enzym phân giải protein và được nhuộm với Giemsa. Băng tối là đoạn ADN giàu A, T (ngược lại với băng R), băng sáng là những đoạn giàu G, C. Phương pháp được sử dụng để nhận dạng các nhiễm sắc thể và phát hiện bất thường nhiễm sắc thể, dựa vào đặc điểm các băng sáng tối trên mỗi nhiễm sắc thể.

### II. CHỈ ĐỊNH

Kỹ thuật này được sử dụng trong xét nghiệm công thức nhiễm sắc thể máu ngoại vi/tủy xương để nhận diện bất thường nhiễm sắc thể..

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Kỹ thuật viên xét nghiệm di truyền đã được đào tạo.

#### 2. Phương tiện - Hóa chất

##### 2.1. Phương tiện

- 02 cối Coplin jar;
- 03 cốc thủy tinh 100ml;
- 01 cặp không máu.

##### 2.2. Hóa chất

- Enzym phân giải protein (trypsin);
- Đệm pH 6,8 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 9,1g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O: 11,5g/l);
- Chất ức chế enzym (huyết thanh bào thai bê - FBS);
- Nước muối 9‰.

#### 3. Bệnh phẩm

Tiêu bản nhiễm sắc thể kì giữa đã được sấy khô (theo quy trình “ Xét nghiệm công thức Nhiễm sắc thể”).

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

#### 1. Chuẩn bị

##### 1.1. Chuẩn bị tiêu bản



Tiêu bản sau khi thu hoạch được cho vào tủ sấy 50-60°C 24 giờ, hoặc để khô tự nhiên 3 ngày trở lên.

### **1.2. Chuẩn bị hóa chất**

- Cốc 1: Pha 0.05g trypsin bột vào 50ml nước muối 0.9%;
- Cốc 2: Pha 100ml FBS 2%;
- Cốc 3: Nước muối 9%;
- Cốc 4: Nước muối 9%;
- Cốc 5: Pha Giêmsa 10% trong đệm pH 6,8;
- Cốc 6: Đệm pH 6,8.

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

- Nhúng tiêu bản trong cốc 1 từ 1-2 phút;
- Chuyển sang cốc 2/30 giây;
- Chuyển sang cốc 3/15 giây;
- Chuyển sang cốc 4/15 giây;
- Chuyển sang cốc 5 /10 phút;
- Chuyển sang cốc 6 /15 giây;
- Rửa dưới vòi nước chảy

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Tiêu bản sau khi nhuộm băng G được phân tích bất thường về số lượng, cấu trúc trên kính hiển vi ở độ phóng đại 1.000 lần và được phân tích bằng phần mềm chuyên dụng.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

<b>Vấn đề</b>	<b>Nguyên nhân</b>	<b>Xử trí</b>
Băng không cắt (Không hình thành các băng nhạt)	Đề thời gian cắt của enzym không đủ.	Đề thêm thời gian cắt của enzym.
Băng bị cắt quá (nhiễm sắc thể quá nhạt màu, không rõ các băng đậm màu)	Đề thời gian cắt của enzym dài quá, dung dịch pha enzym phân giải không đúng.	Điều chỉnh lại thời gian cắt của enzym cho hợp lý. Pha lại enzym nếu nhầm dung dịch đệm.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Margaret J. Barch, ( 1991 ), “The ACT Cytogenetics Laboratory Manual”, Raven press.

2. Phạm Quang Vinh, Đỗ Trung Phần, (2009), “Các kỹ thuật nhuộm nhiễm sắc thể”, “Kỹ thuật huyết học và truyền máu ứng dụng trong lâm sàng”, Nhà xuất bản Y học, pp110-119.

# **CÔNG THỨC NHIỄM SẮC THỂ TỬY**

## **KARYOTYPING ANALYSIS OF BONE MARROW SAMPLE**

### **I. NGUYÊN LÝ**

Tế bào tủy là những tế bào non có khả năng phân bào. Do đó người ta có thể sử dụng thu hoạch trực tiếp hoặc nuôi cấy trong môi trường nhân tạo mà không cần chất kích thích non hóa. Sau đó dùng chất ức chế phân bào ức chế tế bào ở kỳ giữa của quá trình phân bào lúc này nhiễm sắc thể có hình dạng điển hình nhất, thu hoạch rồi chuẩn bị tiêu bản phân tích cụm nhiễm sắc thể.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này được chỉ định cho tất cả người bệnh mắc bệnh máu ác tính.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

Kỹ thuật viên xét nghiệm di truyền đã được đào tạo làm kỹ thuật.

#### **2. Phương tiện - Hóa chất**

##### **2.1. Phương tiện**

- Ống falcon 50 ml vô trùng;
- Chai nuôi cấy vô trùng;
- Bộ dụng cụ đếm bạch cầu;
- Lam kính;
- Giá để lam;
- Ống falcon 15 ml;
- Ống nghiệm thủy tinh;
- Pipet Pasteur;
- Ống eppendorf;
- Ống chứa chất chống đông heparin sodium 5ml.

##### **2.2. Hóa chất**

- Môi trường nuôi cấy tế bào (RPMI 1640 có L-glutamin, HEPES);
- Huyết thanh bào thai bê (FBS);
- Dung dịch ức chế phân bào (Colcemide 0,01 % (10 $\mu$ g/ml));
- Dung dịch nhược trương (KCL 0,075M (pH=7,4));

- Dung dịch đếm bạch cầu;
- Methanol tuyệt đối;
- Acid acetic;
- Kháng sinh (Streptomycin 10mg/ml + Penecilin 10,000UI/ml).

### 3. Bệnh phẩm

2ml tủy được chứa trong ống có chất chống đông heparin sodium.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1.1. Nuôi cấy

#### 1.1. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy:

Cho 45ml môi trường nuôi cấy vào ống falcol 50ml, cho thêm 5ml huyết thanh bào thai bê và 500µl kháng sinh, sau đó trộn đều.

#### 1.2. Đếm số lượng tế bào

- Ly tâm 1.000 vòng/phút trong 8 phút lấy lớp buffy coat cho vào 3ml môi trường trộn đều và đếm số lượng tế bào tủy trong hỗn dịch.

- Tính toán số lượng tế bào cho vào mỗi chai nuôi cấy sao cho số lượng tế bào đạt từ  $1 - 4 \times 10^6$  tế bào/ml môi trường nuôi cấy.

#### 1.3. Chuẩn bị chai nuôi cấy

- Mỗi chai nuôi cấy ghi thông tin người bệnh, ngày cấy, ngày thu hoạch.
- Trong mỗi chai nuôi cấy cho 10ml môi trường nuôi cấy.

#### 1.4. Nuôi cấy tế bào

Nhỏ lượng tế bào như tính toán vào chai nuôi cấy đã chuẩn bị. Lắc nhẹ cho mẫu tan vào môi trường, nới lỏng nắp, đặt nằm trong tủ ấm  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  / 24 giờ.

### 2. Thu hoạch

2.1. Nhỏ colcemide: Sau 24 giờ cho vào mỗi chai nuôi cấy 50 µl dung dịch colcemide 0.01<sup>0</sup>/<sub>00</sub> (10µg/ml), đặt lại trong tủ ấm trong 15 phút.

#### 2.2. Chuẩn bị hóa chất, dụng cụ:

- Bật tủ ấm  $37^{\circ}\text{C}$ , làm ấm dung dịch KCL 0,075M (Số lượng đủ 8ml/mẫu)
- Chuẩn bị dung dịch carnoy theo tỷ lệ: 3 methanol : 1 acid acetic
- Chuẩn bị ống falcon 15ml, ống nghiệm thủy tinh, pipet thủy tinh theo số lượng ống cấy.

2.3. Chuyển toàn bộ huyền dịch ở chai nuôi cấy vào ống falcon 15ml, ly tâm ở máy ly tâm ngang 1.000 vòng/phút trong 8 phút.

2.4. Sau khi ly tâm hút bỏ phần dịch nổi ở trên, để lại cặn tế bào (chỉ hút đến cách mặt trên cặn tế bào khoảng 5 mm).

2.5. Cho thêm 8ml dung dịch nhuộm trương đã để ấm 37°C vào ống ly tâm, trộn nhẹ một vài lần rồi ủ ở bể ấm 37°C trong 18 phút.

2.6. Sau khi ủ 18 phút cho thêm vào mỗi ống 0.5-1 ml dung dịch carnoy, trộn nhẹ để 5-10 phút.

2.7. Lấy ống ra ly tâm lấy cặn, hút bỏ dịch nổi phía trên. Cho thêm vào mỗi ống 10ml dung dịch carnoy trộn đều để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

2.8. Lặp lại bước 7 đến khi cặn tế bào trắng. Tái huyền dịch bằng carnoy.

### **3. Nhỏ tiêu bản**

- Các lam kính sạch rửa sạch ngâm qua nước cất, ngâm lại vào cồn tuyệt đối, chuyển sang ngâm nước cất để lên giá lam cho khô.

- Đặt giá lam vào ngăn đá tủ lạnh khoảng 10 phút, sau đó lấy ra để nghiêng 20 - 30° trên giấy thấm.

- Nhỏ một giọt huyền dịch vừa pha lên lam kính. Chú ý khi nhỏ tiêu bản để đầu pipet cao hơn mặt lam kính từ 10-20 cm.

- Để tiêu bản khô tự nhiên trước khi nhuộm.

*Lưu ý: Trong trường hợp còn huyền dịch thì lưu vào ống eppendorf để nhỏ thêm tiêu bản khi cần.*

### **4. Nhuộm Giêmsa**

- Pha Giêmsa 10% từ Giêmsa mẹ;

- Nhuộm tiêu bản 5-10 phút;

- Rửa dưới vòi nước;

- Sấy khô trong tủ sấy 60°C.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

1. Tiêu bản sau khi nhuộm Giêmsa và băng G, số lượng và cấu trúc của các cặp nhiễm sắc thể sẽ được khảo sát trên kính hiển vi ở độ phóng đại 1.000 lần và được phân tích bằng phần mềm chuyên dụng.

2. Một số quy tắc trong khi phân tích:

- Thừa nhiễm sắc thể: có từ 2 cụm kỳ giữa trở lên thừa cùng 1 nhiễm sắc thể.

- Thiếu nhiễm sắc thể: có từ 3 cụm kỳ giữa trở lên thiếu cùng 1 nhiễm sắc thể.

- Bất thường cấu trúc: có từ 2 cụm trở lên mang cùng 1 bất thường.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Vấn đề	Nguyên nhân	Xử trí
Không có cụm kỳ giữa (cụm mitose), ít cụm.	Nồng độ chất chống đông không đúng.	Kiểm tra lại nồng độ chất chống đông.
	Lấy sai chất chống đông, cho mẫu vào dung dịch chống đông: lithium heparin, EDTA, phenol-heparin, natri citrat...	Yêu cầu lấy lại mẫu nếu có thể. Nếu không thể lấy lại mẫu có thể rửa lại tế bào bằng môi trường nuôi cấy trước khi nuôi cấy.
	Chuyển mẫu và bảo quản mẫu	Kiểm tra một số vấn đề: thời gian từ khi lấy mẫu tới khi nhận mẫu, nhiệt độ, áp suất, pH môi trường dùng lưu mẫu khi vận chuyển mẫu.
	Nhiệt độ, CO <sub>2</sub> trong tủ nuôi cấy không đúng, quá cao hoặc quá thấp.	Kiểm tra lại nhiệt độ, CO <sub>2</sub> trong tủ ấm, nếu không đảm bảo phải mời kỹ sư điều chỉnh lại.
	Môi trường nuôi cấy không đầy đủ (L-glutamin không còn hoạt tính, giảm hoạt tính)	Thêm L-glutamin mới.
	Huyết thanh không phù hợp (huyết thanh không hỗ trợ được cho sự phát triển của tế bào (huyết thanh mất hoạt tính) hoặc gây độc cho tế bào)	Sử dụng lô huyết thanh khác, hoặc ống huyết thanh mới (các ống huyết thanh được tách ra từ chai to), loại huyết thanh khác (huyết thanh bào thai bê, huyết thanh bò, huyết thanh AB người).
	Sử dụng đồ thủy tinh (pipet thủy tinh, pipet Pasteur), đồ nhựa bị lỗi (chai nuôi cấy, đĩa petri)...	Thử thay đổi sang loại pipet mới, chai nuôi cấy, đĩa petri mới.
Màng tế bào không vỡ ra được	Rửa lại cặn tế bào bằng dung dịch carnoy tỷ lệ 2:1.	

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Margaret J. Barch, ( 1991 ), “The ACT Cytogenetics Laboratory Manual”, Raven press.
2. Phạm Quang Vinh, Đỗ Trung Phần, (2009), “Cấy máu ngoại vi phân tích nhiễm sắc thể”, “Kỹ thuật huyết học và truyền máu ứng dụng trong lâm sàng”, Nhà xuất bản Y học, pp103-110.

# **CÔNG THỨC NHIỄM SẮC THỂ MÁU NGOẠI VI**

## **KARYOTYPING ANALYSIS OF PERIPHERAL BLOOD SAMPLE**

### **I. NGUYÊN LÝ**

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

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này được cho tất cả người bệnh mắc bệnh máu ác tính hoặc nghi ngờ mắc bệnh lý di truyền bẩm sinh.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

Kỹ thuật viên xét nghiệm di truyền đã được đào tạo làm kỹ thuật.

#### **2. Phương tiện - hóa chất**

##### **2.1. Phương tiện**

- Ống falcon 50 ml vô trùng;
- Chai nuôi cấy vô trùng;
- Lam kính;
- Giá để lam;
- Ống falcon 15 ml;
- Ống nghiệm thủy tinh;
- Pipet Pasteur;
- Ống eppendorf;
- Ống chứa chất chống đông heparin sodium 5ml.

##### **2.2. Hóa chất**

- Môi trường nuôi cấy tế bào (RPMI 1640 có L-glutamin, Hapes);
- Huyết thanh bào thai bê (FBS);
- PHA (phitohemagglutinin);



- Kháng sinh: streptomycin 10mg/ml + penicilin 10.000UI/ml;
- Dung dịch colcemide 0,01‰ (10µg/ml);
- Dung dịch nhược trương: KCL 0,075M (pH=7,4);
- Dung dịch đệm bạch cầu;
- Methanol tuyệt đối;
- Acid acetic.

### 3. Bệnh phẩm

2ml máu ngoại vi được chứa trong ống có chất chống đông heparin sodium.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Nuôi cấy

#### 1.1. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy:

Cho 45ml môi trường nuôi cấy vào ống falcon 50ml, cho thêm 5ml huyết thanh bào thai bê và 500µl kháng sinh trộn kỹ.

#### 1.2. Chuẩn bị chai nuôi cấy

- Mỗi chai nuôi cấy ghi thông tin người bệnh, ngày cấy, ngày thu hoạch;
- Trong mỗi chai nuôi cấy cho 10ml môi trường nuôi cấy.

#### 1.3. Nuôi cấy tế bào

Cho 1ml máu ngoại vi, 200µl PHA vào chai nuôi cấy. Lắc nhẹ cho mẫu được trộn đều vào môi trường, nói lỏng nắp, đặt nằm trong tủ ấm 37°C, 5%CO<sub>2</sub> trong 72 giờ.

### 2. Thu hoạch

2.1. Nhỏ colcemide: Sau 72 giờ, cho vào mỗi chai nuôi cấy 50 µl dung dịch colcemide 0,01‰ (10µg/ml), đặt lại chai nuôi cấy vào tủ ấm trong 50 phút.

#### 2.2. Chuẩn bị hóa chất, dụng cụ:

- Bật tủ ấm 37°C, làm ấm chai dung dịch KCL 0,075M (Số lượng đủ 8ml cho một chai nuôi cấy).

- Chuẩn bị dung dịch carnoy theo tỷ lệ: 3 methanol: 1 acid acetic.

- Chuẩn bị ống falcon 15ml, ống nghiệm thủy tinh, pipet thủy tinh theo số lượng ống cấy.

2.3. Sau đó chuyển toàn bộ huyền dịch ở chai nuôi cấy vào ống falcon 15ml, ly tâm ở máy ly tâm ngang 1.000 vòng/phút trong 8 phút.

2.4. Sau khi ly tâm hút bỏ phần dịch nổi ở trên, để lại cặn tế bào (chỉ hút đến cách mặt trên cặn tế bào khoảng 5 mm).

2.5. Cho thêm vào ống ly tâm 8ml dung dịch nhược trương đã để ấm 37°C trước, trộn nhẹ một vài lần rồi ủ ở bể ấm 37°C trong 30 phút.

2.6. Sau khi ủ 30 phút cho thêm vào mỗi ống 0.5-1 ml dung dịch carnoy, trộn nhẹ để 5-10 phút.

2.7. Lấy ống ra ly tâm lấy cạn, hút bỏ dung dịch nổi phía trên cho thêm vào mỗi ống 10ml dung dịch carnoy trộn đều để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút

2.8. Lặp lại bước 7 đến khi cạn trắng. Tái huyền dịch bằng dung dịch carnoy.

### 3. Nhỏ tiêu bản

- Các lam kính sạch rửa sạch ngâm qua nước cất, ngâm lại vào cồn tuyệt đối, chuyển sang ngâm nước cất để lên giá lam cho khô;

- Đặt giá lam vào ngăn đá tủ lạnh khoảng 10 phút, sau đó lấy ra để nghiêng 20 - 30° trên giấy thấm;

- Nhỏ một giọt huyền dịch lên lam kính. Chú ý khi nhỏ tiêu bản để đầu pipet cao hơn mặt lam kính từ 10-20 cm;

- Để tiêu bản khô tự nhiên.

*Lưu ý: Trong trường hợp còn huyền dịch thì lưu vào ống eppendorf để nhỏ lại lam khi cần.*

### 4. Nhuộm Giêmsa

- Pha Giêmsa 10% từ Giêmsa mẹ nhuộm lam 5-10 phút;

- Rửa dưới vòi nước;

- Sấy khô trong tủ sấy 60°C.

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Tiêu bản sau khi nhuộm Giêmsa và nhuộm băng G, số lượng và cấu trúc của các cặp nhiễm sắc thể sẽ được khảo sát trên kính hiển vi ở độ phóng đại 1.000 lần và được phân tích bằng phần mềm chuyên dụng.

2. Một số quy tắc trong khi phân tích:

- Thừa nhiễm sắc thể: có từ 2 cụm phân bào trở lên thừa cùng 1 nhiễm sắc thể.

- Thiếu nhiễm sắc thể: có từ 3 cụm phân bào trở lên thiếu cùng 1 nhiễm sắc thể.

- Bất thường cấu trúc: có từ 2 cụm trở lên mang cùng 1 bất thường.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

Vấn đề	Nguyên nhân	Xử trí
	Nồng độ chất chống đông không	Kiểm tra lại nồng độ chất chống đông.

	đúng.	
	Lấy sai chất chống đông, cho mẫu vào dung dịch chống đông: lithium heparin, EDTA, phenol-heparin, natri citrat...	Yêu cầu lấy lại mẫu nếu có thể. Nếu không thể lấy lại mẫu có thể rửa lại tế bào bằng môi trường nuôi cấy trước khi nuôi cấy.
	Chuyển mẫu và bảo quản mẫu	Kiểm tra một số vấn đề: thời gian từ khi lấy mẫu tới khi nhận mẫu, nhiệt độ, áp suất, pH môi trường dùng lưu mẫu khi vận chuyển mẫu.
Không có cụm kỳ giữa (cụm mitose), ít cụm.	Nhiệt độ, CO <sub>2</sub> trong tủ nuôi cấy không đúng, quá cao hoặc quá thấp.	Kiểm tra lại nhiệt độ, CO <sub>2</sub> trong tủ ấm, nếu không đảm bảo phải mời kỹ sư điều chỉnh lại.
	Môi trường nuôi cấy không đầy đủ (L-glutamin không còn hoạt tính, giảm hoạt tính)	Thêm L-glutamin mới.
	Huyết thanh không phù hợp (huyết thanh không hỗ trợ được cho sự phát triển của tế bào (huyết thanh mất hoạt tính) hoặc gây độc cho tế bào)	Sử dụng lô huyết thanh khác, hoặc ống huyết thanh mới (các ống huyết thanh được tách ra từ chai to), loại huyết thanh khác (huyết thanh bào thai bê, huyết thanh bò, huyết thanh AB người).
	Sử dụng đồ thủy tinh (pipet thủy tinh, pipet Pasteur), đồ nhựa bị lỗi(chai nuôi cấy, đĩa petri)...	Thử thay đổi sang loại pipet mới, chai nuôi cấy, đĩa petri mới.
	Màng tế bào không vỡ ra được	Rửa lại cẩn tế bào bằng dung dịch carnoy tỷ lệ 2:1.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Margaret J. Barch, ( 1991 ), “The ACT Cytogenetics Laboratory Manual”, Raven press.
2. Phạm Quang Vinh, Đỗ Trung Phấn, (2009), “Kỹ thuật huyết học và truyền máu ứng dụng trong lâm sàng”, pp103-110, Nhà xuất bản Y học.

# CÂY HỖN HỢP TẾ BÀO LYMPHO

## MIXED LYMPHOCYTE CULTURE

### I. NGUYÊN LÝ

Khi nuôi cấy tế bào lympho nếu trong môi trường có kháng nguyên lạ, tế bào lympho sẽ non hóa và nhân lên. Cây hỗn hợp là đưa tế bào lympho của người cho đã bất hoạt bằng mitomicin C hoặc chiếu xạ cho tiếp xúc với tế bào lympho của người nhận. Nếu tế bào lympho của người nhận miễn cảm hoặc phản ứng với kháng nguyên trên tế bào lympho của người cho càng mạnh thì số lượng tế bào lympho của người nhận non hóa và nhân lên càng nhiều. Tế bào nhân lên sử dụng các bazơ nitơ tự do để tổng hợp ADN. Do đó, có thể ước lượng được mức độ phản ứng bằng cách cho thêm [<sup>3</sup>H] thimidine (là một loại bazơ nitơ có gắn đồng vị phóng xạ) vào môi trường nuôi cấy để phân tích lượng chất đồng vị phóng xạ dùng để đánh dấu này được sử dụng khi tế bào lympho của người nhận nhân lên.

Cây hỗn hợp lympho chủ yếu sử dụng trong việc đánh giá mức độ hòa hợp kháng nguyên của người cho và người nhận trước khi ghép tạng. Ngoài ra, nó có thể được sử dụng để nghiên cứu các đáp ứng miễn dịch ở mức độ tế bào.

### II. CHỈ ĐỊNH

Xét nghiệm này được chỉ định trong trường hợp cần đánh giá mức độ hòa hợp kháng nguyên của người cho và người nhận trước khi ghép tạng.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Kỹ thuật viên xét nghiệm đã được đào tạo kỹ thuật XN miễn dịch – di truyền.

#### 2. Phương tiện - Hóa chất

##### 2.1. Phương tiện

- Thiết bị: tủ ấm CO<sub>2</sub>, máy ly tâm lạnh, máy đếm phóng xạ nhấp nháy lỏng, kính hiển vi đảo ngược, pipet man.

- Dụng cụ: Ống nghiệm vô trùng, đĩa nuôi cấy 96 giếng 0,2 ml, bơm kim tiêm, đầu côn lọc.

##### 2.2. Hóa chất

- Môi trường RF10-M: 100 ml bao gồm:
  - + 86 ml môi trường RPMI.
  - + 10 ml huyết thanh bào thai bê.
  - + 0.1 ml 2 – mercaptoethanol nồng độ  $5 \times 10^{-2}$  M.
  - + 1 ml kháng sinh streptomycin 10mg/ml + penicilin 10,000UI/ml.
  - + 1 ml L-glutamin 200 mM.
  - + 2 ml HEPES buffer 1 M.
- [ $^3\text{H}$ ] thymidine.
- Lymphoprep.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Lấy bệnh phẩm

04 ml máu toàn phần của người bệnh cần ghép và người cho chống đông bằng heparin 5.000 đơn vị/ml.

### 2. Tiến hành kỹ thuật

- Tách tế bào lympho:
  - + Chuẩn bị 2 ống nghiệm vô trùng có 2ml lymphoprep.
  - + Cho 4 ml máu ngoại vi của người cho và người nhận vào 2 ống nghiệm trên.
  - + Ly tâm tốc độ 2500 vòng/phút trong 15 phút để tách tế bào lympho.
  - + Hút cẩn thận toàn bộ lớp tế bào đơn nhân ở giữa và cho vào 2 ống nghiệm vô trùng.
  - Tái huyền dịch tế bào lympho vào môi trường RF10-M.
  - Cho thêm 100  $\mu\text{l}$  mitomycin C nồng độ 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  vào ống nghiệm chứa tế bào lympho của người cho trong 20 phút để bất hoạt tế bào lympho.
  - Cho thêm 2 ml RF10-M vào ống nghiệm đã được xử lý với mitomycin C. Ly tâm tốc độ 1.000 vòng/ 10 phút và bỏ dịch nổi. Lặp lại bước rửa này 03 lần.
  - Cho 100  $\mu\text{l}$  huyền dịch tế bào lympho của người nhận có nồng độ tế bào  $2 \times 10^5/\text{ml}$  vào giếng của phiến nuôi cấy 96 giếng (cho vào 3 giếng).
  - Cho tiếp 100  $\mu\text{l}$  huyền dịch tế bào lympho đã bất hoạt của người cho có nồng độ tế bào  $5 \times 10^6$  (cả 3 giếng nêu trên).
  - Cho 200  $\mu\text{l}$  huyền dịch tế bào lympho của người nhận có nồng độ tế bào  $2 \times 10^5/\text{ml}$  vào giếng thứ 4 của phiến nuôi cấy 96 giếng làm chứng âm.
  - Đặt phiến nuôi cấy vào tủ ấm  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  trong 78 giờ.

- Cho 1  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] Thymidine vào mỗi giếng (cả 4 giếng nêu trên), đặt phiến nuôi cấy vào tủ ấm  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  trong 18 giờ.

- Thu hoạch tế bào và đọc kết quả trên máy đếm nhấp nháy lỏng theo cơ chế đơn vị đếm được tính theo đơn vị phóng xạ (cpm).

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Sử dụng phần mềm phân tích kết quả đối chiếu giữa các giếng chứng và giếng thực nghiệm.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

Không đảm bảo vô trùng: Cần thao tác và chuẩn bị dụng cụ, môi trường vô khuẩn, khử khuẩn khu vực thực hiện ít nhất 15 phút trước khi thực hiện kỹ thuật.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Greg A. Perry, (1976), “ Mixed Lymphocyte culture”, Creighton university.
2. John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, (1991), Current protocols in immunology, John Wiley & Son Press.

**PHÁT HIỆN NGƯỜI MANG GEN HEMOPHILIA**  
**(bằng kỹ thuật PCR-RFLP)**  
**DETECTION OF HEMOPHILIA CARRIER BY PCR-RFLP**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Tính đa hình (polymorphism) của một số đoạn gen là hiện tượng khác nhau một hoặc một nhóm nucleotid ở một vị trí nhất định trên gen nhưng không làm thay đổi hoạt động của gen. Các đa hình này thường nằm trong trình tự nhận biết của một hoặc một số enzym giới hạn và có thể được phát hiện khi sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP. Xác định đa hình đặc trưng ở người bệnh hemophilia, sau đó sử dụng đa hình này để tìm kiếm cá thể mang gen trong gia đình dựa trên nguyên tắc các gen nằm gần nhau thì di truyền cùng nhau. Đầu tiên, sử dụng kỹ thuật PCR để nhân bản đoạn gen quan tâm có chứa gen đa hình, sau đó cắt sản phẩm PCR này với một enzym giới hạn đặc hiệu với vị trí đa hình. Quan sát các sản phẩm cắt, sẽ nhận dạng được gen.

Yêu cầu để thực hiện kỹ thuật:

+ Phải biết người mẹ là người chắc chắn mang gen hemophilia (carrier) và cần phải xét nghiệm đặc tính đa hình của gen ở người mẹ, người mẹ phải là người dị hợp tử với đặc tính đa hình.

+ Phải xét nghiệm đặc tính đa hình của bố và của người bệnh hemophilia (là anh trai hoặc em trai của người cần phát hiện hoặc người bệnh là một người nam giới liên quan khác như bác ruột về phía mẹ).

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này được chỉ định cho tất cả những người phụ nữ trong gia đình có tiền sử mắc bệnh Hemophilia mà có nhu cầu xác định tình trạng mang gen.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

Kỹ thuật viên xét nghiệm sinh học phân tử đã được đào tạo.

### **2. Phương tiện - Hóa chất**

## **2.1. Phương tiện**

- Máy PCR;
- Hệ thống máy điện di, hệ thống đèn cực tím soi gel, hệ thống máy chụp ảnh;
- Buồng vô trùng (biology cabinet);
- Máy ly tâm tốc độ cao (tốc độ tối đa 14.000 vòng/phút);
- Máy vortex;
- Các loại pipet 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l;
- Đầu côn có màng lọc;
- Ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Ống PCR 0,2 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Tủ lạnh 4-8°C, tủ âm sâu -20°C;
- Găng tay.

## **2.2 Hóa chất**

- Sử dụng kit tách ADN thương mại. Nếu tách thủ công thì sử dụng các sinh phẩm cần thiết để tách chiết ADN như proteinase K, đệm ly giải tế bào, phenol/chloroform, cồn tuyệt đối.

- Hóa chất chạy PCR gồm: Đệm, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, enzym kéo dài chuỗi, nước khử ion vô trùng, các cặp mồi đặc hiệu.

- Hóa chất điện di: thạch agarose, đệm tra mẫu, thang chuẩn ADN, thuốc nhuộm ethidium bromide.

## **3. Bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi (của mỗi thành viên) đựng trong ống chống đông EDTA.

## **4. Phiếu xét nghiệm**

Có đầy đủ các thông tin cần thiết về người bệnh, về chẩn đoán và yêu cầu xét nghiệm.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi (của mỗi thành viên) đựng trong ống chống đông EDTA.

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

#### **Bước 1: Tách chiết ADN**

Xem bài “ Tách chiết ADN từ máu ngoại vi”.



## **Bước 2: PCR**

- Thực hiện phản ứng PCR với sự tham gia của các thành phần sau:

PCR buffer 10X	5 µl
ADN	100 ng
Forward primer (10pM)	1 µl
Reverse primer (10pM)	1 µl
Taq-polymerase	0.5 U
H <sub>2</sub> O	đủ thể tích 50 µl

## **Bước 3: Cắt với enzym giới hạn**

Thực hiện phản ứng cắt bằng enzym giới hạn với các thành phần sau:

Đệm phù hợp với enzym giới hạn	3 µl
Sản phẩm PCR	20-25 µl
Enzym giới hạn	2 µl
H <sub>2</sub> O	đủ thể tích 30 µl

## **Bước 4: Điện di kiểm tra sản phẩm cắt**

Sử dụng 20-25 µl sản phẩm cắt cùng với 10 µl sản phẩm PCR và thang ADN chuẩn (marker) điện di trên gel agarose. Tùy thuộc kích thước đoạn gen cần quan sát mà chọn nồng độ gel agarose và thời gian chạy điện di thích hợp. Sau đó kết quả được đọc và phân tích thông qua hình ảnh soi trên đèn UV.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Sản phẩm PCR phải có băng đặc hiệu, đúng kích thước theo tính toán lý thuyết.

- Nếu sản phẩm cắt có 2 băng ADN trở lên tức là có vị trí nhận biết của enzym giới hạn (không có đa hình)

- Nếu sản phẩm cắt vẫn còn nguyên sản phẩm PCR tức là mất vị trí nhận biết của enzym giới hạn (có đa hình).

Phương pháp phát hiện các đa hình gen đặc trưng ở người bệnh hemophilia sau đó sử dụng các đa hình này để tìm kiếm cá thể mang gen trong gia đình là phương pháp đã được thực hiện từ lâu trên thế giới. Ưu điểm của phương pháp là kỹ thuật thực hiện đơn giản, không cần phải đầu tư nhiều trang thiết bị đắt tiền và chi phí để thực hiện xét nghiệm thấp.

Tuy nhiên phương pháp này yêu cầu phải lấy mẫu của nhiều thành viên trong gia đình đồng thời phải biết được các đa hình có tần suất cao ở Việt nam.

Cách xác định tình trạng mang gen của một người nữ trong gia đình có người bệnh hemophilia:

- Lấy mẫu: bố mẹ của người nữ cần xác định, người bệnh là anh trai hoặc em trai hoặc một người nam giới liên quan khác như bác ruột về phía mẹ.

- Cách phân tích:

+ Phân tích người bệnh để xác định được allen liên quan đến gen yếu tố VIII đột biến.

+ Phân tích bố, mẹ để xác định di truyền của các allen (allen bình thường và allen liên quan đến gen đột biến) cho các con. Trong đó người mẹ bắt buộc phải là thể dị hợp tử với đa hình phân tích. Phân tích mẫu của bố sẽ xác định được allen truyền cho con gái.

Kết hợp các kết quả phân tích trên sẽ xác định được người phụ nữ mang gen trong gia đình.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

### SAI SÓT

### XỬ TRÍ

Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.	Thực hiện theo đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
Thao tác pipet không chính xác.	Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.	Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. D J Bowen. *Haemophilia A and Haemophilia B: molecular insights*. J Clin Pathol: Mol Pathol 2002; 55:1-8
2. Keeney S et al. *The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization Haemophilia Genetics Laboratory Network*. Haemophilia 2005; 11: 387-97

**XÉT NGHIỆM FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)**  
**XÁC ĐỊNH NHIỄM SẮC THỂ X, Y**  
DETECTION OF X,Y CHROMOSOMES BY FLUORESCENCE *IN SITU*  
HYBRIDIZATION

## **I. NGUYÊN LÝ**

Nguyên lý chung: xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

Dựa trên đặc tính này, kỹ thuật FISH xác định nhiễm sắc thể X, Y sử dụng các probe là các đoạn ADN có gắn huỳnh quang và có trình tự nucleotide bổ sung đặc hiệu cho các đoạn ADN trên nhiễm sắc thể X, Y để lai ghép với các đoạn ADN tương đồng trên nhiễm sắc thể X hoặc Y. Từ đó, chúng ta có thể phát hiện các nhiễm sắc thể này một cách chính xác.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này được chỉ định khi cần xác định giới tính hoặc xác định mọc mảnh ghép sau khi ghép khác giới tính.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

Kỹ thuật viên xét nghiệm Di truyền – Sinh học phân tử đã được đào tạo.

### **2. Phương tiện, hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Thiết bị: bể ổn nhiệt, máy lai, máy ly tâm, máy trộn mẫu, và kính hiển vi huỳnh quang;

- Dụng cụ: kẹp kim loại, 10 cồng Coplin, nhiệt kế, coverslip 22x22, pipetman 100 µl, 10 µl, xi măng cao su, ống đong, giấy thấm.

#### **2.2. Hóa chất**

- X/Y ADN Probe Kit Probe , DAPI/antifade;
- Dung dịch 10% formamide: 5 ml formamide + 30 ml H<sub>2</sub>O + 15 ml 20X SSC
- Dung dịch 2X SSC;
- Dung dịch rửa 0,1% NP40: 2X SSC + 0,1% NP40;
- Dung dịch rửa 0,3% NP-40: 0,4X SSC + 0,3% NP40;

- Cồn 70°, 85°, 100°.

### **3. Bệnh phẩm**

2ml máu ngoại vi hoặc dịch hút tủy xương được đựng trong bơm tiêm có tráng chất chống đông heparin 5.000 đơn vị/ml.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Xem bài “Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, với kỹ thuật dual colour FISH, chúng ta sẽ thấy 3 màu:

- + Màu xanh da trời đậm: màu nhân tế bào;
- + Màu xanh lá cây: màu của probe gắn trên nhiễm sắc thể X;
- + Màu đỏ: màu của probe gắn trên nhiễm sắc thể Y.

#### **Nhận định kết quả**

- + Một tín hiệu đỏ, một tín hiệu xanh: XY;
- + Hai tín hiệu đỏ: XX.

### **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

Xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Tài liệu hướng dẫn sử dụng của công ty Vysis.
2. Lynda J. Cambell, ( 2011), “Cancer cytogenetic”, Human Press.

**XÉT NGHIỆM FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)**  
**XÁC ĐỊNH NHIỄM SẮC THỂ Ph1(BCR/ABL)**  
DETECTION OF PH1(BCR/ABL) CHROMOSOME BY FLUORESCENCE *IN*  
*SITU* HYBRIDIZATION

## **I. NGUYÊN LÝ**

Nguyên lý chung: xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

Dựa trên đặc tính này, kỹ thuật FISH xác định nhiễm sắc thể Ph1 (BCR/ABL) sử dụng các probe là đoạn ADN có gắn huỳnh quang và có trình tự nucleotide bổ sung đặc hiệu với đoạn ADN của gen BCR trên nhiễm sắc thể số 22 và gen ABL trên nhiễm sắc thể số 9. Các probe này lai ghép với các đoạn ADN tương đồng trên nhiễm sắc thể. Từ đó, chúng ta có thể phát hiện bệnh lý một cách chính xác và nhanh chóng.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này chỉ định cho người bệnh trong trường hợp nghi ngờ có nhiễm sắc thể Ph.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

Kỹ thuật viên xét nghiệm Di truyền-Sinh học phân tử đã được đào tạo.

### **2. Phương tiện - Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Thiết bị: bể ổn nhiệt, máy lai, máy ly tâm, máy trộn mẫu, và kính hiển vi huỳnh quang;

- Dụng cụ: cặp kim loại, 10 cồng Coplin, nhiệt kế, coverslip 22x22, pipetman 100 µl, 10 µl, xi măng cao su, ống đong, giấy thấm.

#### **2.2. Hóa chất**

- Probe BCR/ABL dual colour, dual fusion translocation probe, DAPI / antifade;

- Dung dịch 10% formamide: 5 ml formamide + 30 ml H<sub>2</sub>O + 15 ml 20X SSC

- Dung dịch 2X SSC

- Dung dịch rửa 0,1% NP40: 2X SSC + 0,1% NP40
- Dung dịch rửa 0,3% NP-40: 0,4X SSC + 0,3% NP40
- Cồn 70°, 85°, 100°

### **3. Bệnh phẩm**

2ml máu ngoại vi hoặc dịch hút tủy xương được đựng trong bơm tiêm có tráng chất chống đông heparin 5.000 đơn vị/ml.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Xem bài “Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, với kỹ thuật dual colour FISH, chúng ta có thể thấy 3 màu.

- + Màu xanh da trời đậm: màu nhân tế bào
- + Màu xanh: màu của probe BCR (trên nhiễm sắc thể số 22)
- + Màu đỏ: màu của probe ABL (trên nhiễm sắc thể số 9)
- +Màu da cam (đỏ/xanh): màu của fusion BCR/ABL

#### **Nhận định kết quả:**

- + Không có nhiễm sắc thể Ph1: hai tín hiệu đỏ và hai tín hiệu xanh.
- + Có nhiễm sắc thể Ph1 (có chuyển đoạn BCR/ABL): Một tín hiệu đỏ, một tín hiệu xanh, hai tín hiệu màu da cam.

### **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

Xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Tài liệu hướng dẫn sử dụng của công ty Vysis.
2. Lynda J. Cambell, ( 2011), “Cancer cytogenetic”, Human Press.

**XÉT NGHIỆM FISH (Fluorescence in situ hybridization) CHẨN ĐOÁN  
CHUYỂN ĐOẠN NHIỄM SẮC THỂ 4;11  
DETECTION OF CHROMOSOME TRANSLOCATION (4;11) BY  
FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Nguyên lý chung: xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

Dựa trên đặc tính này, kỹ thuật FISH xác định t(4;11) sử dụng các probe là đoạn ADN có gắn huỳnh quang và có trình tự nucleotide bổ sung đặc hiệu với đoạn ADN của gen AF4 trên nhiễm sắc thể số 4 và gen MLL trên nhiễm sắc thể số 11. Các probe này lai ghép với các đoạn ADN tương đồng trên nhiễm sắc thể. Từ đó, chúng ta có thể phát hiện bệnh lý một cách chính xác và nhanh chóng.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này chỉ định cho người bệnh trong trường hợp nghi ngờ có chuyển đoạn t(4;11).

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV . CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện:**

Kỹ thuật viên xét nghiệm Di truyền-Sinh học phân tử đã được đào tạo.

### **2. Phương tiện, hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Thiết bị: bể ổn nhiệt, máy lai, máy ly tâm, máy trộn mẫu, và kính hiển vi huỳnh quang.

- Dụng cụ: kẹp kim loại, 10 cồng Coplin, nhiệt kế, coverslip 22x22, pipetman 100  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, xi măng cao su, ống đong, giấy thấm.

#### **2.2. Hóa chất**

- AF4/MLL Dual Color, Dual fusion translocation probe, DAPI / antifade;

- Dung dịch 10% formamide: 5 ml formamide + 30 ml H<sub>2</sub>O + 15 ml 20X SSC;

- Dung dịch 2X SSC;

- Dung dịch rửa 0,1% NP40: 2X SSC + 0,1% NP40;

- Dung dịch rửa 0,3% NP-40: 0,4X SSC + 0,3% NP40;
- Cồn 70°, 85°, 100°.

### **3. Bệnh phẩm**

2ml máu ngoại vi hoặc dịch hút tủy xương được đựng trong bom tiêm có tráng chất chống đông heparin 5.000 đơn vị/ml.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, với kỹ thuật FISH hai màu, chúng ta sẽ thấy 3 màu.

- + Màu xanh da trời đậm: màu nhân tế bào;
- + Màu xanh: màu của probe;
- + Màu đỏ: màu của probe.

#### **Nhận định kết quả:**

- + Không có chuyển đoạn t(4;11): hai tín hiệu đỏ và hai tín hiệu xanh;
- + Có chuyển đoạn t(4;11): một tín hiệu đỏ, một tín hiệu xanh, hai tín hiệu màu da cam.

### **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

Xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Tài liệu hướng dẫn sử dụng của công ty Vysis.
2. Lynda J. Cambell, ( 2011), “Cancer cytogenetic”, Human Press.



**XÉT NGHIỆM FISH (Fluorescence in situ hybridization) CHẨN ĐOÁN  
CHUYỂN ĐOẠN NHIỄM SẮC THỂ 1;19  
DETECTION OF CHROMOSOME TRANSLOCATION (1;19) BY  
FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION**

**I. NGUYÊN LÝ**

Nguyên lý chung: xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

Dựa trên đặc tính này, kỹ thuật FISH xác định t(1;19) sử dụng các probe là đoạn ADN có gắn huỳnh quang và có trình tự nucleotide bổ sung đặc hiệu với đoạn ADN của gen PBX1 trên nhiễm sắc thể số 1 và gen TCF3 trên nhiễm sắc thể số 19. Các probe này lai ghép với các đoạn ADN tương đồng trên nhiễm sắc thể. Từ đó, chúng ta có thể phát hiện bệnh lý một cách chính xác và nhanh chóng.

**II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này chỉ định cho người bệnh trong trường hợp nghi ngờ có chuyển đoạn t(1;19).

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện**

Kỹ thuật viên xét nghiệm Di truyền-Sinh học phân tử đã được đào tạo.

**2. Phương tiện - Hóa chất**

**2.1. Phương tiện**

- Thiết bị: bể ổn nhiệt, máy lai, máy ly tâm, máy trộn mẫu, và kính hiển vi huỳnh quang.

- Dụng cụ: kẹp kim loại, 10 cồng Coplin, nhiệt kế, coverslip 22x22, pipetman 100 µl, 10 µl, xi măng cao su, ống đong, giấy thấm.

**2.2. Hóa chất**

- LSI TCF3/PBX1 Dual Color, Dual fusion translocation probe, DAPI/antifade;

- Dung dịch 10% formamide: 5 ml formamide + 30 ml H<sub>2</sub>O + 15 ml 20X SSC

- Dung dịch 2X SSC;

- Dung dịch rửa 0,1% NP40: 2X SSC + 0,1% NP40;
- Dung dịch rửa 0,3% NP-40: 0,4X SSC + 0,3% NP40;
- Cồn 70°, 85°, 100°

### **3. Bệnh phẩm**

2ml máu ngoại vi hoặc dịch hút tủy xương được đựng trong bơm tiêm có tráng chất chống đông heparin 5.000 đơn vị/ml.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, với kỹ thuật FISH hai màu, chúng ta sẽ thấy 3 màu.

- + Màu xanh da trời đậm: màu nhân tế bào;
- + Màu xanh: màu của probe;
- + Màu đỏ: màu của probe.

#### **Nhận định kết quả**

- + Không có chuyển đoạn t(1;19): hai tín hiệu đỏ và hai tín hiệu xanh;
- + Có chuyển đoạn t(1;19): một tín hiệu đỏ, một tín hiệu xanh, hai tín hiệu màu da cam.

### **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

Xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Tài liệu hướng dẫn sử dụng của công ty Vysis.
2. Lynda J. Cambell, ( 2011), “Cancer cytogenetic”, Human Press.

**XÉT NGHIỆM FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) XÁC ĐỊNH  
CHUYỂN ĐOẠN NHIỄM SẮC THỂ 8 VÀ 21  
DETECTION OF CHROMOSOME TRANSLOCATION (8;21) BY  
FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Nguyên lý chung: xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

Dựa trên đặc tính này, kỹ thuật FISH xác định t(8;21) sử dụng các probe là đoạn ADN có gắn huỳnh quang và có trình tự nucleotide bổ sung đặc hiệu với đoạn ADN của gen AML1 trên nhiễm sắc thể số 8 và gen ETO trên nhiễm sắc thể số 21. Các probe này lai ghép với các đoạn ADN tương đồng trên nhiễm sắc thể. Từ đó, chúng ta có thể phát hiện bệnh lý một cách chính xác và nhanh chóng.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này chỉ định cho người bệnh trong trường hợp nghi ngờ có chuyển đoạn t(8;21).

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

Kỹ thuật viên xét nghiệm di truyền-sinh học phân tử đã được đào tạo.

### **2. Dụng cụ - Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Thiết bị: bể ổn nhiệt, máy lai, máy ly tâm, máy trộn mẫu, và kính hiển vi huỳnh quang.

- Dụng cụ: kẹp kim loại, 10 cồng Coplin, nhiệt kế, coverslip 22x22, pipetman 100 µl , 10 µl , xi măng cao su, ống đong, giấy thấm.

#### **2.2. Hóa chất**

- LSI AML1/ETO Dual color, Dual fusion translocation probe, DAPI / antifade.

- Dung dịch 10% formamide: 5 ml formamide + 30 ml H<sub>2</sub>O + 15 ml 20X SSC

- Dung dịch 2X SSC
- Dung dịch rửa 0,1% NP40: 2X SSC + 0,1% NP40
- Dung dịch rửa 0,3% NP-40: 0,4X SSC + 0,3% NP40
- Cồn 70°, 85°, 100°

### **3. Bệnh phẩm**

2ml máu ngoại vi hoặc dịch hút tủy xương được đựng trong bơm tiêm có tráng chất chống đông heparin 5.000 đơn vị/ml.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, với kỹ thuật FISH hai màu, chúng ta sẽ thấy 3 màu.

- + Màu xanh da trời đậm: màu nhân tế bào;
- + Màu xanh: màu của probe;
- + Màu đỏ: màu của probe;

#### **Nhận định kết quả**

+ Có chuyển đoạn của nhiễm sắc thể 8 và 21 (có tổ hợp gen lai AML1/ETO): Một tín hiệu đỏ, một tín hiệu xanh, 2 tín hiệu màu da cam.

+ Bình thường (không có tổ hợp gen lai AML1/ETO): Hai tín hiệu đỏ và hai tín hiệu xanh.

### **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

Xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Tài liệu hướng dẫn sử dụng của công ty Vysis.
2. Lynda J. Cambell, ( 2011), “Cancer cytogenetic”, Human Press.

**XÉT NGHIỆM FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) XÁC ĐỊNH  
CHUYỂN ĐOẠN NHIỄM SẮC THỂ 15 VÀ 17  
DETECTION OF CHROMOSOME TRANSLOCATION (15;17) BY  
FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Nguyên lý chung: xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

Dựa trên đặc tính này, kỹ thuật FISH xác định t(15;17) sử dụng các probe là đoạn ADN có gắn huỳnh quang và có trình tự nucleotide bổ sung đặc hiệu với đoạn ADN của gen PML trên nhiễm sắc thể số 15 và gen RARA trên nhiễm sắc thể số 17. Các probe này lai ghép với các đoạn ADN tương đồng trên nhiễm sắc thể. Từ đó, chúng ta có thể phát hiện bệnh lý một cách chính xác và nhanh chóng.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này chỉ định cho người bệnh trong trường hợp nghi ngờ có chuyển đoạn t(4;11).

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên xét nghiệm Di truyền-Sinh học phân tử đã được đào tạo.

### **2. Phương tiện - Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Thiết bị: bể ổn nhiệt, máy lai, máy ly tâm, máy trộn mẫu, và kính hiển vi huỳnh quang.

- Dụng cụ: kẹp kim loại, 10 cốc Coplin, nhiệt kế, coverslip 22x22, pipetman 100  $\mu$ l , 10  $\mu$ l , xi măng cao su, ống đong, giấy thấm.

#### **2.2. Hóa chất**

- LSI PML/RARA Dual Color, Dual fusion translocation probe, DAPI / antifade.

- Dung dịch 10% formamide: 5 ml formamide + 30 ml H<sub>2</sub>O + 15 ml 20X SSC

- Dung dịch 2X SSC

- Dung dịch rửa 0,1% NP40: 2X SSC + 0,1% NP40
- Dung dịch rửa 0,3% NP-40: 0,4X SSC + 0,3% NP40
- Cồn 70°, 85°, 100°

### **3. Bệnh phẩm**

2ml máu ngoại vi hoặc dịch hút tủy xương được đựng trong bơm tiêm có tráng chất chống đông heparin 5.000 đơn vị/ml.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, với kỹ thuật FISH hai màu, chúng ta sẽ thấy 3 màu.

- + Màu xanh da trời đậm: màu nhân tế bào
- + Màu xanh: màu của probe
- + Màu đỏ: màu của probe

#### **Nhận định kết quả:**

+ Có chuyển đoạn của nhiễm sắc thể 15 và 17 (có tổ hợp gen lai PML/RARA): Một tín hiệu đỏ, một tín hiệu xanh, 2 tín hiệu màu da cam.

+ Bình thường (không có tổ hợp gen lai PML/RARA): Hai tín hiệu đỏ và hai tín hiệu xanh.

### **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

Xem bài “ Quy trình xét nghiệm gen bằng kỹ thuật FISH”.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Tài liệu hướng dẫn sử dụng của công ty Vysis.
2. Lynda J. Cambell, ( 2011), “Cancer cytogenetic”, Human Press.

# TÁCH CHIẾT ADN TỪ MÁU NGOẠI VI/MÁU CUÔNG RÓN

## DNA ISOLATION FROM PERIPHERAL BLOOD CELLS

### I. NGUYÊN LÝ

Các tế bào có nhân đều chứa ADN - vật chất di truyền của toàn bộ cơ thể. ADN nằm trên nhiễm sắc thể bên trong nhân tế bào. Để tách được ADN người ta thường sử dụng các chất tẩy mạnh để phá màng tế bào và màng nhân, kết hợp với sử dụng các chất biến tính mạnh để loại bỏ các protein sau đó sử dụng cồn 96° kết hợp với điều kiện nhiệt độ thấp để thu được ADN một cách tinh sạch và nguyên vẹn.

### II. CHỈ ĐỊNH

Sử dụng cho tất cả người bệnh có chỉ định làm xét nghiệm PCR.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

- Kỹ thuật viên xét nghiệm Sinh học phân tử đã được đào tạo.

#### 2. Phương tiện - Hóa chất

##### 2.1. Phương tiện

- Buồng vô trùng (biology cabinet);
- Máy ly tâm tốc độ cao (tốc độ tối đa 14.000 vòng/phút);
- Máy vortex;
- Các loại pipet 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l;
- Đầu côn có màng lọc;
- Ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Ống PCR 0,2 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Tủ lạnh 4-8<sup>0</sup>C, tủ âm sâu -20<sup>0</sup>C;
- Găng tay.

##### 2.2. Hóa chất

Sử dụng kit tách ADN thương mại. Nếu tách thủ công thì sử dụng các sinh phẩm cần thiết để tách chiết ADN như proteinase K, đệm ly giải tế bào, phenol/chloroform, cồn tuyệt đối.

#### 3. Bệnh phẩm

2 ml máu ngoại vi/máu cuông rón chống đông bằng EDTA.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Lấy bệnh phẩm

2 ml máu ngoại vi/máu cuống rốn chống đông bằng EDTA.

### 2. Tiến hành kỹ thuật

Phương pháp tách chiết ADN cơ bản bao gồm các giai đoạn chính sau:

#### *Phá màng tế bào và màng nhân:*

Bệnh phẩm được ủ trong một dung dịch gồm chất tẩy mạnh (như SDS, sarcosyl) và enzym phân hủy protein (proteinaza K). Mục tiêu của bước ủ này là để phá màng tế bào và màng nhân đồng thời để ức chế hoạt động của các enzym ADNaza nội bào và tách protein ra khỏi các phân tử ADN.

#### *Loại bỏ các protein:*

Sử dụng dung dịch phenol/chloroform để biến tính protein, làm cho protein tạo thành một lớp tủa rõ rệt sau khi ly tâm, dễ dàng loại bỏ khỏi hỗn dịch.

#### *Kết tủa ADN:*

Sử dụng cồn để tủa ADN trong điều kiện lạnh và thu nhận lại ADN bằng ly tâm. ADN cần phải hòa lại trong nước khử enzym nucleaza.

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Sử dụng 5µl ADN thu được để điện di kiểm tra trên gel agarose 0,5 - 0,8%, đồng thời đo độ sạch bằng quang phổ (A260/A280). Chất lượng ADN tốt nếu chỉ xuất hiện một băng có kích thước lớn >10 kb và tinh sạch nếu A260/A280 trong khoảng 1,8 - 2,0.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

### SAI SÓT

- Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.
- Thao tác pipet không chính xác.
- Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.

### XỬ TRÍ

- Thực hiện theo đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
- Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất
- Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO



1. Hồ Huỳnh Thủy Dương (1997). Các phương pháp tách chiết axit nucleic. Sinh học phân tử. NXB Giáo Dục, trang 124-125.
2. A.Rolfs et al (1992). PCR: Clinical Diagnosis and Research. Springer Verlag, Berlin.

# TÁCH CHIẾT ARN TỪ MÁU NGOẠI VI/TỦY XƯƠNG

## RNA ISOLATION FROM PERIPHERAL BLOOD AND BONE MARROW SAMPLES

### I. NGUYÊN LÝ

ARN thông tin quy định các thông tin về axit amin và nằm trong tế bào chất của tế bào. Để tách được ARN người ta thường sử dụng các chất tẩy mạnh để phá màng tế bào, kết hợp với sử dụng các chất biến tính mạnh để loại bỏ các protein sau đó sử dụng cồn 96<sup>0</sup> kết hợp với điều kiện nhiệt độ thấp để thu được ARN một cách tinh sạch và nguyên vẹn.

### II. CHỈ ĐỊNH

Sử dụng cho tất cả người bệnh có chỉ định làm xét nghiệm RT-PCR/qRT-PCR.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

- Kỹ thuật viên xét nghiệm sinh học phân tử đã được đào tạo;
- Tất cả các mẫu bệnh phẩm có chỉ định xét nghiệm RT-PCR hoặc qRT-PCR.

#### 2. Phương tiện - Hóa chất

##### 2.1. Phương tiện

- Tủ hút hóa chất (chemical fume hood);
- Buồng vô trùng (biology cabinet);
- Máy ly tâm tốc độ cao (tốc độ tối đa 14.000 vòng/phút);
- Máy vortex;
- Các loại pipet 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l;
- Đầu côn có màng lọc;
- Ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Ống PCR 0,2 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Tủ lạnh 4-8<sup>0</sup>C, tủ âm sâu -20<sup>0</sup>C;
- Găng tay.

##### 2.2. Hóa chất

Sử dụng kit tách ARN thương mại. Nếu tách thủ công thì sử dụng các sinh phẩm cần thiết để tách chiết ARN như glycogen, proteinase K, đệm ly giải tế bào, phenol/chloroform, cồn tuyệt đối.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi hoặc dịch tủy xương chống đông bằng EDTA.

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

Phương pháp tách chiết ARN cơ bản bao gồm các giai đoạn chính sau:

#### **2.1. Loại bỏ các tế bào hồng cầu**

ARN nằm ở tế bào chất bên trong các tế bào có nhân. Vì vậy thông thường bệnh phẩm sẽ được xử lý trước để loại bỏ bớt các tế bào hồng cầu. Để loại bỏ các tế bào hồng cầu có thể sử dụng dung dịch Ficoll (có tỷ trọng 1.077) để phân lớp các tế bào theo tỷ trọng hoặc sử dụng một số dung dịch ly giải hồng cầu (như dung dịch gồm 1M MgCl<sub>2</sub>, 5M NaCl, 1M Tris-HCl). Sau khi loại bỏ bớt các tế bào hồng cầu, dung dịch còn lại chứa chủ yếu các tế bào có nhân sẽ được sử dụng để tách ARN.

#### **2.2. Phá màng tế bào và màng nhân:**

Các tế bào có nhân được ủ trong một dung dịch gồm chất tẩy mạnh (như SDS, sarcosyl), một chất gây biến tính protein mạnh như (guanidinium thyocyanat), một chất khử (2-mercaptoethanol). Mục tiêu của bước ủ này là để phá màng tế bào đồng thời để ức chế hoạt động của các enzym phân hủy ARN nội bào (ARNaza) và tách các protein lên kết khỏi phân tử ARN.

#### **2.3. Loại bỏ các protein:**

Sử dụng dung dịch phenol/chloroform để biến tính protein, làm cho protein tạo thành một lớp tủa rõ rệt sau khi ly tâm, dễ dàng loại bỏ khỏi hỗn dịch

#### **2.4. Kết tủa ARN:**

Sử dụng cồn tuyệt đối để tủa ARN trong điều kiện đông lạnh và thu nhận lại ARN bằng ly tâm. ARN cần phải hòa lại trong nước khử enzym nucleaza.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Sử dụng 5 µl ARN thu được để điện di kiểm tra trên gel agarose 0,5 - 0,8%, đồng thời kiểm tra độ sạch bằng đo quang phổ (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>). Chất lượng ARN tốt nếu xuất hiện ba băng điện di tương ứng với 3 loại ARN 28S, 18S và 5,8S; tinh sạch nếu A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> trong khoảng 1,8 – 2,0.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

## **SAI SÓT**

- Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.
- Thao tác pipet không chính xác.
- Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.

## **XỬ TRÍ**

- Thực hiện theo đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
- Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất
- Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Hồ Huỳnh Thủy Dương (1997). Các phương pháp tách chiết axit nucleic. Sinh học phân tử. NXB Giáo Dục, trang 124-125.
2. A.Rolfs et al (1992). PCR: Clinical Diagnosis and Research. Springer Verlag, Berlin.

# **PCR CHẨN ĐOÁN BỆNH ALPHA THALASSEMIA (05 ĐỘT BIẾN)**

## **PCR DETECTION OF ALPHA THALASSEMIA GENE MUTATION (5 MUTATIONS)**

### **I. NGUYÊN LÝ**

Phản ứng tổng hợp chuỗi (PCR) là phản ứng cho phép nhân bản chính xác một trình tự ADN quan tâm lên hàng triệu lần. Sử dụng phương pháp PCR thông thường với một cặp mồi đặc trưng chỉ phát hiện được một đột biến. Để phát hiện nhiều hơn một đột biến sẽ phải làm nhiều xét nghiệm PCR. Có rất nhiều loại đột biến gây bệnh anpha Thalassemia. Trong trường hợp này sử dụng kỹ thuật Multiplex PCR là giải pháp tối ưu. Đây là phương pháp sử dụng nhiều cặp mồi trong cùng một phản ứng PCR. Như vậy chỉ cần một phản ứng Multiplex PCR chúng ta đã có thể phát hiện được nhiều đột biến cùng một lúc.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Sử dụng cho tất cả người bệnh có chẩn đoán Alpha-Thalassemia.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

Kỹ thuật viên xét nghiệm sinh học phân tử đã được đào tạo.

#### **2. Phương tiện - Hóa chất**

##### **2.1. Phương tiện**

- Máy PCR;
- Hệ thống máy điện di, hệ thống đèn cực tím soi gel, hệ thống máy chụp ảnh;
- Bùng vô trùng (biology cabinet);
- Máy ly tâm tốc độ cao (tốc độ tối đa 14.000 vòng/phút);
- Máy vortex;
- Các loại pipet 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl;
- Đầu côn có màng lọc;
- Ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Ống PCR 0,2 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Tủ lạnh 4-8<sup>0</sup>C, tủ âm sâu -20<sup>0</sup>C;
- Găng tay.

## 2.2. Hóa chất

- Kit tách ADN thương mại hoặc các hóa chất cần thiết cho tách chiết thủ công ADN (proteinase K, đệm ly giải tế bào, phenol/chloroform, cồn tuyệt đối).

- Hóa chất chạy PCR gồm: Đệm, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, enzym kéo dài chuỗi, nước khử ion vô trùng.

- Các môi đặc hiệu gồm 12 môi để xác định đồng thời 5 đột biến mất đoạn; đồng thời cho biết tính đồng hợp, dị hợp tử đột biến và 1 cặp môi sử dụng làm chứng nội kiểm (Internal control). Theo bảng sau:

Môi	Trình tự
SEA CF	5' - CTC TGT GTT CTC CAG TAT TGG AGG GAA GGA G - 3'
SEA NR	5' - TGA AGA GCC TGC AGG ACC AGG TCA GTG ACC G - 3'
SEA MR	5' - ATA TAT GGG TCT GGA AGT GTA TCC CTC CCA - 3'
FIL MF	5' - AAG AGA ATA AAC CAC CCA ATT TTT AAA TGG GCA - 3'
FIL MR	5' - GAG ATA ATA ACC TTT ATC TGC CAC ATG TAG CAA - 3'
THAI MF	5' - CAC GAG TAA AAC ATC AAG TAC ACT CCA GCC - 3'
THAI MR	5' - TGG ATC TGC ACC TCT TGG GTA GGT TCT CTA CC - 3'
α2/3.7 F	5' - CCC CTC GCC AAG TCC ACC C - 3'
3.7/20.5R	5' - AAA GCA CTC TGA GGG TCC AGC G - 3'
α2 R	5' - AGA CCA GGA AGG GCC GGT G - 3'
4.2 R	5' - CCC GTT GGA TCT TCT CAT TTC CC - 3'
4.2 F	5' - GGT TTA CCC ATG TGG TGC CTC - 3'

- Thạch agarose, đệm tra mẫu, thang chuẩn ADN.

- Thuốc nhuộm ethidium bromide.

## 3. Bệnh phẩm

2 ml máu ngoại vi đựng trong ống chống đông EDTA.

## 4. Phiếu xét nghiệm

Có đầy đủ các thông tin cần thiết về người bệnh, về chẩn đoán và yêu cầu xét nghiệm.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Lấy bệnh phẩm

2 ml máu ngoại vi chống đông bằng EDTA.

### 2. Tiến hành kỹ thuật

#### 2.1. Tách chiết ADN

Xem bài “ Tách chiết ADN từ máu ngoại vi”

## 2.2. Thực hiện phản ứng Multiplex PCR phát hiện 5 đột biến bệnh alpha thalassaemia.

STT	Sinh phẩm	Thành phần (µl)/1 púr
1	H <sub>2</sub> O	5,5
2	2X GoTaq Green MM	12,5
3	DMSO	1,0
4	Hỗn hợp mồi	5,0
5	DNA	1,0
	Tổng thể tích	25,0

- Ly tâm nhẹ để các thành phần lắng xuống đáy ống hoàn toàn
- Đặt vào máy PCR
- Chọn chương trình
- Bấm start để máy chạy

## 2.3 Điện di sản phẩm PCR

### 2.3.1. Chuẩn bị gel agarose

- Cân 1 g agarose cho vào bình thủy tinh chịu nhiệt.
- Thêm 100 ml đệm điện di (TAE 1X /TBE 1X...) vào bình, lắc đều.
- Đun mỗi lần 1 phút trong lò vi sóng đến khi agarose tan hoàn toàn.
- Để ấm đến 60<sup>0</sup> rồi đổ vào khay đã cắm lược.
- Để nhiệt độ phòng 30 phút để thạch đông rồi mới rút lược ra.

### 2.3.2. Điện di

- Lấy 5 µl sản phẩm PCR + 1 µl đệm tra mẫu + 4 µl dH<sub>2</sub>O
- Trộn đều và nhỏ vào các giếng theo thứ tự
- Nhỏ 3 µl marker ADN vào giếng kế tiếp
- Đặt bản gel vào máy điện di
- Đổ đệm điện di ngập bản gel và chạy ở 100 V trong 20 phút
- Nhuộm bản gel với dung dịch ethidium bromide trong 5 phút

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Kết quả dương tính nếu nhìn thấy vạch sáng dưới đèn UV, sản phẩm có kích thước phù hợp theo lý thuyết.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

### SAI SÓT

- Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.

### XỬ TRÍ

- Thực hiện theo đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.

- Thao tác pipet không chính xác.
- Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.
- Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất
- Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Chong *et al.*, Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of  $\alpha$ -thalassemia. *Blood* 2000;95:360–362.
2. Old JM DNA-based diagnosis of the hemoglobin disorders. In: Steinberg MH, Forget PG, Higgs DR, Nagel RL (eds) *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*. Cambridge University Press, Cambridge, UK(2001). pp 941-57.



# KỸ THUẬT NESTED RT-PCR PHÁT HIỆN GEN LAI BCR/ABL

## NESTED RT-PCR DETECTION OF BCR/ABL FUSION GENE

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật “nested” RT-PCR dựa trên nguyên lý chung của kỹ thuật PCR: sử dụng hoạt tính tổng hợp ADN của enzym Taq-polymerase; cùng với các vật liệu cơ bản gồm các bazơ nitơ tự do (dNTPs), hai đoạn mồi: mồi xuôi (forward primer) và mồi ngược (reverse primer) để nhân bản đoạn gen quan tâm. Do đối tượng cần khuếch đại của kỹ thuật RT-PCR là ARN thông tin vì vậy phản ứng “nested” RT-PCR sẽ gồm có 3 bước cơ bản như sau:

**Bước 1 - RT (reverse transcription - phiên mã ngược):** là bước chuyển đổi ARN sợi khuôn thành sợi ADN bổ trợ (ADNc), được thực hiện bởi enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase).

**Bước 2 - PCR vòng 1 :** sử dụng sản phẩm của bước 1 làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR với sự tham gia của cặp mồi vòng ngoài (external primer) để nhân bản vùng gen có chứa trình tự gen đích BCR-ABL.

**Bước 3 - PCR vòng 2:** sản phẩm PCR vòng 1 được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR lần 2 với sự tham gia của cặp mồi vòng trong (internal primer) để nhân bản chính xác đoạn gen đích.

### II. CHỈ ĐỊNH

Sử dụng cho tất cả người bệnh có chẩn đoán CML/ALL/CLL.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Kỹ thuật viên xét nghiệm sinh học phân tử đã được đào tạo.

#### 2. Phương tiện - Hóa chất

##### 2.1. Phương tiện

- Máy PCR;
- Hệ thống máy điện di, hệ thống đèn cực tím soi gel, hệ thống máy chụp ảnh;
- Tủ hút hóa chất (chemical fume hood);
- Buồng vô trùng (biology cabinet);
- Máy ly tâm tốc độ cao (tốc độ tối đa 14.000 vòng/phút);

- Máy vortex;
- Các loại pipet 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l;
- Đầu côn có màng lọc;
- Ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Ống PCR 0,2 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Tủ lạnh 4-8<sup>0</sup>C, tủ âm sâu -20<sup>0</sup>C;
- Găng tay.

## **2.2. Hóa chất**

- Dung dịch Ficoll hoặc dung dịch ly giải tế bào hồng cầu gồm các muối MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl, NaCl.

- Sử dụng kit tách ARN thương mại. Nếu tách thủ công thì sử dụng các sinh phẩm cần thiết để tách chiết ARN như glycogen, proteinase K, đệm ly giải tế bào, phenol/chloroform, cồn tuyệt đối.

- Hóa chất chạy nested RT-PCR: kit tổng hợp ADNc, kit RT-PCR onestep, PCR supermix. Nếu không sử dụng kit thương mại thì sử dụng các thành phần riêng lẻ như: Đệm, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, enzym phiên mã ngược, enzym kéo dài chuỗi, mồi oligodT hoặc mồi ngẫu nhiên (random primer), các cặp mồi đặc hiệu, nước khử ion vô trùng.

- Hóa chất điện di: thạch agarose, đệm tra mẫu, thang chuẩn ADN, thuốc nhuộm ethidium bromide.

## **3. Bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi đựng trong ống chống đông EDTA.

## **4. Phiếu xét nghiệm**

Có đầy đủ các thông tin cần thiết về người bệnh, về chẩn đoán và yêu cầu xét nghiệm.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi hoặc dịch tủy xương chống đông bằng EDTA

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

#### ***Bước 1: Tách chiết ARN:***

Xem bài “Tách chiết ARN từ máu ngoại vi/tủy xương

#### ***Bước 2: Thực hiện phản ứng RT-PCR vòng 1(thao tác ở 4<sup>o</sup>C)***

- Đưa các thành phần cần thiết của phản ứng ra nhiệt độ phòng 10 phút để rã đông hoàn toàn.

- Trộn lẫn các thành phần sau vào một ống eppendorf 0,2 ml: master mix (đã bao gồm đệm, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>), cặp môi vòng ngoài, hỗn hợp enzym phiên mã ngược và enzym tổng hợp chuỗi (Taq-platinum), nước khử ion vô trùng, ARN khuôn, được trình bày như bảng dưới đây:

STT	Sinh phẩm	Thành phần (μl)/1 pứ
1	Đệm	12,5
2	ARN	100 ng
3	Môi xuôi (10pM/ μl)	1,0
4	Môi ngược (10pM/ μl)	1,0
5	Taq-platinum	0,5 U
6	H <sub>2</sub> O	Đủ thể tích 25 μl
	<b>Tổng thể tích</b>	25,0

- Ly tâm nhẹ để các thành phần lắng xuống đáy ống hoàn toàn
- Đặt vào máy PCR
- Chọn chương trình
- Bấm start để máy chạy

**Bước 3: Thực hiện phản ứng PCR vòng 2 (thao tác ở 4°C)**

- Đưa các thành phần cần thiết của phản ứng ra nhiệt độ phòng 10 phút để rã đông hoàn toàn.

- Trộn lẫn các thành phần sau vào một ống eppendorf 0,2 ml: Master mix (đã bao gồm đệm, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>), cặp môi vòng trong đặc hiệu cho tổ hợp gen BCR-ABL, enzym tổng hợp chuỗi, nước khử ion vô trùng, sản phẩm RT-PCR vòng 1, được trình bày như bảng dưới đây:

STT	Sinh phẩm	Thành phần (μl)/1 pứ
1	Đệm	12,5
2	Sản phẩm PCR vòng 1	1
3	Môi xuôi (10pM/ μl)	1,0
4	Môi ngược (10pM/ μl)	1,0
5	Enzym	0,5 U
5	H <sub>2</sub> O	Đủ thể tích 25 μl
	<b>Tổng thể tích</b>	25,0

- Ly tâm nhẹ để các thành phần lắng xuống đáy ống hoàn toàn;
- Đặt vào máy PCR;
- Chọn chương trình;
- Bấm start để máy chạy.

#### **Bước 4. Điện di sản phẩm PCR**

##### **Chuẩn bị gel agarose:**

- Cân agarose cho vào bình đun gel (nồng độ 1% = 1gram/100ml);
- Thêm đệm TBE 1X hoặc TAE 1X vào bình, lắc đều;
- Đun sôi đến agarose tan hoàn toàn;
- Để ấm đến 60<sup>0</sup>C rồi đổ vào khay gel;
- Để nhiệt độ phòng 30 phút để gel ổn định.

##### **Điện di:**

- Đặt gel vào khay điện di, đổ đầy đệm chạy và rút lược từ từ ra khỏi gel để tránh vỡ giếng;
- Chuẩn bị hỗn hợp: 5µl sản phẩm PCR + 1 µl loading dye 10X + 4 µl dH<sub>2</sub>O.
- Trộn đều và bơm vào các giếng theo thứ tự đã đánh dấu;
- Sử dụng 3 µl ADN ladder để làm thang tính toán kích thước sản phẩm;
- Điện di trong khoảng 30-40 phút, 110V;
- Nhuộm bản gel với dung dịch Ethidium bromide trong 5 phút và soi, chụp ảnh trên đèn soi gel UV.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Kết quả dương tính nếu nhìn thấy vạch sáng dưới đèn UV, sản phẩm có kích thước phù hợp theo lý thuyết .

Trong trường hợp sản phẩm PCR có băng không rõ ràng, nhiều băng không đặc hiệu hoặc đối chứng không chính xác thì phải lặp lại xét nghiệm.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

### **SAI SÓT**

- Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.
- Thao tác pipet không chính xác.

### **XỬ TRÍ**

- Thực hiện theo đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
- Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.

- Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.
- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất
- Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Hồ Huỳnh Thuỳ Dương (1997). Các phương pháp tách chiết axit nucleic. Sinh học phân tử. NXB Giáo Dục, trang 124-125.
2. A.Rolfs et al (1992). PCR:Clinical Diagnosis and Research. Springer Verlag, Berlin.
3. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia 1999;13,1901-28.

# **ĐỊNH LƯỢNG GEN BỆNH MÁU ÁC TÍNH BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR**

## **QUANTITATIVE REAL-TIME PCR OF GENES INVOLVED IN MALIGNANT HEMATOPOIETIC DISEASES**

### **I. NGUYÊN LÝ**

Sử dụng phương pháp Real-time-PCR định lượng ARNm của gen ung thư nhằm mục đích dự đoán thời điểm bệnh tái phát để ngăn chặn trước khi tái phát. Dựa trên sự kiểm soát lượng huỳnh quang tiêu tốn trong phản ứng có thể xác định số lượng ARNm của gen ung thư tại thời điểm đó. Đồng thời trong phản ứng định lượng cùng lúc 2 gen: gen ung thư cần theo dõi và gen tham chiếu (housekeeping gen - là gen có tốc độ biểu hiện như nhau ở cả tế bào ung thư và tế bào lành) sẽ cho phép đánh giá mức độ hoạt động của gen ung thư so với gen tham chiếu ở cùng một thời điểm trong toàn bộ quá trình theo dõi thông qua tỷ lệ số lượng ARNm của gen ung thư/số lượng ARNm gen tham chiếu. Số lượng ARNm của gen ung thư tăng dần là dấu hiệu gen ung thư bắt đầu hoạt động trở lại.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này được chỉ định trước và trong suốt quá trình điều trị cho các người bệnh đang điều trị theo phác đồ nhắm đích.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên xét nghiệm sinh học phân tử đã được đào tạo

#### **2. Phương tiện - Hóa chất**

##### **2.1 Phương tiện**

- Hệ thống máy real-time PCR
- Tủ hút hóa chất (chemical fume hood)
- Buồng vô trùng (biology cabinet).
- Máy ly tâm tốc độ cao (tốc độ tối đa 14.000 vòng/phút).
- Máy vortex.
- Các loại pipet 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l.
- Đầu côn có màng lọc.

- Ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, không có enzym nucleaza.
- Ống PCR 0,2 ml vô trùng, không có enzym nucleaza.
- Tủ lạnh 4-8<sup>0</sup>C, tủ âm sâu -20<sup>0</sup>C.
- Găng tay.

## **2.2 Hóa chất**

- Dung dịch Ficoll hoặc dung dịch ly giải tế bào hồng cầu gồm các muối MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl, NaCl.

- Sử dụng kit tách ARN thương mại. Nếu tách thủ công thì sử dụng các sinh phẩm cần thiết để tách chiết ARN như glycogen, proteinase K, đệm ly giải tế bào, phenol/chloroform, cồn tuyệt đối.

- Hóa chất cho phản ứng định lượng biểu hiện gen: kit thương mại. Nếu không sử dụng kit thương mại thì sử dụng các thành phần riêng lẻ như: Đệm, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, enzym phiên mã ngược, enzym kéo dài chuỗi, mồi oligodT hoặc mồi ngẫu nhiên (random primer), các cặp mồi và probe đặc hiệu, nước khử ion vô trùng.

## **3. Bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi đựng trong ống chống đông EDTA.

## **4. Phiếu xét nghiệm**

Có đầy đủ các thông tin cần thiết về người bệnh, về chẩn đoán và yêu cầu xét nghiệm.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi hoặc dịch tủy xương chống đông bằng EDTA

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

#### **Bước 1: Tách chiết ARN**

Xem bài “Tách chiết ARN từ máu ngoại vi/tủy xương

#### **Bước 2: Thực hiện phản ứng ADNc**

Sử dụng mồi ngẫu nhiên 6 nucleotit (random hexamer primers) và enzym Reverse Transcriptase để chuyển hóa ARN thành ADN thông qua các chu trình nhiệt chuyên biệt.

#### **Bước 3: Thực hiện phản ứng real-time PCR**

##### Chuẩn bị các mẫu chuẩn:

Mỗi loại gen cần định lượng phải có tối thiểu 3 mẫu chuẩn (mẫu chuẩn là các mẫu ARN đích đã biết trước nồng độ, thường sử dụng mẫu chuẩn ở 3 độ pha

loãng liên tiếp) và một mẫu đối chứng âm để kiểm soát ngoại nhiễm (thường sử dụng H<sub>2</sub>O đã khử các enzym phân hủy ADN và ARN hoặc đệm Tris- EDTA 1M, pH=7,5).

#### Chuẩn bị phản ứng:

- Ghi tên các ống theo thứ tự.
- Mỗi ống phản ứng bổ sung đủ các thành phần phản ứng:
  - + Sản phẩm ADNc + master mix theo nồng độ khuyến cáo (nếu sử dụng kit định lượng chế tạo sẵn).
  - + Sản phẩm ADNc + buffer+ enzym+ primer+ probe theo đúng nồng độ đã tối ưu (nếu sử dụng các thành phần riêng lẻ).
- Đặt các ống phản ứng vào các vị trí trên máy.

#### Chuẩn bị chương trình trên máy

- Cài đặt sơ đồ giếng theo đúng các vị trí ống đã đặt trên máy, nhập thông tin mẫu và các nồng độ mẫu chuẩn theo đúng yêu cầu, chọn kênh màu huỳnh quang tương thích.
- Cài đặt chương trình chạy theo chế độ luân nhiệt khuyến cáo của kit hoặc chế độ luân nhiệt đã tối ưu được.
- Chọn vị trí lưu kết quả sau khi kết thúc chương trình chạy.
- Bấm start để bắt đầu chạy theo chương trình đã chọn.

#### **Bước 4: Phân tích kết quả**

- Sau khi kết thúc chương trình chạy, tất cả các kết quả được hiển thị lên màn hình.
- Kiểm tra các đường chuẩn và mẫu đối chứng âm trước.
- + Nếu đạt yêu cầu (theo hướng dẫn của kit sử dụng hoặc theo kết quả lý thuyết đã tối ưu) thì tiếp tục phân tích các mẫu khác theo kết quả thu được.
- + Nếu không đạt yêu cầu (mẫu chuẩn không có tín hiệu huỳnh quang, mẫu đối chứng âm bị nhiễm thành dương tính....) thì không đủ cơ sở để phân tích các mẫu khác. Trong trường hợp này phải lặp lại xét nghiệm sau khi đã tìm ra nguyên nhân sai sót ở xét nghiệm trước.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Nhận định kết quả theo các kết quả thu được bằng cách tính toán tỷ lệ ARNm gen ung thư/ ARNm gen tham chiếu.

#### **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

**SAI SÓT**

**XỬ TRÍ**



- Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.
- Thao tác pipet không chính xác.
- Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.
- Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
- Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất
- Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Phạm Hùng Vân (2009). Real-time PCR. PCR và Realtime PCR - các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp. Nhà xuất bản y học, trang 60-65.
2. J Gabert et al (2003). Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - A Europe Against Cancer . Leukemia 17, 2318-2357.

**XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN SỰ TỒN TẠI CỦA GEN BỆNH BẰNG KỸ  
THUẬT RT-PCR  
DISEASE GENE DETECTION BY REVERSE  
TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION (RT- PCR)**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Kỹ thuật RT-PCR dựa trên nguyên lý chung của kỹ thuật PCR: sử dụng hoạt tính tổng hợp ADN của enzym Taq-polymerase; cùng với các vật liệu cơ bản gồm các bazơ nitơ tự do (dNTPs), hai đoạn mồi: mồi xuôi (forward primer) và mồi ngược (reverse primer) để nhân bản đoạn gen quan tâm. Do đối tượng cần khuếch đại của kỹ thuật RT-PCR là ARN thông tin vì vậy phản ứng RT-PCR sẽ gồm có 2 bước cơ bản như sau:

**Bước 1 - RT ( reverse transcription - phiên mã ngược):** là bước chuyển đổi ARN sợi khuôn thành sợi ADN bổ trợ (ADNc), được thực hiện bởi enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase).

**Bước 2 - PCR:** sử dụng sản phẩm ADNc của bước 1 làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR với sự tham gia của cặp mồi đặc hiệu để nhân bản chính xác đoạn gen đích.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này chỉ định cho tất cả các người bệnh mắc bệnh máu do các bất thường gen đặc hiệu.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

Kỹ thuật viên xét nghiệm sinh học phân tử đã được đào tạo.

### **2. Phương tiện - Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Máy PCR;
- Hệ thống máy điện di, hệ thống đèn cực tím soi gel, hệ thống máy chụp ảnh;
- Tủ hút hóa chất (chemical fume hood);
- Buồng vô trùng (biology cabinet);
- Máy ly tâm tốc độ cao (tốc độ tối đa 14.000 vòng/phút);

- Máy vortex;
- Các loại pipet 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l;
- Đầu côn có màng lọc;
- Ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Ống PCR 0,2 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Tủ lạnh 4-8<sup>0</sup>C, tủ âm sâu -20<sup>0</sup>C;
- Găng tay.

### **3.2. Hóa chất**

- Dung dịch Ficoll hoặc dung dịch ly giải tế bào hồng cầu gồm các muối MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl, NaCl.

- Sử dụng kit tách ARN thương mại. Nếu tách thủ công thì sử dụng các sinh phẩm cần thiết để tách chiết ARN như glycogen, proteinase K, đệm ly giải tế bào, phenol/chloroform, cồn tuyệt đối.

- Hóa chất chạy RT-PCR: kit RT-PCR onestep. Nếu không sử dụng kit thương mại thì sử dụng các thành phần riêng lẻ như: Đệm, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, enzym phiên mã ngược, enzym kéo dài chuỗi, môi oligodT hoặc môi ngẫu nhiên (random primer), cặp môi đặc hiệu, nước khử ion vô trùng.

- Hóa chất điện di: thạch agarose, đệm tra mẫu, thang chuẩn ADN, thuốc nhuộm ethidium bromide.

### **3. Bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi đựng trong ống chống đông EDTA.

### **4. Phiếu xét nghiệm**

Có đầy đủ các thông tin cần thiết về người bệnh, về chẩn đoán và yêu cầu xét nghiệm.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi hoặc dịch tủy xương chống đông bằng EDTA

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

#### **Bước 1: Tách chiết ARN:**

Xem bài “Tách chiết ARN từ máu ngoại vi/tủy xương

#### **Bước 2: Thực hiện phản ứng tổng hợp ADNc (thao tác ở 4<sup>0</sup>C)**

Sử dụng môi ngẫu nhiên 6 nucleotit (random hexamer primers) và enzym Reverse Transcriptase để chuyển hóa ARN thành ADN thông qua các chu trình nhiệt chuyên biệt.

### **Bước 3: Thực hiện phản ứng PCR (thao tác ở 4°C)**

- Đưa các thành phần cần thiết của phản ứng ra nhiệt độ phòng 10 phút để rã đông hoàn toàn.

- Trộn lẫn các thành phần sau vào một ống eppendorf 0,2 ml: master mix (đã bao gồm đệm, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>), cặp mồi cho gen đích, enzym tổng hợp chuỗi, nước khử ion vô trùng, sản phẩm ADNc, được trình bày như bảng dưới đây:

<b>STT</b>	<b>Sinh phẩm</b>	<b>Thành phần (µl)/1 pứ</b>
1	Đệm	12,5
2	Sản phẩm ADNc	1
3	Mồi xuôi (10pM/ µl)	1,0
4	Mồi ngược (10pM/ µl)	1,0
5	Enzym	0,5 U
5	H <sub>2</sub> O	Đủ thể tích 25 µl
	<b>Tổng thể tích</b>	<b>25,0</b>

- Ly tâm nhẹ để các thành phần lắng xuống đáy ống hoàn toàn;
- Đặt vào máy PCR;
- Chọn chương trình;
- Bấm start để máy chạy.

### **Bước 4: Điện di sản phẩm PCR**

#### **Chuẩn bị gel agarose:**

- Cân agarose cho vào bình đun gel (nồng độ 1% = 1gram/100ml);
- Thêm đệm TBE 1X hoặc TAE 1X vào bình, lắc đều;
- Đun sôi đến agarose tan hoàn toàn;
- Để ấm đến 60°C rồi đổ vào khay gel;
- Để nhiệt độ phòng 30 phút để gel ổn định.

#### **Điện di:**

- Đặt gel vào khay điện di, đổ đầy đệm chạy và rút lược từ từ ra khỏi gel để tránh vỡ giếng;
- Chuẩn bị hỗn hợp: 5µl sản phẩm PCR + 1 µl loading dye 10X + 4 µl dH<sub>2</sub>O;
- Trộn đều và bơm vào các giếng theo thứ tự đã đánh dấu;
- Sử dụng 3 µl ADN ladder để làm thang tính toán kích thước sản phẩm;

- Điện di trong khoảng 30-40 phút, 110V;
- Nhuộm bản gel với dung dịch Ethidium bromide trong 5 phút và soi, chụp ảnh trên đèn soi gel UV.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Kết quả dương tính nếu nhìn thấy vạch sáng dưới đèn UV, sản phẩm có kích thước phù hợp theo lý thuyết .

Trong trường hợp sản phẩm PCR có băng không rõ ràng, nhiều băng không đặc hiệu hoặc đối chứng không chính xác thì phải lặp lại xét nghiệm.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

### **SAI SÓT**

- Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.
- Thao tác pipet không chính xác.
- Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.

### **XỬ TRÍ**

- Thực hiện theo đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
- Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất
- Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Hồ Huỳnh Thủy Dương (1997). Các phương pháp tách chiết axit nucleic. Sinh học phân tử. NXB Giáo Dục, trang 124-125.
2. A.Rolfs et al (1992). PCR:Clinical Diagnosis and Research. Springer Verlag, Berlin.
3. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia 1999;13,1901-28.

# PHÁT HIỆN GEN JAK2 V617F BẰNG KỸ THUẬT AS-PCR

## DETECTION OF JAK2 V617F GENE MUTATION BY AS-PCR

### I. NGUYÊN LÝ

Phát hiện đột biến JAK2 V617F (Janus Kinase Valin 617 Phenylalamin) trong các mẫu bệnh phẩm của người mắc hội chứng tăng sinh tủy mạn để góp phần chẩn đoán, xếp loại các bệnh đa hồng cầu nguyên phát, tăng tiểu cầu tiên phát, xơ tủy nguyên phát phục vụ cho điều trị bệnh.

Đột biến JAK2 V617F được phát hiện bằng kỹ thuật Allen-specific PCR (AS-PCR). Trong Allen-specific PCR (AS-PCR) người ta thiết kế một đoạn primer có trình tự sai khác so với trình tự đặc hiệu một nucleotide ở đầu 3' để ngăn cản quá trình kéo dài chuỗi ADN của enzym Taq-polymeraza trong phản ứng PCR. Trong phương pháp này, người ta thiết kế hai ống phản PCR song song: ống phản thứ nhất sử dụng cặp primer đặc hiệu cho allen bình thường, ống phản thứ hai sử dụng cặp primer để nhân bản allen đột biến. Phản ứng AS-PCR luôn có ít nhất một sản phẩm: nếu người bệnh dị hợp tử thì trong hai ống phản ứng PCR đều có một băng sản phẩm đặc hiệu, nếu người bệnh đồng hợp tử mang gen bệnh thì chỉ có ống phản ứng 2 có băng đặc hiệu, còn người bệnh đồng hợp tử bình thường thì chỉ ống phản ứng 1 có băng sản phẩm đặc hiệu.

### II. CHỈ ĐỊNH

Xét nghiệm này được chỉ định cho tất cả các người bệnh thuộc hội chứng tăng sinh tủy mạn.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Kỹ thuật viên xét nghiệm sinh học phân tử đã được đào tạo.

#### 2. Phương tiện - Hóa chất

##### 2.1 Phương tiện

- Máy PCR
- Hệ thống máy điện di, hệ thống đèn cực tím soi gel, hệ thống máy chụp ảnh.
- Buồng vô trùng (biology cabinet).
- Máy ly tâm tốc độ cao (tốc độ tối đa 14.000 vòng/phút).

- Máy vortex.
- Các loại pipet 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l.
- Đầu côn có màng lọc.
- Ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, không có enzym nucleaza.
- Ống PCR 0,2 ml vô trùng, không có enzym nucleaza.
- Tủ lạnh 4-8<sup>0</sup>C, tủ âm sâu -20<sup>0</sup>C.
- Găng tay.

## 2.2 Hóa chất

- Sử dụng kit tách ADN thương mại. Nếu tách thủ công thì sử dụng các sinh phẩm cần thiết để tách chiết ADN như proteinase K, đệm ly giải tế bào, phenol/chloroform, cồn tuyệt đối.

- Hóa chất chạy PCR gồm: Đệm, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, enzym kéo dài chuỗi, nước khử ion vô trùng, các cặp mồi đặc hiệu.

- Hóa chất điện di: thạch agarose, đệm tra mẫu, thang chuẩn ADN, thuốc nhuộm ethidium bromide.

## 3. Bệnh phẩm

2 ml máu ngoại vi đựng trong ống chống đông EDTA.

## 4. Phiếu xét nghiệm

Có đầy đủ các thông tin cần thiết về người bệnh, về chẩn đoán và yêu cầu xét nghiệm.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Lấy bệnh phẩm

2 ml máu toàn phần đựng trong ống chống đông EDTA.

### 2. Tiến hành kỹ thuật

#### Bước 1: Tách chiết ADN

Xem bài “Tách chiết ADN từ máu ngoại vi”.

#### Bước 2: Thực hiện phản ứng AS-PCR

- Đưa các thành phần cần thiết của phản ứng ra nhiệt độ phòng 10 phút để rã đông hoàn toàn.

- Trộn lẫn các thành phần sau vào một ống 0,2 ml:

Sinh phẩm	Số lượng ( $\mu$ l)
Buffer 10X	2,5
dNTPs (500 $\mu$ M)	2
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2

Primer F( bình thường/đột biến)	1
Primer R( bình thường/đột biến)	1
Enzym Taq	0,5
Nuclease free H <sub>2</sub> O	25 - x
ADN khuôn (100 ng)	X
<b>Tổng thể tích</b>	<b>25</b>

(x: thể tích ADN đạt nồng độ 100 ng)

- Ly tâm nhẹ để các thành phần lắng xuống đáy ống hoàn toàn
- Đặt vào máy PCR
- Chọn chương trình
- Bấm start để máy chạy.

### **Bước 3: Điện di sản phẩm PCR**

#### **Chuẩn bị gel agarose:**

- Cân 1 g agarose cho vào bình thủy tinh chịu nhiệt.
- Thêm 100 ml đệm điện di (TAE 1X /TBE 1X...) vào bình, lắc đều.
- Đun mỗi lần 1 phút trong lò vi sóng đến khi agarose tan hoàn toàn.
- Để ấm đến 60<sup>0</sup> rồi đổ vào khay đã cắm lược.
- Để nhiệt độ phòng 30 phút để thạch đông rồi mới rút lược ra.

#### **Điện di:**

- Lấy 5 µl sản phẩm PCR + 1 µl đệm tra mẫu 6X + 4 µl dH<sub>2</sub>O
- Trộn đều và nhỏ vào các giếng theo thứ tự
- Nhỏ 3 µl marker ADN vào giếng kế tiếp
- Đặt bản gel vào máy điện di
- Đổ đệm điện di ngập bản gel và chạy ở 100 V trong 20 phút
- Nhuộm bản gel với dung dịch ethidium bromide trong 5 phút

### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Kết quả dương tính nếu nhìn thấy vạch sáng dưới đèn UV, sản phẩm có kích thước phù hợp theo lý thuyết.

### **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

#### **SAI SÓT**

- Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.
- Thao tác pipet không chính xác.

#### **XỬ TRÍ**

- Thực hiện theo đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
- Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.



- Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.
- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất
- Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. A.Rolfs et al (1992). PCR: Clinical Diagnosis and Research. Springer Verlag, Berlin.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005; 365:1054-61.

# XÉT NGHIỆM PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN GEN BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR

(Phát hiện cùng lúc nhiều đột biến)

## MULTIPLE GENE MUTATIONS DETECTION BY MULTIPLEX PCR

### I. NGUYÊN LÝ

Phản ứng tổng hợp chuỗi (PCR) là phản ứng cho phép nhân bản chính xác một trình tự ADN quan tâm lên hàng triệu lần. Sử dụng phương pháp PCR thông thường với một cặp môi đặc trưng chỉ phát hiện được một đột biến. Để phát hiện nhiều hơn một đột biến sẽ phải làm nhiều xét nghiệm PCR. Vì vậy, trong trường hợp bệnh do nhiều đột biến và cần xác định các đột biến này thì nên sử dụng kỹ Multiplex PCR. Đây là phương pháp sử dụng nhiều cặp môi trong cùng một phản ứng PCR cho phép phát hiện được đồng thời nhiều đột biến.

### II. CHỈ ĐỊNH

Xét nghiệm này được chỉ định cho tất cả các người bệnh mắc bệnh máu do các đột biến gen.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Kỹ thuật viên xét nghiệm Sinh học phân tử đã được đào tạo.

#### 2. Phương tiện - Hóa chất

##### 2.1. Phương tiện

- Máy PCR;
- Hệ thống máy điện di, hệ thống đèn cực tím soi gel, hệ thống máy chụp ảnh;
- Buồng vô trùng (biology cabinet);
- Máy ly tâm tốc độ cao (tốc độ tối đa 14.000 vòng/phút);
- Máy vortex;
- Các loại pipet 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l;
- Đầu côn có màng lọc;
- Ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Ống PCR 0,2 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Tủ lạnh 4-8°C, tủ âm sâu -20°C;

- Găng tay.

## **2.2. Hóa chất**

- Kit tách ADN thương mại hoặc các hóa chất cần thiết cho tách chiết thủ công ADN (proteinase K, đệm ly giải tế bào, phenol/chloroform, cồn tuyệt đối).
- Hóa chất chạy PCR gồm: Đệm,  $MgCl_2$ , dNTPs, enzym kéo dài chuỗi, nước khử ion vô trùng.
- Các cặp mồi đặc hiệu cho các đột biến cần xác định và 1 cặp mồi sử dụng làm chứng nội kiểm (Internal control).
- Thạch agarose, đệm tra mẫu, thang chuẩn ADN.
- Thuốc nhuộm ethidium bromide.

## **3. Bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi đựng trong ống chống đông EDTA.

## **4. Phiếu xét nghiệm**

Có đầy đủ các thông tin cần thiết về người bệnh, về chẩn đoán và yêu cầu xét nghiệm.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi chống đông bằng EDTA.

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

#### ***Bước 1. Tách chiết ADN***

Xem bài “Tách chiết ADN từ máu ngoại vi”

#### ***Bước 2. Thực hiện phản ứng Multiplex PCR***

- Đưa các thành phần cần thiết của phản ứng ra nhiệt độ phòng 10 phút để rã đông hoàn toàn.

- Trộn lẫn các thành phần sau vào một ống 0,2 ml: Buffer, dNTPs,  $MgCl_2$  (nếu trong Buffer chưa có), hỗn hợp mồi (gồm các cặp mồi phát hiện đột biến được trộn theo tỷ lệ nhất định), enzym Taq polymerase, nước khử ion vô trùng, ADN khuôn.

- Ly tâm nhẹ để các thành phần lắng xuống đáy ống hoàn toàn.
- Đặt vào máy PCR.
- Chọn chương trình.
- Bấm start để máy chạy.

#### ***Bước 3: Điện di sản phẩm PCR***

#### **Chuẩn bị gel agarose:**

- Cân 1 g agarose cho vào bình thủy tinh chịu nhiệt.
- Thêm 100 ml đệm điện di (TAE 1X /TBE 1X...) vào bình, lắc đều.
- Đun mỗi lần 1 phút trong lò vi sóng đến khi agarose tan hoàn toàn.
- Để ấm đến 60<sup>0</sup> rồi đổ vào khay đã cắm lược.
- Để nhiệt độ phòng 30 phút để thạch đông rồi mới rút lược ra.

#### **Điện di:**

- Lấy 5 µl sản phẩm PCR + 1 µl đệm tra mẫu + 4 µl dH<sub>2</sub>O
- Trộn đều và nhỏ vào các giếng theo thứ tự
- Nhỏ 3 µl marker ADN vào giếng kế tiếp
- Đặt bản gel vào máy điện di
- Đổ đệm điện di ngập bản gel và chạy ở 100 V trong 20 phút
- Nhuộm bản gel với dung dịch ethidium bromide trong 5 phút

### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

Kết quả dương tính nếu nhìn thấy vạch sáng dưới đèn UV, sản phẩm có kích thước phù hợp theo lý thuyết.

### **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

#### **SAI SÓT**

- Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.
- Thao tác pipet không chính xác.
- Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.

#### **XỬ TRÍ**

- Thực hiện theo đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
- Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất
- Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Hồ Huỳnh Thủy Dương (1997). Các phương pháp tách chiết axit nucleic. Sinh học phân tử. NXB Giáo Dục, trang 124-125.
2. A.Rolfs et al (1992). PCR:Clinical Diagnosis and Research. Springer Verlag, Berlin.

# **ĐỊNH LƯỢNG VIRUS CYTOMEGALO (CMV) BẰNG KỸ THUẬT REAL-TIME PCR**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Sử dụng kỹ thuật PCR để nhân bản một đoạn gen đặc trưng của virus CMV kết hợp với việc bổ sung taqman probe - là một chất phát huỳnh quang vào phản ứng PCR. Dựa vào sự kiểm soát số lượng huỳnh quang tiêu tốn trong phản ứng cùng với các chuẩn ADN-CMV đã biết trước nồng độ, phần mềm của hệ thống sẽ tính toán và đếm được số lượng bản sao virus CMV ban đầu có trong mẫu bệnh phẩm.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này chỉ định cho tất cả các người bệnh có biểu hiện nhiễm trùng sau ghép.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên xét nghiệm sinh học phân tử đã được đào tạo.

### **2. Phương tiện - Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Hệ thống máy real-time PCR;
- Tủ hút hóa chất (chemical fume hood);
- Buồng vô trùng (biology cabinet);
- Máy ly tâm tốc độ cao (tốc độ tối đa 14.000 vòng/phút);
- Máy vortex;
- Các loại pipet 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l;
- Đầu côn có màng lọc;
- Ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Ống PCR 0,2 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Tủ lạnh 4-8°C, tủ âm sâu -20°C;
- Găng tay.

#### **2.2 Hóa chất**

- Sử dụng kit tách ADN thương mại. Nếu tách thủ công thì sử dụng các sinh phẩm cần thiết để tách chiết ADN như proteinase K, đệm ly giải tế bào, phenol/chloroform, cồn tuyệt đối.

- Kit định lượng CMV thương mại hoặc các hóa chất cần thiết cho phản ứng real-time PCR như probe, primer, dNTPs, enzym, các mẫu ADN chuẩn.

### **3. Bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi đựng trong ống chống đông EDTA.

### **4. Phiếu xét nghiệm**

Có đầy đủ các thông tin cần thiết về người bệnh, về chẩn đoán và yêu cầu xét nghiệm.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Lấy bệnh phẩm**

2 ml máu ngoại vi chống đông bằng EDTA.

### **2. Tiến hành kỹ thuật**

#### **Bước 1: Tách chiết ADN**

Xem bài “Tách chiết ADN từ máu ngoại vi”

#### **Bước 2: Thực hiện phản ứng Real-time PCR**

##### Chuẩn bị các mẫu chuẩn:

Để định lượng phải có tối thiểu 3 mẫu chuẩn (mẫu chuẩn là các mẫu ADN đích đã biết trước nồng độ, thường sử dụng mẫu chuẩn ở 3 độ pha loãng liên tiếp) và một mẫu đối chứng âm để kiểm soát ngoại nhiễm ((thường sử dụng H<sub>2</sub>O đã khử các enzym phân hủy ADN và ARN hoặc đệm Tris- EDTA 1M, pH=7,5).

##### Chuẩn bị phản ứng:

- Ghi tên các ống theo thứ tự.  
- Mỗi ống phản ứng bổ sung đủ các thành phần phản ứng:  
+ Mẫu ADN + master mix theo nồng độ khuyến cáo (nếu sử dụng kit định lượng chế tạo sẵn).

+ Mẫu ADN+ buffer+ enzym+ primer+ probe theo đúng nồng độ đã tối ưu (nếu sử dụng các thành phần riêng lẻ).

- Đặt các ống phản ứng vào các vị trí trên máy.

##### Chuẩn bị chương trình trên máy

- Cài đặt sơ đồ giếng theo đúng các vị trí ống đã đặt trên máy, nhập thông tin mẫu và các nồng độ mẫu chuẩn theo đúng yêu cầu, chọn kênh màu huỳnh quang tương thích.

- Cài đặt chương trình chạy theo chế độ luân nhiệt khuyến cáo của kit hoặc chế độ luân nhiệt đã tối ưu được.

- Chọn vị trí lưu kết quả sau khi kết thúc chương trình chạy.

- Bấm start để bắt đầu chạy theo chương trình đã chọn.

### **Bước 3: Phân tích kết quả**

- Sau khi kết thúc chương trình chạy, tất cả các kết quả được hiển thị lên màn hình.

- Kiểm tra các đường chuẩn và mẫu đối chứng âm trước.

+ Nếu đạt yêu cầu (theo hướng dẫn của kit sử dụng hoặc theo kết quả lý thuyết đã tối ưu) thì tiếp tục phân tích các mẫu khác theo kết quả thu được.

+ Nếu không đạt yêu cầu (mẫu chuẩn không có tín hiệu huỳnh quang, mẫu đối chứng âm bị nhiễm thành dương tính....) thì không đủ cơ sở để phân tích các mẫu khác. Trong trường hợp này phải lặp lại xét nghiệm sau khi đã tìm ra nguyên nhân sai sót ở xét nghiệm trước.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Số lượng virus CMV được hiển thị lên màn hình sau khi chạy, chú ý nhân với hệ số pha loãng mẫu nếu trước đó có pha loãng mẫu để chạy.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

### **SAI SÓT**

- Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.
- Thao tác pipet không chính xác.
- Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.

### **XỬ TRÍ**

- Thực hiện theo đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
- Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất
- Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Phạm Hùng Vân (2009). Real-time PCR. PCR và Realtime PCR - các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp. Nhà xuất bản y học, trang 60-65.
2. A.Rolfs et al (1992). PCR:Clinical Diagnosis and Research. Springer Verlag, Berlin.

**PHÁT HIỆN ĐẢO ĐOẠN INTRON 22 CỦA GEN YẾU TỐ VIII BỆNH  
HEMOPHILIA BẰNG KỸ THUẬT LONG-RANGE PCR  
DETECTION OF INTRON 22 INVERSION OF FACTOR VIII GENE IN  
HEMOPHILIA BY LONG-RANGE PCR**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Hemophilia A là một bệnh rối loạn đông máu, nguyên nhân là do các đột biến trên gen mã hóa yếu tố VIII. Khoảng 50% người bệnh hemophilia A thể nặng là do đảo đoạn intron 22 của gen yếu tố VIII. Đảo đoạn này xuất hiện do sự tái tổ hợp giữa vùng 5' của gen yếu tố VIII (int22h1) với vùng lặp lại (vùng tương đồng) ở phần cuối cùng trên cánh dài của NST X (int22h2 (proximal) hoặc int22h3 (distal)). Kỹ thuật Longrange PCR với sự kết hợp của hai loại enzym: enzym đọc sửa và enzym có hoạt tính tổng hợp đoạn ADN lớn cho phép khuếch đại các vùng ADN tái tổ hợp này tạo ra sản phẩm PCR có kích thước 10-12kb. Sản phẩm PCR này được phát hiện khi điện di trên agarose và đọc trên hệ thống đọc gel.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Xét nghiệm này chỉ định cho tất cả các người bệnh mắc bệnh Hemophilia A thể nặng.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Kỹ thuật viên xét nghiệm sinh học phân tử đã được đào tạo

### **2. Phương tiện - Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Máy PCR;
- Hệ thống máy điện di, hệ thống đèn cực tím soi gel, hệ thống máy chụp ảnh;
- Buồng vô trùng (biology cabinet);
- Máy ly tâm tốc độ cao (tốc độ tối đa 14.000 vòng/phút);
- Máy vortex;
- Các loại pipet 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl;
- Đầu côn có màng lọc;



- Ống eppendorf 1,5 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Ống PCR 0,2 ml vô trùng, không có enzym nucleaza;
- Tủ lạnh 4-8°C, tủ âm sâu -20°C;
- Găng tay.

## 2.2 Hóa chất

- Sử dụng kit tách ADN thương mại. Nếu tách thủ công thì sử dụng các sinh phẩm cần thiết để tách chiết ADN như proteinase K, đệm ly giải tế bào, phenol/chloroform, cồn tuyệt đối.

- Hóa chất chạy Longrange PCR gồm: Kit LongRange PCR, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, 7-deaza-dGTP, DMSO, enzym kéo dài chuỗi, nước khử ion vô trùng, các cặp mồi đặc hiệu, theo bảng sau:

P	5'GCCCTGCCTGTCCATTACACTGATGACATTATGCTGAC3'(38-mer)
Q	5'GGCCCTACAACCATTCTGCCTTTCACCTTTCAGTGCAATA 3'(3-mer)
A	5'CACAAGGGGGAAGAGTGTGAGGGTGTGGGATAAGAA 3' (36-mer)
B	5'CCCAAACCTATAACCAGCACCTTGAACCTCCCCTCTCATA3'(40-mer)

- Hóa chất điện di: thạch agarose, đệm tra mẫu, thang chuẩn ADN, thuốc nhuộm ethidium bromide.

## 3. Bệnh phẩm

2 ml máu ngoại vi đựng trong ống chống đông EDTA.

## 4. Phiếu xét nghiệm

Có đầy đủ các thông tin cần thiết về người bệnh, về chẩn đoán và yêu cầu xét nghiệm.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Lấy bệnh phẩm

2 ml máu ngoại vi chống đông bằng EDTA.

### 2. Tiến hành kỹ thuật

#### Bước 1: Tách chiết ADN

Xem bài “Tách chiết ADN từ máu ngoại vi”.

#### Bước 2: Thực hiện phản ứng Long-range PCR

- Ghi tên các ống phản ứng.
- Pha 2 master mix PCR trong box vô trùng tại phòng tiền PCR theo bảng sau:

+ Master mix1 (MM1):

<b>Thành phần</b>	<b>Thể tích</b>
dATP(10mM)	1,25µl
dCTP(10mM)	1,25µl
dTTP (10mM)	1,25µl
dGTP (10mM)	0,625µl
7-deaza-dGTP (10mM)	0,625µl
Oligo-P (10pmoles/ )	0,5µl
Oligo-Q (10pmoles/ )	0,5µl
Oligo-A (10pmoles/ )	0,2µl
Oligo-B (10pmoles/ )	0,2µl
10X buffer	2,0µl
DMSO	0,4µl

+ Master mix 2 (MM2)

Longrange PCR enzym mix (5UI/ µl)	0,5µl
10X longrange PCR buffer	0,5µl
Nước cất	4,0µl

- Trộn đều các ống master mix, ly tâm nhẹ để dung dịch xuống đáy ống hoàn toàn;

- Chia 8.8µl MM1 vào các ống PCR 0.2ml đã chuẩn bị;

- Bổ sung 10-20ng ADN mẫu và chúng cùng với nước khử ion vô trùng cho đủ thể tích ống phản ứng là 20µl;

- Chạy PCR: Đặt ống phản ứng vào máy PCR, ấn start đợi khi máy đã chạy xong chu kỳ biến tính lần đầu ở 95°C/30s. Ấn “Pause”;

- Mở nắp ống phản ứng, bổ sung 5µl MM2 vào mỗi tube và trộn đều bằng pipet. Ấn “Resume”.

### **Bước 3: Điện di kiểm tra sản phẩm Longrange PCR**

#### **Chuẩn bị gel agarose;**

- Cân 0.5 g agarose cho vào bình thủy tinh chịu nhiệt;

- Thêm 100 ml đệm điện di (TAE 1X /TBE 1X...) vào bình, lắc đều;

- Đun mỗi lần 1 phút trong lò vi sóng đến khi agarose tan hoàn toàn;

- Để ấm đến 60° rồi đổ vào khay đã cắm lược;

- Để nhiệt độ phòng 30 phút để thạch đông rồi mới rút lược ra.

#### **Điện di:**

- Lấy 5 µl sản phẩm PCR + 1 µl đệm tra mẫu + 4 µl dH<sub>2</sub>O;

- Trộn đều và nhỏ vào các giếng theo thứ tự;
- Nhỏ 3 µl marker ADN vào giếng kế tiếp;
- Đặt bản gel vào máy điện di;
- Đồ đệm điện di ngập bản gel và chạy ở hiệu điện thế 90volt/1 giờ, kiểm tra băng, nếu có chạy tiếp ít nhất 12 giờ (có thể chạy tới 21 giờ). Nếu không thấy có băng dừng chạy làm lại phản ứng PCR;
- Nhuộm bản gel với dung dịch ethidium bromide trong 5 phút;
- Chụp ảnh gel, in ảnh và dán vào worksheet.

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

### Trên hình ảnh điện di:

- Mẫu không có đảo đoạn sẽ có 02 băng ADN: 10kb, 12kb;
- Mẫu nam có đảo đoạn sẽ có 02 băng ADN: 10kb, 11kb;
- Mẫu nữ có đảo đoạn dị hợp tử có 03 băng ADN: 10kb, 11kb, 12kb.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

### SAI SÓT

- Lấy mẫu không đủ hoặc sai chất chống đông.
- Thao tác pipet không chính xác.
- Tín hiệu phản ứng không rõ ràng.

### XỬ TRÍ

- Thực hiện đúng hướng dẫn qui cách lấy mẫu.
- Sử dụng pipet theo đúng thể tích quy định.
- Bảo quản hóa chất đúng theo khuyến cáo của nhà sản xuất  
Thực hiện đúng, đủ các bước trong quy trình xét nghiệm.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. D J Bowen. *Haemophilia A and Haemophilia B: molecular insights*. J Clin Pathol: Mol Pathol 2002; 55:1-8.
2. Keeney S et al. *The molecular analysis of haemophilia A: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization Haemophilia Genetics Laboratory Network*. Haemophilia 2005; 11: 387-97.

## CHƯƠNG IV. TRUYỀN MÁU (Blood Transfusion)

### XÉT NGHIỆM HÒA HỢP MIỄN DỊCH PHÁT MÁU Ở 22°C

(Kỹ thuật gelcard/Scangel)

(Gelcard/ scangel technique for compatibility testing at 22°C)

#### I. NGUYÊN LÝ

Xét nghiệm hòa hợp miễn dịch phát máu ở 22°C có nguyên lý của phản ứng ngưng kết và được sử dụng để phát hiện các kháng thể có trong huyết thanh của người nhận hoặc người cho mà các kháng thể này có khả năng gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của người cho hoặc người nhận trong môi trường nước muối ở 22°C và gây tan máu trong lòng mạch [1], [2], [3].

#### II. CHỈ ĐỊNH

*Xét nghiệm hòa hợp miễn dịch phát máu ở 22 °C được chỉ định trong những trường hợp sau:*

- Truyền máu toàn phần, khối hồng cầu còn nhiều huyết tương, khối bạch cầu;
- Truyền khối hồng cầu còn ít hoặc không còn huyết tương;
- Truyền chế phẩm tiểu cầu, huyết tương.

#### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

#### IV. CHUẨN BỊ

##### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

##### 2. Phương tiện – Hóa chất

###### 2.1. Trang thiết bị

Máy ủ gelcard chuyên dụng; Máy ly tâm gelcard chuyên dụng; Máy ly tâm ống thẳng có số vòng và thời gian chính xác để ly tâm ống máu; Tủ lạnh đựng sinh phẩm...

###### 2.2. Dụng cụ

Ống nghiệm thủy tinh: 12x75mm; Giá cắm ống nghiệm; Khay men hình chữ nhật: 25x30 cm; Bút marker; Pipet nhựa; Pipet tự động; Đầu côn các loại; Hộp đựng đầu côn; Giá đỡ gelcard.

###### 2.3. Thuốc thử và hoá chất

- Dung dịch Liss; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất.

- Tấm gelcard nước muối.

#### **2.4. Mẫu máu để làm phản ứng hòa hợp**

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

#### **2.5. Vật tư tiêu hao**

Sổ ghi kết quả; Phiếu xét nghiệm định nhóm máu; Mũ giấy; Khẩu trang; Găng tay; Quần áo công tác.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

**1. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu truyền máu, chế phẩm,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu và phiếu yêu cầu truyền máu. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**2. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm.

#### **3. Tiến hành kỹ thuật [4]**

- **Bước 1:** Mang dung dịch LISS được bảo quản trong tủ lạnh về nhiệt độ phòng trước khi sử dụng;

- **Bước 2:** Chuẩn bị hồng cầu người cho và/hoặc người nhận 0,8% (10 µl hồng cầu khối và 1ml dung dịch LISS), dịch treo hồng cầu sau khi pha phải được sử dụng để làm xét nghiệm ngay; Ly tâm ống máu không chống đông để tách huyết thanh;

- **Bước 3:** Ghi nhãn vào vị trí từng cột gel trên tấm gelcard họ và tên người nhận, mã số (nếu có), số giường, khoa, phòng... và mã số, thành phần của đơn vị máu, chế phẩm.

- **Bước 4:** Mở tấm bảo vệ phủ trên cột gel theo đúng quy định;

- **Bước 5:** Nhỏ 50 µl dung dịch hồng cầu 0,8% của người cho đã được chuẩn bị ở trên vào các cột gel thích hợp đã được ghi nhãn;

- **Bước 6:** Thêm 25 µl huyết thanh hoặc huyết tương của người bệnh và người cho vào các cột gel tương ứng;

- **Bước 7:** Ủ tấm gelcard trên 15 phút ở nhiệt độ phòng;

- **Bước 8:** Sau ủ, ly tâm 10 phút ở máy ly tâm gelcard chuyên dụng;

- **Bước 9:** Lấy gelcard ra khỏi máy ly tâm;

- **Bước 10:** Đọc kết quả trên máy đọc gelcard và lưu giữ kết quả bằng phần mềm máy tính;

### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

## **1. Kết quả xét nghiệm hòa hợp phát máu ở 22°C âm tính**

Máu của người cho và người bệnh là hòa hợp; Kết hợp với kết quả xác định nhóm hệ ABO, Rh D và kết quả xét nghiệm hòa hợp miễn dịch phát máu có sử dụng kháng globulin người để quyết định phát máu và chế phẩm cho các khoa lâm sàng để truyền cho người bệnh.

## **2. Kết quả xét nghiệm hòa hợp phát máu ở 22°C dương tính**

Máu của người cho và người bệnh là không hòa hợp; Lặp lại xét nghiệm với một đơn vị máu khác và kết hợp với kết quả xác định nhóm hệ ABO, Rh D và kết quả xét nghiệm hòa hợp miễn dịch phát máu có sử dụng kháng globulin người để quyết định có hoặc không phát máu và chế phẩm cho các khoa lâm sàng để truyền cho người bệnh.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm**

- Thực hiện kiểm chứng theo quy định của thông tư 26/ 2013/TT- BYT về Hướng dẫn hoạt động truyền máu [5].
- Đọc kỹ và tuân thủ đúng các bước tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm mà hiện đơn vị đang sử dụng;

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Đỗ Trung Phần (2013), Kỹ thuật xét nghiệm huyết học và truyền máu ứng dụng trong lâm sàng (Tái bản lần 2), Nhà xuất bản y học năm 2013.
3. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
4. Hướng dẫn sử dụng gelcard nước muối (Neutral Gel Card).
5. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# NGHIỆM PHÁP COOMBS TRỰC TIẾP

(Direct antiglobulin test)

(Phương pháp ống nghiệm)

## I. NGUYÊN LÝ

Nguyên lý của nghiệm pháp Coombs trực tiếp (Nghiệm pháp kháng globulin trực tiếp) là sử dụng thuốc thử kháng  $\gamma$  globulin người (huyết thanh Coombs) để xác định sự có mặt của các kháng thể miễn dịch (Bao gồm các kháng thể và thành phần bổ thể là globulin) đã cảm nhiễm trên bề mặt hồng cầu người bệnh [1].

## II. CHỈ ĐỊNH

- Thiếu máu tan máu tự miễn, bệnh hệ thống;
- Bệnh tan máu ở trẻ sơ sinh do bất đồng nhóm máu mẹ con;
- Phản ứng tan máu do truyền máu không hòa hợp nhóm máu giữa người cho và người nhận.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, kỹ thuật viên, điều dưỡng.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1 Phương tiện

##### 2.1.1. Trang thiết bị

Máy ly tâm loại thông thường; Kính hiển vi, Bình cách thủy, tủ lạnh.

##### 2.2. Dụng cụ:

Ống nghiệm thủy tinh: 12x75mm; Giá cắm ống nghiệm; khay men hình chữ nhật: 25x30 cm; Cốc thủy tinh có mỏ loại 500 ml; Bút marker; Pipet nhựa.

##### 2.3 Vật tư tiêu hao

Sổ ghi kết quả; Phiếu xét nghiệm; Mũ giấy; Khẩu trang; Găng tay; Quần áo công tác.

##### 2.2. Thuốc thử và hoá chất

Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất, Hồng cầu chứng; Kháng  $\gamma$  globulin người; dung dịch LISS.

### 3. Mẫu bệnh phẩm

1 ống máu chống đông (bằng EDTA) của người bệnh: 2 ml.

**4. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

**1. Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm** trước khi tiến hành xét nghiệm.

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xét nghiệm** của lâm sàng, kiểm tra và đối chiếu các thông tin của người bệnh trên ống máu và phiếu xét nghiệm.

**3. Tiến hành kỹ thuật [2]**

- **Bước 1:** Chuẩn bị một ống nghiệm sạch, khô và ghi nhãn họ và tên hoặc mã số của người bệnh; Nhỏ 0,5 ml hồng cầu khối của người bệnh vào ống nghiệm, rửa 3 lần bằng nước muối sinh lý 0,9%.

- **Bước 2:** Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 5% (1giọt hồng cầu khối của người bệnh và 19 giọt nước muối sinh lý 0,9%, trộn đều); Kiểm tra hồng cầu xem có hiện tượng tự ngưng kết không?

- **Bước 3:** Nhỏ 1 giọt hồng cầu 5% của người bệnh vào ống nghiệm đã ghi nhãn ở trên;

- **Bước 4:** Thêm 2 giọt huyết thanh Coombs vào ống nghiệm trên, trộn đều.

- **Bước 5:** Ly tâm 1000 vòng trong 20 giây;

- **Bước 6:** Với những ống nghiệm cho kết quả âm tính nhỏ 1 giọt hồng cầu chứng, ly tâm 1000 vòng/phút x 15-30 giây. Đọc và ghi lại kết quả vào phiếu xét nghiệm. Phản ứng phải cho kết quả ngưng kết từ 2+ đến 3+. Nếu những ống nghiệm sau khi nhỏ hồng cầu chứng mà không ngưng kết thì phải lặp lại xét nghiệm từ đầu.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Nghiệm pháp Coombs trực tiếp âm tính: Không có kháng thể miễn dịch, tự miễn trên bề mặt hồng cầu.

- Nghiệm pháp Coombs trực tiếp dương tính: Có kháng thể miễn dịch, tự miễn trên bề mặt hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm**

- Thực hiện kiểm chứng theo quy định của thông tư 26/ 2013/TT- BYT về “Hướng dẫn hoạt động truyền máu” [3];

- Đọc kỹ và tuân thủ đúng các bước tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm mà hiện đang được sử dụng;



- Thực hiện xét nghiệm Coombs trực tiếp sớm sau khi lấy mẫu máu;
- Nếu kết quả đọc bằng mắt thường không rõ ràng cần đọc dưới kính hiển vi ánh sáng thường.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fifth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Máu và các sản phẩm máu an toàn, quyển 3 Huyết thanh học nhóm máu, Tài liệu dịch, năm 2011.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# NGHIỆM PHÁP COOMBS GIÁN TIẾP

(Phương pháp ống nghiệm)

(Indirect antiglobulin test)

## I. NGUYÊN LÝ

Nguyên lý của nghiệm pháp Coombs gián tiếp (Nghiệm pháp kháng globulin gián tiếp) là sử dụng huyết thanh kháng  $\gamma$  globulin người (huyết thanh Coombs) để xác định sự có mặt của các kháng thể miễn dịch (Bao gồm các kháng thể hoặc thành phần bổ thể là globulin) có tự do trong huyết thanh của người bệnh [1].

## II. CHỈ ĐỊNH

- Thiếu máu tan máu tự miễn, bệnh hệ thống;
- Xét nghiệm hòa hợp có sử dụng kháng globulin người;
- Sàng lọc kháng thể bất thường;
- Định danh kháng thể bất thường;
- Bệnh tan máu ở trẻ sơ sinh do bất đồng nhóm máu mẹ con;
- Định nhóm kháng nguyên của các hệ nhóm máu hồng cầu.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao để làm nghiệm pháp Coombs trực tiếp;

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất

Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất, Hồng cầu nhóm O để cảm nhiễm; Hồng cầu chứng; Thuốc thử kháng globulin; dung dịch LISS.

#### 2.3. Mẫu bệnh phẩm:

- Ống máu chống đông bằng EDTA: 2 ml.
- Ống máu không chống đông: 5 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm trước khi tiến hành xét nghiệm.

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xét nghiệm** của lâm sàng, kiểm tra và đối chiếu các thông tin của người bệnh trên ống máu và phiếu xét nghiệm.

**3. Tiến hành kỹ thuật [2]**

- **Bước 1:** Chuẩn bị một ống nghiệm sạch, khô và ghi nhãn họ và tên hoặc mã số của người bệnh;

- **Bước 2:** Chuẩn bị dung dịch hồng cầu nhóm O, 3% (Nhỏ 1 giọt hồng cầu khối nhóm O và 29 giọt nước muối sinh lý 0,9% vào một ống nghiệm, trộn đều);

- **Bước 3:** Nhỏ 3 giọt huyết thanh của người bệnh vào ống nghiệm đã được ghi nhãn ở bước 1;

- **Bước 4:** Thêm 1 giọt hồng cầu nhóm O, 3% vào ống nghiệm trên và trộn đều;

- **Bước 5:** Thêm 3 giọt đệm LISS vào ống nghiệm trên, trộn đều;

- **Bước 6:** Ủ ống nghiệm trên ở 37°C, trong vòng 15 phút;

- **Bước 7:** Sau khi ủ quan sát hiện tượng tan máu và ngưng kết. Nếu có hiện tượng tan máu và ngưng kết, ghi kết quả là dương tính.

- **Bước 8:** Nếu không có hiện tượng tan máu và ngưng kết, rửa hồng cầu 4 lần bằng nước muối sinh lý 0,9%;

- **Bước 9:** Thêm 2 giọt thuốc thử kháng globulin vào ống nghiệm trên, trộn đều.

- **Bước 10:** Ly tâm 1000 vòng trong 20 giây;

- **Bước 11:** Với những ống nghiệm cho kết quả âm tính, nhỏ thêm 1 giọt hồng cầu chứng, trộn đều, ly tâm 1000 vòng trong 20 giây. Đọc và ghi lại kết quả vào phiếu xét nghiệm. Phản ứng phải cho kết quả ngưng kết từ 2+ đến 3+. Nếu những ống nghiệm sau khi nhỏ hồng cầu chứng mà không ngưng kết thì phải lặp lại xét nghiệm từ đầu.

**VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Kết quả nghiệm pháp Coombs gián tiếp âm tính: Không có kháng thể miễn dịch trong huyết thanh của người bệnh và người hiến máu, trên hồng cầu không có kháng nguyên tương ứng với kháng thể nhóm máu được xác định.

- Kết quả nghiệm pháp Coombs gián tiếp dương tính: Có kháng thể miễn dịch trong huyết thanh của người bệnh và người hiến máu, trên hồng cầu có kháng nguyên tương ứng với kháng thể nhóm máu được xác định.

## **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm nghiệm pháp Coombs trực tiếp.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fifth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Máu và các sản phẩm máu an toàn, quyển 3 Huyết thanh học nhóm máu, Tài liệu dịch, năm 2011.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

**ĐỊNH NHÓM MÁU HỆ Rh (D) yếu**  
**(Phương pháp ống nghiệm)**  
**Determination of D<sup>u</sup> antigen of Rh system**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Kỹ thuật xác định kháng nguyên D yếu của hệ Rh được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết và sử dụng thuốc thử kháng globulin người (huyết thanh Coombs) để xác định sự có mặt của các kháng thể D loại IgG đã được cảm nhiễm trên bề mặt hồng cầu [1].

## **II. CHỈ ĐỊNH**

*Xác định kháng nguyên D yếu của hệ Rh được chỉ định trong những trường hợp sau:*

- Xác định kháng nguyên D yếu của hệ Rh cho người bệnh;
- Xác định kháng nguyên D yếu của hệ Rh cho người hiến máu;

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### **2. Phương tiện – Hóa chất**

#### **2.1. Trang thiết bị**

Máy ly tâm thường có số vòng chính xác; Kính hiển vi; Bình cách thủy; Tủ lạnh.

#### **2.2. Dụng cụ**

Ống nghiệm thủy tinh: 12x75mm; Giá cắm ống nghiệm; khay men hình chữ nhật: 25x30 cm; Cốc thủy tinh có mỏ loại 500 ml; Bút marker; Pipet nhựa.

#### **2.3. Thuốc thử và hoá chất**

Thuốc thử Anti D loại IgG, Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất.

#### **2.4. Mẫu máu để xác định kháng nguyên D yếu của hệ Rh**

Một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

#### **2.5. Vật tư tiêu hao**

Sổ ghi kết quả; Phiếu xét nghiệm định nhóm máu; Mũ giấy; Khẩu trang; Găng tay; Quần áo công tác.

### **3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút**

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm trước khi tiến hành xét nghiệm.
2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên D yếu của hệ nhóm máu máu Rh, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm xem đã phù hợp chưa?
3. Chuẩn bị hồng cầu cần xác định kháng nguyên D yếu của hệ Rh 3% (1giọt hồng cầu khô và 29 giọt nước muối sinh lý 0,9%).
4. Chuẩn bị 1 ống nghiệm sạch, khô ghi nhãn bao gồm các thông tin của người cần xác định kháng nguyên D yếu lên ống nghiệm.
5. Tiến hành xác định kháng nguyên D yếu của hệ nhóm máu Rh [2]:
  - **Bước 1:** Nhỏ 1 giọt dung dịch hồng cầu 3% của người cần xác định kháng nguyên D yếu vào ống nghiệm đã ghi nhãn ở trên;
  - **Bước 2:** Thêm 2 giọt thuốc thử anti D loại IgG vào ống nghiệm trên, trộn đều;
  - **Bước 3:** Ủ ống nghiệm trên 30 phút ở 37°C (Nếu thêm 2 giọt dung dịch LISS vào ống nghiệm trên trước khi ủ thì chỉ cần ủ 15 phút).
  - **Bước 4:** Quan sát hiện tượng tan máu và ngưng kết, ghi lại mức độ ngưng kết.
  - **Bước 5:** Nếu không ngưng kết, rửa 4 lần bằng nước muối sinh lý 0,9%;
  - **Bước 6:** Thêm 2 giọt thuốc thử kháng globulin vào ống nghiệm trên và trộn đều. Ly tâm 1000 vòng trong 20 giây.
  - **Bước 7:** Quan sát hiện tượng tan máu và ngưng kết, ghi lại kết quả.
  - **Bước 8:** Nếu phản ứng ngưng kết, thực hiện thêm nghiệm pháp Coombs trực tiếp; nếu nghiệm pháp Coombs trực tiếp âm tính thì kết luận là hồng cầu mang kháng nguyên D yếu.
  - **Bước 9:** Nếu phản ứng không ngưng kết thì thêm 1 giọt hồng cầu chứng, trộn đều, ly tâm 1000 vòng trong 20 giây. Kết quả phải ngưng kết với mức độ từ 1+ đến 2+ thì xét nghiệm mới có giá trị.

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Nếu phản ứng ngưng kết ở giai đoạn 37°C và/ hoặc kháng globulin: Kết luận hồng cầu mang kháng nguyên D yếu.
- Nếu phản ứng không ngưng kết cả ở giai đoạn 37°C và/ hoặc kháng globulin người: Kết luận người bệnh hoặc người hiến máu có nhóm máu Rh D âm.

### Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:

- Thực hiện kiểm chứng theo quy định của thông tư 26/ 2013/TT- BYT về Hướng dẫn hoạt động truyền máu [3].

- Hướng dẫn sử dụng anti D<sup>VI</sup> loại IgG để xác định D yếu.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fifth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Máu và các sản phẩm máu an toàn, quyển 3 Huyết thanh học nhóm máu, Tài liệu dịch, năm 2011.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

**XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN C CỦA HỆ NHÓM MÁU Rh**  
**(Kỹ thuật ống nghiệm)**  
**Determination C antigen of Rh system**

**I. NGUYÊN LÝ**

Kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ nhóm máu Rh được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti C loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên C [1], [2].

**II. CHỈ ĐỊNH**

*Xác định kháng nguyên C của hệ Rh được chỉ định trong những trường hợp sau:*

- Xét nghiệm cho người bệnh;
- Xét nghiệm cho người hiến máu; Xét nghiệm để xây dựng panel hồng cầu, lực lượng hiến máu dự bị và xây dựng ngân hàng người hiến máu có nhóm máu hiếm.
- Xét nghiệm cho các nghiên cứu về hăng số và nhân chủng học.

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện**

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

**2. Phương tiện – Hóa chất**

**2.1. Trang thiết bị**

Kính hiển vi; Bình cách thủy; Tủ lạnh. Máy ly tâm thường có số vòng chính xác;

**2.2. Dụng cụ**

Ống nghiệm thủy tinh: 12x75mm; Giá cắm ống nghiệm; Khay men hình chữ nhật: 25x30 cm; Cốc thủy tinh có mỏ loại 500 ml; Bút marker; Pipet nhựa.

**2.3. Thuốc thử và hoá chất**

Thuốc thử anti C loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

**2.4. Mẫu máu để xác định kháng nguyên C của hệ Rh**

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**2.5. Vật tư tiêu hao**



Sổ ghi kết quả; Phiếu xét nghiệm định nhóm máu; Mũ giấy; Khẩu trang; Găng tay; Quần áo công tác.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

**1. Chuẩn bị đầy dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên C.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên C:** Kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu với phiếu yêu cầu xét nghiệm; Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên C của hệ nhóm máu Rh [2]**

- **Bước 1:** Chuẩn bị hồng cầu cần xác định kháng nguyên C 5% (1thể tích hồng cầu khối và 19 thể tích NaCl 0,9%);

- **Bước 2:** Nhỏ 1 giọt thuốc thử anti C loại IgM vào ống nghiệm đã chuẩn bị ở trên;

- **Bước 3:** Thêm 1 giọt hồng cầu 5% của người cần xác định kháng nguyên C vào ống nghiệm trên;

- **Bước 4:** Trộn đều, ly tâm 1000 vòng trong 20 giây.

- **Bước 5:** Đọc kết quả và ghi lại mức độ ngưng kết.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên C trên hồng cầu.

- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên C trên hồng cầu.

**Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

- Thực hiện kiểm chứng theo quy định của thông tư 26/ 2013/TT- BYT về Hướng dẫn hoạt động truyền máu [3].

- Hướng dẫn sử dụng anti C loại IgM.

- Thực hiện kỹ thuật xác định kháng nguyên C sớm sau khi lấy mẫu máu.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti C loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN c CỦA HỆ NHÓM MÁU Rh

(Kỹ thuật ống nghiệm)

Determination c antigen of Rh system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên c của hệ nhóm máu Rh được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti c loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên c [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên c của hệ Rh:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao để xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Thuốc thử anti c loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên c của hệ Rh

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị đầy dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên c.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên c**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên c với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên c của hệ nhóm máu Rh[2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti c loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên c trên hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên c trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti c loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN E CỦA HỆ NHÓM MÁU Rh

(Kỹ thuật ống nghiệm)

## Determination E antigen of Rh system

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên E của hệ nhóm máu Rh được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti E loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên E [1], [2].

### II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên E của hệ Rh:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

#### 2. Phương tiện – Hóa chất

##### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

##### 2.2. Thuốc thử và hoá chất

Thuốc thử anti E loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

##### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên E của hệ Rh

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

#### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên E.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên E**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên E với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

#### **3. Tiến hành xác định kháng nguyên E của hệ nhóm máu Rh**

Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti E loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên E trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên E trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng Anti E loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

**XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN e CỦA HỆ NHÓM MÁU Rh**  
**(Kỹ thuật ống nghiệm)**  
**Determination e antigen of Rh system**

**I. NGUYÊN LÝ**

Kỹ thuật xác định kháng nguyên e của hệ nhóm máu Rh được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti e loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên e [1], [2].

**II. CHỈ ĐỊNH**

*Xác định kháng nguyên e của hệ Rh:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện**

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

**2. Phương tiện- Hóa chất**

**2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao**

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

**2.2. Thuốc thử và hoá chất**

Thuốc thử anti e loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

**2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên e của hệ Rh**

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút**

**V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên e.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên e**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên e với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên e của hệ nhóm máu Rh [2]**

Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti e loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên e trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên e trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti e loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN K CỦA HỆ NHÓM MÁU KELL

(Kỹ thuật ống nghiệm)

Determination K antigen of Kell system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên K của hệ nhóm máu Kell được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti K loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên K [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên K của hệ Kell:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất

Thuốc thử anti K loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên K của hệ Kell

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên K.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên K**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên K với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên K của hệ nhóm máu Kell [2]**



Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti K loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên K trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên K trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti K loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN k CỦA HỆ NHÓM MÁU KELL

(Kỹ thuật ống nghiệm)

## Determination k antigen of Kell system

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên k của hệ nhóm máu Kell được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti k loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên k [1].

### II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên k của hệ Kell:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

#### 2. Phương tiện – Hóa chất

##### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

##### 2.2. Thuốc thử và hoá chất

Thuốc thử anti k loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

##### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên k của hệ Kell

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

#### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên k.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên k,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên k với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên k của hệ nhóm máu Kell [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti k loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên k trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên k trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti k loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Jk<sup>a</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU KIDD

(Kỹ thuật ống nghiệm)

Determination Jk<sup>a</sup> antigen of Kidd system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Jk<sup>a</sup> của hệ nhóm máu Kidd được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti Jk<sup>a</sup> loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Jk<sup>a</sup> [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên Jk<sup>a</sup> của hệ Kidd:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất

Thuốc thử anti Jk<sup>a</sup> loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Jk<sup>a</sup> của hệ Kidd

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên Jk<sup>a</sup>.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Jk<sup>a</sup>,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên Jk<sup>a</sup> với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên Jk<sup>a</sup> của hệ nhóm máu Kidd [2]**

Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Jk<sup>a</sup> loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Jk<sup>a</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Jk<sup>a</sup> trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Jk<sup>a</sup> loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN $Jk^b$ CỦA HỆ NHÓM MÁU KIDD

(Kỹ thuật ống nghiệm)

Determination  $Jk^b$  antigen of Kidd system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên  $Jk^b$  của hệ nhóm máu Kidd được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti  $Jk^b$  loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên  $Jk^b$  [1], 2].

## II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên  $Jk^b$  của hệ Kidd:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất

Thuốc thử anti  $Jk^b$  loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên $Jk^b$ của hệ Kidd

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên  $Jk^b$ .

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên  $Jk^b$ ,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên  $Jk^b$  với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên  $Jk^b$  của hệ nhóm máu Kidd [2]**

Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Jk<sup>b</sup> loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Jk<sup>b</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Jk<sup>b</sup> trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti JK<sup>b</sup> loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN S CỦA HỆ NHÓM MÁU MNS

(Kỹ thuật ống nghiệm)

Determination S antigen of MNS system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên S của hệ nhóm máu MNS được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti S loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên S [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên S của hệ MNS:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất

Thuốc thử anti S loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên S của hệ MNS

Gồm một ống máu tĩnh đã mạch được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên S.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên S**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên S với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên S của hệ nhóm máu MNS [2]**



Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti S loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên S trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên S trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti S loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN P1 CỦA HỆ P1PK

(kỹ thuật ống nghiệm)

## Determination P1 antigen of P1PK system

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên P1 của hệ nhóm máu P1PK được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti P1 loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên P1 [1], [2].

### II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên P1 của hệ P1PK:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

#### 2. Phương tiện – Hóa chất

##### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

##### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Thuốc thử anti P1 loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

##### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên P1 của hệ P1PK:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

#### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên P1.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên P1**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên P1 với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên P1 của hệ nhóm máu P1PK [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti P1 loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên P1 trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên P1 trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti P1 loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN $Le^a$ CỦA HỆ NHÓM MÁU LEWIS

(Phương pháp ống nghiệm)

Determination  $Le^a$  antigen of Lewis system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên  $Le^a$  của hệ nhóm máu Lewis được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti  $Le^a$  loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên  $Le^a$  [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên  $Le^a$  của hệ Lewis:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Thuốc thử anti  $Le^a$  loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên $Le^a$ của hệ Lewis:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên  $Le^a$ .

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên  $Le^a$ ,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên  $Le^a$  với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên Le<sup>a</sup> của hệ nhóm máu Lewis [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Le<sup>a</sup> loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Le<sup>a</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Le<sup>a</sup> trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Le<sup>a</sup> loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Le<sup>b</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU LEWIS

(Kỹ thuật ống nghiệm)

Determination Le<sup>b</sup> antigen of Lewis system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Le<sup>b</sup> của hệ nhóm máu Lewis được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Anti Le<sup>b</sup> loại IgM sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Le<sup>b</sup> [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên Le<sup>b</sup> của hệ Lewis* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Thuốc thử anti Le<sup>b</sup> loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Le<sup>b</sup> của hệ Lewis:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên Le<sup>b</sup>.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Le<sup>b</sup>**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên Le<sup>b</sup> với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên Le<sup>b</sup> của hệ nhóm máu Lewis [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Le<sup>b</sup> loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Le<sup>b</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Le<sup>b</sup> trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Le<sup>b</sup> loại IgM.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Kp<sup>a</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU KELL

(Kỹ thuật ống nghiệm)

## Determination Kp<sup>a</sup> antigen of Kell system

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup> của hệ nhóm máu Kell được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, sử dụng thuốc thử kháng  $\gamma$  globulin người để xác định sự có mặt của các kháng thể Kp<sup>a</sup> loại IgG đã được cảm nhiễm trên bề mặt hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Kp<sup>a</sup> [1], [2].

### II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup> của hệ Kell:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

#### 2. Phương tiện – Hóa chất

*2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

*2.2. Thuốc thử và hoá chất:*

Thuốc thử anti Kp<sup>a</sup> loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

*2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup> của hệ Kell:*

Gồm một ống máu tĩnh đã mạch được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup>.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup>,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup> với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.



### 3. Tiến hành xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup> của hệ nhóm máu Kell:

- **Bước 1:** Chuẩn bị hồng cầu cần xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup> 5% (1thể tích hồng cầu khối và 19 thể tích nước muối sinh lý 0,9%);
- **Bước 2:** Nhỏ 1 giọt thuốc thử anti Kp<sup>a</sup> vào ống nghiệm đã chuẩn bị ở trên;
- **Bước 3:** Thêm 1 giọt hồng cầu 5% của người cần xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> vào ống nghiệm trên;
- **Bước 4:** Ủ từ 15 - 20 phút ở nhiệt độ 37°C.
- **Bước 5:** Trộn đều, ly tâm 1000 vòng trong 20 giây.
- **Bước 6:** Đọc kết quả và ghi lại mức độ ngưng kết.
- **Bước 7:** Rửa 3 lần bằng nước muối sinh lý 0,9%, loại bỏ hết dịch nổi.
- **Bước 8:** Nhỏ vào ống nghiệm trên 2 giọt kháng globulin.
- **Bước 9:** Trộn đều, ly tâm 1000 vòng trong 20 giây.
- **Bước 10:** Đọc kết quả và ghi lại mức độ phản ứng, nếu phản ứng không ngưng kết, nhỏ thêm một giọt hồng cầu chứng và lặp lại bước 5 và 6. Nếu kết quả vẫn không ngưng kết là không có giá trị và phải lặp lại xét nghiệm.

### VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Kp<sup>a</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Kp<sup>a</sup> trên hồng cầu.

#### Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### Tài liệu tham khảo

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Kp<sup>a</sup> loại IgG.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Kp<sup>b</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU KELL

(Kỹ thuật ống nghiệm)

## Determination Kp<sup>b</sup> antigen of Kell system

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ nhóm máu Kell được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, sử dụng thuốc thử kháng  $\gamma$  globulin người để xác định sự có mặt của các kháng thể Kp<sup>b</sup> loại IgG đã được cảm nhiễm trên bề mặt hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Kp<sup>b</sup> [1], [2].

### II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện:

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

#### 2. Phương tiện – Hóa chất:

*2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

*2.2. Thuốc thử và hoá chất:*

Thuốc thử anti Kp<sup>b</sup> loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

*2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup>.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup>,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ nhóm máu Kell [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Kp<sup>b</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup> của hệ Kell.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Kp<sup>b</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Kp<sup>b</sup> trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Kp<sup>b</sup> loại IgG.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN M CỦA HỆ NHÓM MÁU MNS

(Kỹ thuật ống nghiệm)

## Determination M antigen of MNS system

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên M của hệ nhóm máu MNS được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, sử dụng thuốc thử kháng  $\gamma$  globulin người để xác định sự có mặt của các kháng thể M loại IgG đã được cảm nhiễm trên bề mặt hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên M [1], [2].

### II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên M của hệ MNS:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện:

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

#### 2. Phương tiện – Hóa chất

*2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

*2.2. Thuốc thử và hoá chất:*

Thuốc thử anti M loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

*2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên M của hệ MNS:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên M.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên M**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên M với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên M của hệ nhóm máu MNS [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti M loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên M trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên M trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti M loại IgG.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN N CỦA HỆ NHÓM MÁU MNS

(Kỹ thuật ống nghiệm)

## Determination N antigen of MNS system

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên N của hệ nhóm máu MNS được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, sử dụng thuốc thử kháng  $\gamma$  globulin người để xác định sự có mặt của các kháng thể N loại IgG đã được cảm nhiễm trên bề mặt hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên N [1], [2].

### II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên N của hệ MNS:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

#### 2. Phương tiện – Hóa chất

##### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

##### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Thuốc thử anti N loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

##### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên N của hệ MNS:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

#### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên N.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên N**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên N với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên N của hệ nhóm máu MNS** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti N loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên N trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên N trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti N loại IgG.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Fy<sup>a</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU DUFFY

(Kỹ thuật ống nghiệm)

Determination Fy<sup>a</sup> antigen of Duffy system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Fy<sup>a</sup> của hệ nhóm máu Duffy được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, sử dụng thuốc thử kháng  $\gamma$  globulin người để xác định sự có mặt của các kháng thể Fy<sup>a</sup> loại IgG đã được cảm nhiễm trên bề mặt hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Fy<sup>a</sup> [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên Fy<sup>a</sup> của hệ Duffy:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

*2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

*2.2. Thuốc thử và hoá chất:*

Thuốc thử anti Fy<sup>a</sup> loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

*2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Fy<sup>a</sup> của hệ Duffy:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên Fy<sup>a</sup>.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Fy<sup>a</sup>,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên Fy<sup>a</sup> với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.



**3. Tiến hành xác định kháng nguyên Fy<sup>a</sup> của hệ nhóm máu Duffy [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Fy<sup>a</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Fy<sup>a</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Fy<sup>a</sup> trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Fy<sup>a</sup> loại IgG.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN $Fy^b$ CỦA HỆ NHÓM MÁU DUFFY

(Kỹ thuật ống nghiệm)

## Determination $Fy^b$ antigen of Duffy system

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên  $Fy^b$  của hệ nhóm máu Duffy được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, sử dụng thuốc thử kháng  $\gamma$  globulin người để xác định sự có mặt của các kháng thể  $Fy^b$  loại IgG đã được cảm nhiễm trên bề mặt hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên  $Fy^b$  [1], [2].

### II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên  $Fy^b$  của hệ Duffy:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

#### 2. Phương tiện – Hóa chất

*2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

*2.2. Thuốc thử và hoá chất:*

Thuốc thử anti  $Fy^b$  loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

*2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên  $Fy^b$  của hệ Duffy:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên  $Fy^b$ .

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên  $Fy^b$ ,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên  $Fy^b$  với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên Fy<sup>b</sup> của hệ nhóm máu Duffy [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Fy<sup>b</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Fy<sup>b</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Fy<sup>b</sup> trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Fy<sup>b</sup> loại IgG.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN s CỦA HỆ NHÓM MÁU MNS

(Kỹ thuật ống nghiệm)

Determination s antigen of MNS system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên s của hệ nhóm máu MNS được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, sử dụng thuốc thử kháng  $\gamma$  globulin người để xác định sự có mặt của các kháng thể s loại IgG đã được cảm nhiễm trên bề mặt hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên s [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên s của hệ MNS:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

*2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

*2.2. Thuốc thử và hoá chất:*

Thuốc thử anti s loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

*2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên s của hệ MNS:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên s.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên s,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên s với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên s của hệ nhóm máu MNS [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti s loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên s trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên s trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti s loại IgG.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Lu<sup>a</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU LUTHERAN (Kỹ thuật ống nghiệm) Determination Lu<sup>a</sup> antigen of Lutheran system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Lu<sup>a</sup> của hệ nhóm máu Lutheran được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, sử dụng thuốc thử kháng  $\gamma$  globulin người để xác định sự có mặt của các kháng thể Lu<sup>a</sup> loại IgG đã được cảm nhiễm trên bề mặt hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Lu<sup>a</sup> [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên Lu<sup>a</sup> của hệ Lutheran:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Thuốc thử anti Lu<sup>a</sup> loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Lu<sup>a</sup> của hệ Lutheran:

Gồm một ống máu tĩnh đã mạch được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên Lu<sup>a</sup>.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Lu<sup>a</sup>,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên Lu<sup>a</sup> với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên Lu<sup>a</sup> của hệ nhóm máu Lutheran [2]:**  
Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Lu<sup>a</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Lu<sup>a</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Lu<sup>a</sup> trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Lu<sup>a</sup> loại IgG.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Lu<sup>b</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU LUTHERAN (Kỹ thuật ống nghiệm) Determination Lu<sup>b</sup> antigen of Lutheran system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Lu<sup>b</sup> của hệ nhóm máu Lutheran được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, sử dụng thuốc thử kháng  $\gamma$  globulin người để xác định sự có mặt của các kháng thể Lu<sup>b</sup> loại IgG đã được cảm nhiễm trên bề mặt hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Lu<sup>b</sup> [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên Lu<sup>b</sup> của hệ Lutheran:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của quy trình xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Thuốc thử anti Lu<sup>b</sup> loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất...

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Lu<sup>b</sup> của hệ Lutheran:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm, trang thiết bị** trước khi làm xét nghiệm. Trên ống nghiệm được đánh số hoặc ghi nhãn đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên Lu<sup>b</sup>.

**2. Nhận mẫu máu và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Lu<sup>b</sup>,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên mẫu máu cần xác định kháng nguyên Lu<sup>b</sup> với phiếu yêu cầu xét nghiệm. Kiểm tra về số lượng và chất lượng mẫu máu.

**3. Tiến hành xác định kháng nguyên Lu<sup>b</sup> của hệ nhóm máu Lutheran [2]:**



Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Lu<sup>b</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Lu<sup>b</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Lu<sup>b</sup> trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Lu<sup>b</sup> loại IgG.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

**XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN C CỦA HỆ NHÓM MÁU Rh**  
**(Phương pháp gelcard)**  
**Determination C antigen of Rh system**

**I. NGUYÊN LÝ**

Kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti C loại IgM được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên C, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgM sẽ kết hợp với anti C và cho phản ứng ngưng kết trong dung môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

**II. CHỈ ĐỊNH**

*Xác định kháng nguyên C của hệ Rh:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện**

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

**2. Phương tiện – Hóa chất**

*1.1. Trang thiết bị:*

Máy ủ gelcard chuyên dụng; Máy ly tâm gelcard chuyên dụng; Máy ly tâm ống thẳng có số vòng và thời gian chính xác để ly tâm ống máu; Tủ lạnh đựng sinh phẩm...

*1.2. Dụng cụ:*

Ống nghiệm thủy tinh: 12x75mm; Giá cắm ống nghiệm; Khay men hình chữ nhật: 25x30 cm; Bút marker; Pipet nhựa; Pipet tự động; Đầu côn các loại; Hộp đựng đầu côn; Giá đỡ gelcard.

*1.3. Thuốc thử và hoá chất:*

Kháng huyết thanh chuẩn Anti C loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

*1.4. Mẫu máu để xác định kháng nguyên C của hệ Rh:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

*1.5. Vật tư tiêu hao:*

Sổ ghi kết quả; Phiếu xét nghiệm định nhóm máu; Mũ giấy; Khẩu trang; Găng tay; Quần áo công tác.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ** trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000 µl dung dịch LISS và 5 µl hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên C** của người cần xác định kháng nguyên C, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên C của hệ Rh [2]:**

- **Bước 1:** Ghi đầy đủ thông tin của người bệnh/ người hiến máu lên tấm gelcard.

- **Bước 2:** Mở tấm bảo vệ phủ lên các cột gel theo đúng quy định.

- **Bước 3:** Nhỏ 40 µl dung dịch hồng cầu bệnh nhân/ người hiến máu 0,5% đã chuẩn bị ở trên vào giếng gelcard đã được ghi nhãn.

- **Bước 4:** Thêm 20 µl anti C loại IgM vào giếng gelcard trên.

- **Bước 5:** Ly tâm gelcard bằng máy ly tâm chuyên dụng trong 10 phút.

- **Bước 6:** Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên C trên bề mặt hồng cầu.

- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên C trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn xác định kháng nguyên C loại IgM bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN c CỦA HỆ NHÓM MÁU Rh

(Phương pháp gelcard)

Determination c antigen of Rh system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti c loại IgM được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên c, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgM sẽ kết hợp với anti C và cho phản ứng ngưng kết trong dung môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên c của hệ Rh:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Kháng huyết thanh chuẩn Anti c loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên c của hệ Rh:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

*1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên C** của người cần xác định kháng nguyên C, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên c của hệ Rh [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti c loại IgM, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên c trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên c trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti c loại IgM bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN E CỦA HỆ NHÓM MÁU Rh

(Phương pháp gelcard)

Determination E antigen of Rh system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên E của hệ Rh bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti E loại IgM được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên E, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgM sẽ kết hợp với anti E và cho phản ứng ngưng kết trong dung môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên E của hệ Rh:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Kháng huyết thanh chuẩn Anti E loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên E của hệ Rh:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

*1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khối của bệnh nhân/ người hiến máu).

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên E** của người cần xác định kháng nguyên E, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên E của hệ Rh [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti E loại IgM, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên E trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên E trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti E loại IgM bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

**XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN e CỦA HỆ NHÓM MÁU Rh**  
**(Phương pháp gelcard)**  
**Determination e antigen of Rh system**

**I. NGUYÊN LÝ**

Kỹ thuật xác định kháng nguyên e của hệ Rh bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti e loại IgM được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên e, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgM sẽ kết hợp với anti e và cho phản ứng ngưng kết trong dung môi trường có ái lực cao ở 37°C [2].

**II. CHỈ ĐỊNH**

*Xác định kháng nguyên C của hệ Rh:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện**

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

**2. Phương tiện – Hóa chất**

*2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

*2.2. Thuốc thử và hoá chất:*

Kháng huyết thanh chuẩn Anti e loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

*2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên e của hệ Rh:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút**

**V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

*1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).



**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên e** của người cần xác định kháng nguyên e, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên e của hệ Rh [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti e loại IgM, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên e trên bề mặt hồng cầu.

- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên e trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti e loại IgM bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN K CỦA HỆ NHÓM MÁU KELL

(Phương pháp gelcard)

Determination K antigen of Kell system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên K của hệ Kell bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti K loại IgM được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên K, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgM sẽ kết hợp với anti K và cho phản ứng ngưng kết trong dung môi trường có ái lực cao ở 37°C [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên K của hệ Kell:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Anti K loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên K của hệ Kell

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. *Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khối của bệnh nhân/ người hiến máu).

2. *Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên K* của người cần xác định kháng nguyên K, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên K của hệ Kell [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti K loại IgM, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên K trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên K trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti K loại IgM bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN k CỦA HỆ NHÓM MÁU KELL

(Phương pháp gelcard)

Determination k antigen of Kell system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên k của hệ Kell bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti k loại IgM được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên k, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgM sẽ kết hợp với anti k và cho phản ứng ngưng kết trong dung môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên k của hệ Kell:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Anti k loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên k của hệ Kell:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. *Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

2. *Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên k* của người cần xác định kháng nguyên k, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên k của hệ Kell [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti k loại IgM, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên k trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên k trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti k loại IgM bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Kp<sup>a</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU KELL

(Phương pháp gelcard)

Determination Kp<sup>a</sup> antigen of Kell system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup> của hệ Kell bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti Kp<sup>a</sup> loại IgG được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Kp<sup>a</sup>, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti Kp<sup>a</sup> và cho phản ứng ngưng kết trong môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup> của hệ Kell:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

*2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

*2.2. Thuốc thử và hoá chất:*

Anti Kp<sup>a</sup> loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

*2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup> của hệ Kell:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

*1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

*2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Kp<sup>a</sup>,* kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên Kp<sup>a</sup> của hệ Kell [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Kp<sup>a</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Kp<sup>a</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Kp<sup>a</sup> trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Kp<sup>a</sup> loại IgM bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Kp<sup>b</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU KELL

(Phương pháp gelcard)

Determination Kp<sup>b</sup> antigen of Kell system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti Kp<sup>b</sup> loại IgG được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Kp<sup>b</sup>, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti Kp<sup>b</sup> và cho phản ứng ngưng kết trong dung môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

*2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

*2.2. Thuốc thử và hoá chất:*

Anti Kp<sup>b</sup> loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

*2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

*1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

*2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup>* của người cần xác định kháng nguyên Kp<sup>b</sup>, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.



**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên Kp<sup>b</sup> của hệ Kell [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Kp<sup>b</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Kp<sup>b</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Kp<sup>b</sup> trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Kp<sup>b</sup> loại IgG bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Fy<sup>a</sup> CỦA NHÓM MÁU HỆ DUFFY

(Phương pháp gelcard)

Determination Fy<sup>a</sup> antigen of Duffy system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Fy<sup>a</sup> của hệ Duffy bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti Fy<sup>a</sup> loại IgG được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Fy<sup>a</sup>, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti Fy<sup>a</sup> và cho phản ứng ngưng kết trong dung môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên Fy<sup>a</sup> của hệ Duffy:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

2.1. *Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

2.2. *Thuốc thử và hoá chất:*

Anti Fy<sup>a</sup> loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

2.3. *Mẫu máu để xác định kháng nguyên Fy<sup>a</sup> của hệ Duffy:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. **Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ** trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

2. **Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Fy<sup>a</sup>**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên Fy<sup>a</sup> của hệ Duffy [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Fy<sup>a</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Fy<sup>a</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Fy<sup>a</sup> trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Fy<sup>a</sup> loại IgG bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Fy<sup>b</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU DUFFY

(Phương pháp gelcard)

Determination Fy<sup>b</sup> antigen of Duffy system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Fy<sup>b</sup> của hệ Duffy bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti Fy<sup>b</sup> loại IgG được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Fy<sup>b</sup>, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti Fy<sup>b</sup> và cho phản ứng ngưng kết trong dung môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên Fy<sup>b</sup> của hệ Duffy:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Anti Fy<sup>b</sup> loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Fy<sup>b</sup> của hệ Duffy:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. *Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

2. *Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Fy<sup>b</sup>*, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên Fy<sup>b</sup> của hệ Duffy [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Fy<sup>b</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Fy<sup>b</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Fy<sup>b</sup> trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Fy<sup>b</sup> loại IgG bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Jk<sup>a</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU KIDD

(Phương pháp gelcard)

Determination Jk<sup>a</sup> antigen of Kidd system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Jk<sup>a</sup> của hệ Kidd bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti Jk<sup>a</sup> loại IgG được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Jk<sup>a</sup>, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti Jk<sup>a</sup> và cho phản ứng ngưng kết trong dung môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên Jk<sup>a</sup> của hệ Kidd:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Anti Jk<sup>a</sup> loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Jk<sup>a</sup> của hệ Kidd:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. *Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

2. *Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Jk<sup>a</sup>*, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên Jk<sup>a</sup> của hệ Kidd [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Jk<sup>a</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Jk<sup>a</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Jk<sup>a</sup> trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Jk<sup>a</sup> loại IgG bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Jk<sup>b</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU KIDD

(Phương pháp gelcard)

Determination Jk<sup>b</sup> antigen of Kidd system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Jk<sup>b</sup> của hệ Kidd bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti Jk<sup>b</sup> loại IgG được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Jk<sup>b</sup>, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti Jk<sup>b</sup> và cho phản ứng ngưng kết trong môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên Jk<sup>b</sup> của hệ Duffy:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Anti Jk<sup>b</sup> loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Jk<sup>b</sup> của hệ Kidd:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. *Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

2. *Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Jk<sup>b</sup>*, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.



**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên Jk<sup>b</sup> của hệ Kidd [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Jk<sup>b</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Jk<sup>b</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Jk<sup>b</sup> trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Jk<sup>b</sup> loại IgG bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN $Le^a$ CỦA HỆ NHÓM MÁU LEWIS

(Phương pháp gelcard)

Determination  $Le^a$  antigen of Lewis system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên  $Le^a$  của hệ Lewis bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti  $Le^a$  loại IgM có sẵn trong tấm gelcard sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên  $Le^a$  sau khi tấm gelcard được ly tâm [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên  $Le^a$  của hệ Lewis:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

*2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

*2.2. Thuốc thử và hoá chất:*

Tấm gelcard đã có sẵn anti  $Le^a$  loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất.

*2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên  $Le^a$  của hệ Lewis:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

*1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 5% (500  $\mu$ l dung dịch hòa loãng I và 25  $\mu$ l hồng cầu khối của bệnh nhân/ người hiến máu, trộn đều, ủ dịch treo hồng cầu 10 phút ở nhiệt độ từ 18 - 25°C). Sử dụng hồng cầu đã ủ trên trong vòng 15 phút.

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên  $Le^a$**  cần xác định kháng nguyên  $Le^a$ , kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên  $Le^a$  của hệ Lewis[2]:**

- **Bước 1:** Ghi đầy đủ thông tin của người bệnh/ người hiến máu lên tấm gelcard.
- **Bước 2:** Mở tấm bảo vệ phủ lên các cột gel theo đúng quy định.
- **Bước 3:** Thêm 10 hoặc 12,5  $\mu$ l dung dịch hồng cầu bệnh nhân/ người hiến máu 5% đã chuẩn bị ở trên vào giếng gelcard đã có sẵn anti  $Le^a$ .
- **Bước 4:** Ly tâm gelcard bằng máy ly tâm chuyên dụng trong 10 phút.
- **Bước 5:** Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên  $Le^a$  trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên  $Le^a$  trên hồng cầu.

**Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti  $Le^a$  loại IgM bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN $Le^b$ CỦA HỆ NHÓM MÁU LEWIS

(Phương pháp gelcard)

Determination  $Le^b$  antigen of Lewis system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên  $Le^b$  của hệ Lewis bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti  $Le^b$  loại IgM có sẵn trong tấm gelcard sẽ gây ngưng kết trực tiếp hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên  $Le^b$  sau khi tấm gelcard được ly tâm [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên  $Le^b$  của hệ Lewis:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

*2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:*

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

*2.2. Thuốc thử và hoá chất:*

Tấm gelcard có sẵn anti  $Le^b$  loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất.

*2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên  $Le^b$  của hệ Lewis:*

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

*1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khối của bệnh nhân/ người hiến máu).

*2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên  $Le^b$ ,* kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên  $Le^b$  của hệ Lewis [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti  $Le^b$  loại IgM, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên  $Le^b$  của hệ Lewis bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên  $Le^b$  trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên  $Le^b$  trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti  $Le^b$  loại IgM bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN s CỦA HỆ NHÓM MÁU MNS

(Phương pháp gelcard)

Determination s antigen of MNS system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên s của hệ MNS bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti s loại IgG được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên s, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti s và cho phản ứng ngưng kết trong môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên s của hệ MNS:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Anti s loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên s của hệ MNS:

Gồm một ống máu tĩnh mạch được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. *Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

2. *Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên s*, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên s của hệ MNS [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Fy<sup>a</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên s trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên s trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti s loại IgG bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN S CỦA HỆ NHÓM MÁU MNS

(Phương pháp gelcard)

Determination S antigen of MNS system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên S của hệ MNS bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti S loại IgM được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên S, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti S và cho phản ứng ngưng kết trong môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên S của hệ MNS:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Anti S loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên S của hệ MNS:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. *Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

2. *Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên S*, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.



**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên S của hệ MNS [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti S loại IgM, các bước tiến hành tương tự như các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên S trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên S trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti S loại IgM bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN M CỦA HỆ NHÓM MÁU MNS

(Phương pháp gelcard)

Determination M antigen of MNS system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên M của hệ MNS bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti M loại IgG được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên M, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti M và cho phản ứng ngưng kết trong môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên M của hệ MNS:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất

Anti M loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên M của hệ MNS

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

*1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

*2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên M*, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên M của hệ MNS [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti M loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên M trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên M trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti M loại IgG bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN N CỦA HỆ NHÓM MÁU MNS

(Phương pháp gelcard)

Determination N antigen of MNS system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên N của hệ MNS bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti M loại IgG được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên M, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti M và cho phản ứng ngưng kết trong môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên M của hệ MNS:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện - Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất

Anti N loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên N của hệ MNS

Gồm một ống máu tĩnh mạch được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ** trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên N**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên N của hệ MNS [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti N loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

#### **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên N trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên N trên hồng cầu.

#### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

#### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti N loại IgG bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Lu<sup>a</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU LUTHERAN (Phương pháp gelcard) Determination Lu<sup>a</sup> antigen of Lutheran system

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Lu<sup>a</sup> của hệ Lutheran bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti Lu<sup>a</sup> loại IgG được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Lu<sup>a</sup>, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti Lu<sup>a</sup> và cho phản ứng ngưng kết trong môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

**Xác định kháng nguyên Lu<sup>a</sup> của hệ Lutheran:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

#### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Anti Lu<sup>a</sup> loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

#### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên Lu<sup>a</sup> của hệ Lutheran:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ** trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Lu<sup>a</sup>,** kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên Lu<sup>a</sup> của hệ Lutheran [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Lu<sup>a</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Lu<sup>a</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Lu<sup>a</sup> trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co, LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Lu<sup>a</sup> loại IgG bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

**XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN Lu<sup>b</sup> CỦA HỆ NHÓM MÁU LUTHERAN**  
**(Phương pháp gelcard)**  
**Determination Lu<sup>b</sup> antigen of Lutheran system**

**I. NGUYÊN LÝ**

Kỹ thuật xác định kháng nguyên Lu<sup>b</sup> của hệ Lutheran bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti Lu<sup>b</sup> loại IgG được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên Lu<sup>b</sup>, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgG sẽ kết hợp với anti Lu<sup>b</sup> và cho phản ứng ngưng kết trong môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

**II. CHỈ ĐỊNH**

**Xác định kháng nguyên Lu<sup>b</sup> của hệ Lutheran:** Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện**

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

**2. Phương tiện – Hóa chất**

2.1. *Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:* Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

2.2. *Thuốc thử và hoá chất:* Anti Lu<sup>b</sup> loại IgG; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

2.3. *Mẫu máu để xác định kháng nguyên Lu<sup>b</sup> của hệ Lutheran:* Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

**3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút**

**V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

1. **Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ** trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

2. **Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên Lu<sup>b</sup>**, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.



**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên Lu<sup>b</sup> của hệ Lutheran [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti Lu<sup>b</sup> loại IgG, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên Lu<sup>b</sup> trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên Lu<sup>b</sup> trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng anti Lu<sup>b</sup> loại IgG bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN P1 CỦA HỆ NHÓM MÁU P1PK

(Phương pháp gelcard)

## Determination P1 antigen of P1PK system

### I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên P1 của hệ P1Pk bằng phương pháp gelcard có nguyên lý như sau: Anti P1 loại IgM được cảm nhiễm với hồng cầu của những cá thể mang kháng nguyên P1, các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng là anti-IgM sẽ kết hợp với anti P1 và cho phản ứng ngưng kết trong môi trường có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

### II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên P1 của hệ P1PK:* Được chỉ định giống như chỉ định xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật ống nghiệm).

### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

### IV. CHUẨN BỊ

#### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

#### 2. Phương tiện – Hóa chất

##### 2.1. Trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao:

Giống như trang thiết bị, dụng cụ, vật tư tiêu hao của kỹ thuật xác định kháng nguyên C của hệ Rh (Kỹ thuật gelcard).

##### 2.2. Thuốc thử và hoá chất:

Anti P1 loại IgM; Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất; Tấm gelcard.

##### 2.3. Mẫu máu để xác định kháng nguyên P1 của hệ P1PK:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

#### 3. Thời gian làm xét nghiệm: 60 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. *Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ* trước khi tiến hành xét nghiệm. Chuẩn bị dung dịch hồng cầu 0,5% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 5  $\mu$ l hồng cầu khô của bệnh nhân/ người hiến máu).

2. *Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên P1*, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Tiến hành định nhóm kháng nguyên P1 của hệ P1Pk [2]:** Được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng anti P1 loại IgM, các bước tiến hành tương tự với các bước xác định kháng nguyên C của hệ Rh bằng kỹ thuật gelcard.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên P1 trên bề mặt hồng cầu.
- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên P1 trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn sử dụng anti P1 loại IgM bằng kỹ thuật gelcard.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# XÁC ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN D TỪNG PHẦN (D<sup>VI</sup>)

(Phương pháp gelcard)

Determination part D antigen (D<sup>VI</sup>)

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật xác định kháng nguyên D<sup>VI</sup> từng phần của hệ Rh bằng phương pháp gelcard được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết. Những hồng cầu đã được cảm nhiễm với các kháng thể D<sup>VI</sup> sẽ kết hợp với các kháng  $\gamma$  globulin tương ứng có trong dung dịch đệm có ái lực cao ở 37°C [1], [2].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xác định kháng nguyên D từng phần (D<sup>VI</sup>) của hệ Rh được chỉ định trong những trường hợp sau:*

- Xét nghiệm cho người bệnh;
- Xét nghiệm cho người hiến máu;

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên, điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị:

Máy ủ gelcard chuyên dụng; Máy ly tâm gelcard chuyên dụng; Máy ly tâm ống thẳng có số vòng và thời gian chính xác để ly tâm ống máu; Tủ lạnh đựng sinh phẩm...

#### 2.2. Dụng cụ:

Ống nghiệm thủy tinh: 12x75mm; Giá cắm ống nghiệm; khay men hình chữ nhật: 25x30 cm; Bút marker; Pipet nhựa; Pipet tự động; Đầu côn các loại; Hộp đựng đầu côn; Giá đỡ gelcard.

#### 2.3. Thuốc thử và hoá chất:

Tấm gelcard có sẵn anti D<sup>VI</sup> Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất.

#### 2.4. Mẫu máu để xác định kháng nguyên D từng phần của hệ Rh:

Gồm một ống máu tĩnh mạch đã được chống đông bằng EDTA: 2 ml.

#### 2.5. Vật tư tiêu hao:

Sổ ghi kết quả; Phiếu xét nghiệm định nhóm máu; Mũ giấy; Khẩu trang; Găng tay; Quần áo công tác.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm đầy đủ** trước khi tiến hành xét nghiệm.

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu xác định kháng nguyên D từng phần ( $D^{VI}$ )** của người cần xác định kháng nguyên D từng phần, kiểm tra và đối chiếu các thông tin trên ống máu và phiếu xét nghiệm cho phù hợp.

**3. Chuẩn bị 1 ống nghiệm sạch, khô** ghi đầy đủ thông tin của người cần xác định kháng nguyên D từng phần lên nhãn ống nghiệm để pha dung dịch hồng cầu 0,8% (1000  $\mu$ l dung dịch LISS và 10  $\mu$ l hồng cầu khối của bệnh nhân/ người hiến máu).

**4. Tiến hành định nhóm kháng nguyên D từng phần của hệ Rh [2]:**

- **Bước 1:** Ghi đầy đủ thông tin của người bệnh/ người hiến máu lên tấm gelcard đã có sẵn kháng huyết thanh  $D^{VI}$

- **Bước 2:** Mở tấm bảo vệ phủ lên các cột gel theo đúng quy định.

- **Bước 3:** Nhỏ 50  $\mu$ l dung dịch hồng cầu bệnh nhân/ người hiến máu 0.8% đã chuẩn bị ở trên vào giếng gelcard đã được ghi nhãn.

- **Bước 4:** Ủ tấm gelcard 15 phút ở 37°C trong máy ủ chuyên dụng.

- **Bước 5:** Ly tâm gelcard bằng máy ly tâm chuyên dụng trong 10 phút.

- **Bước 6:** Đọc kết quả theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Phản ứng ngưng kết: Có kháng nguyên  $D^{VI}$  trên hồng cầu;

- Phản ứng không ngưng kết: Không có kháng nguyên  $D^{VI}$  trên hồng cầu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

Giống như những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm xác định kháng nguyên C của hệ Rh.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Geoff Daniels and Imelda Bromilow (2009), Essential Guide to Blood Groups, Blackwell.
2. Hướng dẫn xác định kháng nguyên  $D^{VI}$  của hãng DiaMed, Thụy Sĩ.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# SÀNG LỌC KHÁNG THỂ BẤT THƯỜNG

(Phương pháp ống nghiệm)

Screening irregular antibodies

## I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật sàng lọc kháng thể bất thường được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể sẽ xảy ra nếu trong huyết thanh của người bệnh, sản phụ và người hiến máu có kháng thể đặc hiệu với các kháng nguyên có trên bề mặt các hồng cầu sàng lọc kháng thể bất thường [1].

## II. CHỈ ĐỊNH

*Xét nghiệm sàng lọc kháng thể bất thường được chỉ định trong những trường hợp sau:*

- Xét nghiệm cho người hiến máu;
- Xét nghiệm cho người bệnh mà trong quá trình điều trị được tiên lượng sẽ phải truyền máu;
- Xét nghiệm định kỳ cho người bệnh đã được truyền máu nhiều lần (7 ngày làm xét nghiệm một lần).

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Bác sĩ; cử nhân; kỹ thuật viên; điều dưỡng trung học.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1. Trang thiết bị:

Máy ly tâm loại thông thường; Kính hiển vi; Bình cách thủy; tủ lạnh.

#### 2.2 Dụng cụ:

Ống nghiệm thủy tinh: 12x75mm; Giá cầm ống nghiệm; Khay men hình chữ nhật: 25x30 cm; Cốc thủy tinh có mỏ loại 500 ml; Bút marker; Pipet nhựa.

#### 2.3. Thuốc thử và hoá chất:

Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất, bộ panel hồng cầu sàng lọc kháng thể bất thường của Viện Huyết học Truyền máu trung ương; Kháng  $\gamma$  globulin người; dung dịch LISS.

#### 2.4. Mẫu bệnh phẩm:

- Ống máu chống đông bằng EDTA: 2 ml.

- Ống máu không chống đông: 5 ml.

#### 2.5. Vật tư tiêu hao:

Sổ ghi kết quả; Phiếu xét nghiệm; Mũ giấy; Khẩu trang; Găng tay; Quần áo công tác.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm** trước khi tiến hành xét nghiệm.

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu làm xét nghiệm** sàng lọc kháng thể bất thường cho người bệnh, kiểm tra và đối chiếu các thông tin của người bệnh trên ống máu và phiếu xét nghiệm

**2. Chuẩn bị:** Ly tâm ống máu không chống đông của người bệnh để tách huyết thanh (2000 vòng/phút x 3 phút). Chuẩn bị hồng cầu 5% (1giọt hồng cầu khối của người bệnh + 19 giọt nước muối sinh lý 0,9%).

**4. Tiến hành kỹ thuật qua các giai đoạn sau [1], [2]:**

a. **Giai đoạn I:** (Điều kiện 22°C):

- **Bước 1:** Chuẩn bị 4 ống nghiệm sạch và ghi nhãn thứ tự từ O<sub>1</sub> đến O<sub>3</sub> và một ống để làm chứng tự thân; Ghi đầy đủ thông tin của người bệnh;

- **Bước 2:** Nhỏ 2 giọt huyết thanh của người bệnh lần lượt vào các ống nghiệm đã được ghi nhãn ở trên;

- **Bước 3:** Thêm 1 giọt hồng cầu panel sàng lọc kháng thể bất thường O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> 5% lần lượt vào 3 ống nghiệm tương ứng, trộn đều;

- **Bước 4:** Ly tâm 1000 vòng/phút trong vòng 20 giây.

- **Bước 5:** Quan sát hiện tượng ngưng kết và tan máu và ghi lại kết quả.

b. **Giai đoạn II** (Điều kiện 37°C và kháng globulin người):

- **Bước 1:** Ủ tiếp các ống nghiệm trên ở bình cách thủy 37°C trong vòng 30 phút (nếu thêm 2 giọt LISS vào ống nghiệm trước khi ủ thì chỉ ủ 15 phút).

- **Bước 2:** Ly tâm 1000 vòng trong 20 giây. Quan sát hiện tượng ngưng kết và tan máu và ghi lại kết quả.

- **Bước 3:** Rửa ống nghiệm trên 3 lần bằng nước muối 0,9%.

- **Bước 4:** Thêm 2 giọt kháng globulin người vào các ống nghiệm trên.

- **Bước 5:** Ly tâm 1000 vòng trong 20 giây.

- **Bước 6:** Quan sát hiện tượng ngưng kết và tan máu và ghi lại kết quả.

- **Bước 7:** Với những ống nghiệm cho kết quả âm tính, nhỏ thêm 1 giọt hồng cầu chứng.

- **Bước 8:** Ly tâm các ống nghiệm trên 1000 vòng trong 20 giây.
- **Bước 9:** Đọc kết quả và ghi lại mức độ ngưng kết. Phản ứng phải dương tính từ 2+ đến 3+. Nếu những ống nghiệm nào sau khi nhỏ hồng cầu chứng mà âm tính thì phải làm lại xét nghiệm từ đầu.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Nếu huyết thanh của người bệnh/ người hiến máu cho kết quả ngưng kết với 1 hoặc cả 2, 3 hồng cầu panel sàng lọc kháng thể bất thường và/hoặc ngưng kết với 1 trong 3 điều kiện nhiệt độ hoặc tất cả các điều kiện, nhiệt độ: Kết quả xét nghiệm sàng lọc kháng thể bất thường dương tính.
- Nếu huyết thanh của người bệnh/người hiến máu không ngưng kết với cả 3 hồng cầu panel sàng lọc kháng thể bất thường và ở cả 3 điều kiện, nhiệt độ: Kết quả xét nghiệm sàng lọc kháng thể bất thường âm tính.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

- Thực hiện kiểm chứng theo quy định của thông tư 26/ 2013/TT- BYT về Hướng dẫn hoạt động truyền máu [3].
- Đọc kỹ và tuân thủ đúng các bước tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm hiện đang sử dụng;

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng AHG loại IgG.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.



**SÀNG LỌC KHÁNG THỂ BẤT THƯỜNG**  
**(Phương pháp Scangel/gelcard)**  
**Screening irregular antibodies**

**I. NGUYÊN LÝ**

Kỹ thuật sàng lọc kháng thể bất thường được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể sẽ xảy ra nếu trong huyết thanh của người bệnh, sản phụ và người hiến máu có các kháng thể đặc hiệu với các kháng nguyên tương ứng có trên bề mặt các hồng cầu sàng lọc kháng thể bất thường.

**II. CHỈ ĐỊNH**

*Xét nghiệm sàng lọc kháng thể bất thường được chỉ định trong những trường hợp sau:*

- Xét nghiệm cho người hiến máu;
- Xét nghiệm cho người bệnh mà trong quá trình điều trị được tiên lượng sẽ phải truyền máu;
- Xét nghiệm định kỳ cho người bệnh đã được truyền máu nhiều lần (7 ngày làm xét nghiệm một lần).

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện**

Bác sĩ; cử nhân; kỹ thuật viên; điều dưỡng trung học.

**2. Phương tiện – Hóa chất**

*2.1. Trang thiết bị:*

Máy ly tâm chuyên dụng Scangel.; Máy ủ chuyên dụng Scangel.; Tủ lạnh dụng sinh phẩm, Máy ly tâm ống thẳng.

*2.2 Dụng cụ:*

Ống nghiệm thủy tinh: 12x75mm; Giá cắm ống nghiệm; Khay men hình chữ nhật: 25x30 cm; Cốc thủy tinh có mỏ loại 500 ml; Bút marker; Pipette tự động, đầu côn các loại.

*2.3 Thuốc thử và hoá chất:*

Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất, Bộ panel hồng cầu sàng lọc kháng thể bất thường của Viện Huyết học Truyền máu trung ương; Tấm gelcard AHG (Coombs) và tấm gelcard Neutral.

#### 2.4. Mẫu bệnh phẩm:

- Ống máu chống đông bằng EDTA: 2 ml.
- Ống máu không chống đông: 5 ml.

#### 2.5. Vật tư tiêu hao:

Sổ ghi kết quả; Phiếu xét nghiệm; Mũ giấy; Khẩu trang; Găng tay; Quần áo công tác. Phiếu xét nghiệm sàng lọc kháng thể bất thường.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 60 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm** trước khi tiến hành xét nghiệm.

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu làm xét nghiệm** sàng lọc kháng thể bất thường cho người bệnh, kiểm tra và đối chiếu các thông tin của người bệnh trên ống máu và phiếu xét nghiệm. Kiểm tra số lượng, chất lượng mẫu máu.

**3. Chuẩn bị mẫu huyết thanh và hồng cầu panel sàng lọc kháng thể bất thường 0,8%:** Ly tâm ống máu không chống đông của người bệnh để tách huyết thanh (2000 vòng/phút x 3 phút). Chuẩn bị hồng cầu sàng lọc kháng thể bất thường và hồng cầu người bệnh 0,8% trong dung dịch LISS (1.000 µl dung dịch LISS và 10 µl hồng cầu khối O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> và O<sub>3</sub> và hồng cầu khối của bệnh nhân).

#### 4. Các bước tiến hành kỹ thuật

*a. Sàng lọc kháng thể bất thường ở điều kiện nhiệt độ phòng 22°C:*

- **Bước 1:** Đánh số thứ tự từ O<sub>1</sub> đến O<sub>3</sub> và một để làm chứng tự thân lên tấm gelcard nước muối (O<sub>4</sub>). ghi thông tin bệnh nhân và ngày làm xét nghiệm lên tấm gelcard.
- **Bước 2:** Mở tấm bảo vệ phủ lên các cột gel theo đúng quy định.
- **Bước 3:** Nhỏ lần lượt 50 µl dung dịch hồng cầu panel sàng lọc kháng thể bất thường 0,8% (O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub> và O<sub>3</sub>) đã chuẩn bị ở trên vào các giếng gelcard tương ứng thứ tự.
- **Bước 4:** Nhỏ 50 µl dung dịch hồng cầu bệnh nhân 0,8% đã chuẩn bị ở trên vào giếng gelcard tự chứng (O<sub>4</sub>).
- **Bước 5:** Nhỏ thêm 25 µl huyết thanh của người bệnh vào tất cả các giếng gelcard trên.
- **Bước 6:** Ủ tấm gelcard ở nhiệt độ phòng trong vòng 15 phút.
- **Bước 7:** Ly tâm tấm gelcard trong 10 phút bằng máy quay ly tâm gelcard chuyên dụng.
- **Bước 8:** Đọc kết quả theo hướng dẫn của công ty sản xuất sinh phẩm.

**b. Sàng lọc kháng thể bất thường ở 37°C và kháng globulin người:**

- **Bước 1:** Đánh số thứ tự từ O<sub>1</sub> đến O<sub>3</sub> và 1 giếng tên người bệnh lên tấm gelcard AHG. ghi thông tin bệnh nhân và ngày làm xét nghiệm lên tấm gelcard.

- **Bước 2:** Mở tấm bảo vệ phủ lên các cột gel theo đúng quy định.

- **Bước 3:** Nhỏ lần lượt 50 µl dung dịch hồng cầu panel sàng lọc kháng thể bất thường 0,8% đã chuẩn bị ở trên vào các giếng gelcard tương ứng đã được đánh số thứ tự từ O<sub>1</sub> đến O<sub>3</sub>.

- **Bước 4:** Nhỏ 50 µl dung dịch hồng cầu bệnh nhân 0,8% đã chuẩn bị ở trên vào giếng gelcard O<sub>4</sub>.

- **Bước 5:** Nhỏ thêm 25 µl huyết thanh của người bệnh vào tất cả các giếng gelcard trên.

- **Bước 6:** Ủ tấm gelcard ở 37°C 15 phút bằng máy ủ gelcard chuyên dụng.

- **Bước 7:** Ly tâm tấm gelcard 10 phút bằng máy ly tâm chuyên dụng.

- **Bước 8:** Đọc kết quả theo hướng dẫn của công ty sản xuất sinh phẩm.

**VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Nếu phản ứng ngưng kết với 1 hoặc cả 2, 3 hồng cầu panel sàng lọc kháng thể bất thường, ngưng kết với 1 trong 3 điều kiện nhiệt độ và/hoặc cả 3 điều kiện, nhiệt độ: Kết quả xét nghiệm sàng lọc kháng thể bất thường dương tính.

- Nếu phản ứng không ngưng kết với cả 3 hồng cầu panel sàng lọc kháng thể bất thường, với cả 3 điều kiện, nhiệt độ: Kết quả xét nghiệm sàng lọc kháng thể bất thường âm tính.

**Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

1. Thực hiện kiểm chứng theo quy định của thông tư 26/ 2013/TT- BYT về Hướng dẫn hoạt động truyền máu [3].
2. Đọc kỹ và tuân thủ đúng các bước tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm hiện đang sử dụng;

**Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng AHG Gel Card và Neutral Gel Card của Công ty TULIP DIAGNOSTICS, Ấn Độ.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# **ĐỊNH DANH KHÁNG THỂ BẤT THƯỜNG**

**(Phương pháp ống nghiệm)**

**Identification irregular antibodies**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Kỹ thuật định danh kháng thể bất thường được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể sẽ xảy ra nếu trong huyết thanh của người bệnh hoặc sản phụ có kháng thể đặc hiệu với các kháng nguyên có trên bề mặt các hồng cầu định danh kháng thể bất thường.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

*Xét nghiệm định danh kháng thể bất thường được chỉ định trong những trường hợp sau:*

- Người hiến máu có kết quả xét nghiệm sàng lọc kháng thể bất thường dương tính;
- Người bệnh có kết quả xét nghiệm sàng lọc kháng thể bất thường dương tính.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

Bác sĩ; cử nhân; kỹ thuật viên; điều dưỡng trung học.

### **2. Phương tiện – Hóa chất**

#### *2.1. Trang thiết bị:*

Máy ly tâm loại thông thường; Kính hiển vi; Bình cách thủy; tủ lạnh.

#### *2.2 Dụng cụ:*

Ống nghiệm thủy tinh: 12x75mm; Giá cắm ống nghiệm; Khay men hình chữ nhật: 25x30 cm; Cốc thủy tinh có mỏ loại 500 ml; Bút marker; Pipet nhựa.

#### *2.3. Thuốc thử và hoá chất:*

Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất, bộ panel hồng cầu định danh kháng thể bất thường của Viện Huyết học Truyền máu trung ương; Kháng globulin người; dung dịch LISS.

#### *2.4. Mẫu bệnh phẩm:*

- Ống máu chống đông bằng EDTA: 2 ml.
- Ống máu không chống đông: 5 ml.

#### *2.5. Vật tư tiêu hao:*

Sổ ghi kết quả; Phiếu xét nghiệm; Mũ giấy; Khẩu trang; Găng tay; Quần áo công tác.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 120 phút

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm** trước khi tiến hành xét nghiệm.

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu làm xét nghiệm** định danh kháng thể bất thường cho người hiến máu/người bệnh, kiểm tra và đối chiếu các thông tin của người bệnh/ NHM trên ống máu và phiếu xét nghiệm.

**3. Chuẩn bị:** Ly tâm ống máu không chống đông của người bệnh để tách huyết thanh (2000 vòng/phút x 3 phút). Chuẩn bị hồng cầu 5% (1giọt hồng cầu khối của người bệnh + 19 giọt nước muối sinh lý 0,9%).

**4. Tiến hành kỹ thuật qua các giai đoạn sau [1], [2]**

**a. Định danh kháng thể bất thường ở 22°C:**

- **Bước 1:** Chuẩn bị 11 ống nghiệm sạch và ghi nhãn thứ tự từ O<sub>1</sub> đến O<sub>10</sub> và một ống để làm chứng tự thân; Ghi đầy đủ thông tin của người bệnh;

- **Bước 2:** Nhỏ 2 giọt huyết thanh của người bệnh lần lượt vào các ống nghiệm đã được ghi nhãn ở trên;

- **Bước 3:** Thêm 1 giọt hồng cầu panel sàng lọc kháng thể bất thường từ O<sub>1</sub>, đến O<sub>10</sub> lần lượt vào 10 ống nghiệm tương ứng; Thêm 1 giọt hồng cầu người bệnh vào ống tự chứng, trộn đều;

- **Bước 4:** Ly tâm 1000 vòng trong 20 giây.

- **Bước 5:** Quan sát hiện tượng ngưng kết và tan máu. Ghi lại kết quả.

**b. Định danh kháng thể bất thường ở 37°C và kháng globulin người:**

- **Bước 1:** Ủ tiếp các ống nghiệm trên ở bình cách thủy 37°C trong 30 phút (nếu thêm 2 giọt đệm LISS vào ống nghiệm trước khi ủ thì chỉ ủ 15 phút).

- **Bước 2:** Ly tâm 1000 vòng trong 20 giây. Quan sát hiện tượng ngưng kết và tan máu, ghi lại kết quả.

- **Bước 3:** Rửa ống nghiệm trên 3 lần bằng nước muối 0,9%.

- **Bước 4:** Thêm 2 giọt kháng globulin người vào các ống nghiệm trên.

- **Bước 5:** Ly tâm 1000 vòng/phút trong vòng 20 giây.

- **Bước 6:** Quan sát hiện tượng ngưng kết và tan máu, ghi lại kết quả.

- **Bước 7:** Với những ống nghiệm cho kết quả âm tính, nhỏ thêm 1 giọt hồng cầu chứng. Ly tâm các ống nghiệm trên 1000 vòng trong 20 giây.

- **Bước 8:** Đọc kết quả và ghi lại mức độ ngưng kết. Phản ứng phải dương tính từ 2+ đến 3+. Nếu những ống nghiệm nào sau khi nhỏ hồng cầu chứng mà âm tính thì phải làm lại xét nghiệm từ đầu.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Dựa trên kết quả và mức độ ngưng kết giữa huyết thanh của người bệnh/ người hiến máu với các hồng cầu panel định danh kháng thể bất thường trong từng giai đoạn xét nghiệm ở trên để xác định tên của các kháng thể bất thường.

- Định nhóm kháng nguyên cho người hiến máu/ người bệnh, kết quả kháng nguyên nhóm máu tương ứng với kháng thể bất thường khi được xác định phải không có trên bề mặt hồng cầu người bệnh/ người hiến máu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

1. Thực hiện kiểm chứng theo quy định của thông tư 26/ 2013/TT- BYT về Hướng dẫn hoạt động truyền máu [3].
2. Đọc kỹ và tuân thủ đúng các bước tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm hiện đang sử dụng;

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng AHG của Công ty TULIP DIAGNOSTICS, Ấn Độ.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# **ĐỊNH DANH KHÁNG THỂ BẤT THƯỜNG**

**(Phương pháp gelcard)**

**Identification irregular antibodies**

## **I. NGUYÊN LÝ**

Kỹ thuật định danh kháng thể bất thường được dựa trên nguyên lý của phản ứng ngưng kết, phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể sẽ xảy ra nếu trong huyết thanh của người bệnh hoặc sản phụ có kháng thể đặc hiệu với các kháng nguyên tương ứng có trên bề mặt các hồng cầu định danh kháng thể bất thường.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

*Xét nghiệm định danh kháng thể bất thường được chỉ định trong những trường hợp sau:*

- Người hiến máu có kết quả xét nghiệm sàng lọc kháng thể bất thường dương tính;
- Người bệnh có kết quả xét nghiệm sàng lọc kháng thể bất thường dương tính;

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

Bác sĩ; cử nhân; kỹ thuật viên; điều dưỡng trung học.

### **2. Phương tiện – Hóa chất**

#### *2.1. Trang thiết bị:*

Máy ly tâm chuyên dụng Scangel.; Máy ủ chuyên dụng Scangel.; Tủ lạnh dụng sinh phẩm, Máy ly tâm ống thẳng.

#### *2.2 Dụng cụ:*

Ống nghiệm thủy tinh: 12x75mm; Giá cắm ống nghiệm; Khay men hình chữ nhật: 25x30 cm; Cốc thủy tinh có mỏ loại 500 ml; Bút marker; Pipette tự động, đầu côn các loại.

#### *2.3 Thuốc thử và hoá chất:*

Nước muối sinh lý 0,9%; Nước cất, Bộ panel hồng cầu định danh kháng thể bất thường của Viện Huyết học Truyền máu trung ương; Tấm gelcard AHG (Coombs) và tấm gelcard Neutral.

#### *2.4. Mẫu bệnh phẩm:*

- Ống máu chống đông bằng EDTA: 2 ml.

- Ống máu không chống đông: 5 ml.

#### 2.5. Vật tư tiêu hao:

Sổ ghi kết quả; Phiếu xét nghiệm; Mũ giấy; Khẩu trang; Găng tay; Quần áo công tác.

**3. Thời gian làm xét nghiệm:** 120 phút

### V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**1. Chuẩn bị dụng cụ, hoá chất, sinh phẩm** trước khi tiến hành xét nghiệm.

**2. Nhận bệnh phẩm và phiếu yêu cầu làm xét nghiệm** định danh kháng thể bất thường cho người bệnh, kiểm tra và đối chiếu các thông tin của người bệnh trên ống máu và phiếu xét nghiệm. Kiểm tra số lượng, chất lượng mẫu máu.

**3. Chuẩn bị mẫu huyết thanh và hồng cầu người bệnh và hồng cầu định danh kháng thể bất thường 0,8%** (1.000 µl dung dịch LISS và 10 µl hồng cầu khối O<sub>1</sub> đến O<sub>10</sub> và hồng cầu khối của bệnh nhân). Ly tâm ống máu không chống đông của người bệnh để tách huyết thanh (2000 vòng/phút x 3 phút).

**4. Các bước tiến hành kỹ thuật [1], [2]**

**a. Định danh kháng thể bất thường ở điều kiện nhiệt độ phòng 22°C:**

- **Bước 1:** Đánh số thứ tự từ O<sub>1</sub> đến O<sub>10</sub> và một giếng để làm chứng tự thân lên tấm gelcard nước muối, ghi thông tin bệnh nhân và ngày làm xét nghiệm lên tấm gelcard.

- **Bước 2:** Mở tấm bảo vệ phủ lên các cột gel theo đúng quy định.

- **Bước 3:** Nhỏ lần lượt 50 µl dung dịch hồng cầu panel định danh kháng thể bất thường 0,8% đã chuẩn bị ở trên vào các giếng gelcard tương ứng thứ tự từ O<sub>1</sub> đến O<sub>10</sub>.

- **Bước 4:** Nhỏ 50 µl dung dịch hồng cầu bệnh nhân 0,8% đã chuẩn bị ở trên vào giếng gelcard chứng tự thân.

- **Bước 5:** Nhỏ thêm 25 µl huyết thanh của người bệnh vào tất cả các giếng gelcard trên.

- **Bước 6:** Ủ tấm gelcard ở nhiệt độ phòng trong vòng 15 phút.

- **Bước 7:** Ly tâm tấm gelcard trong vòng 10 phút bằng máy quay ly tâm gelcard chuyên dụng.

- **Bước 8:** Đọc kết quả theo hướng dẫn của công ty sản xuất sinh phẩm.

**b. Định danh kháng thể bất thường ở 37°C và kháng globulin người:**

- **Bước 1:** Đánh số thứ tự từ O<sub>1</sub> đến O<sub>10</sub> và 1 giếng chứng tự thân lên tấm gelcard AHG. ghi thông tin bệnh nhân và ngày làm xét nghiệm lên tấm gelcard.



- **Bước 2:** Mở tấm bảo vệ phủ lên các cột gel theo đúng quy định.
- **Bước 3:** Nhỏ lần lượt 50 µl dung dịch hồng cầu panel sàng lọc kháng thể bất thường 0,8% đã chuẩn bị ở trên vào các giếng gelcard tương ứng đã được đánh số thứ tự từ O<sub>1</sub> đến O<sub>10</sub>.
- **Bước 4:** Nhỏ 50 µl dung dịch hồng cầu bệnh nhân 0,8% đã chuẩn bị ở trên vào giếng gelcard chứng tự thân.
- **Bước 5:** Nhỏ thêm 25 µl huyết thanh của người bệnh vào tất cả các giếng gelcard trên.
- **Bước 6:** Ủ tấm gelcard ở 37°C 15 phút bằng máy ủ gelcard chuyên dụng.
- **Bước 7:** Ly tâm tấm gelcard 10 phút bằng máy ly tâm chuyên dụng.
- **Bước 8:** Đọc kết quả theo hướng dẫn của Nhà sản xuất sinh phẩm.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Dựa trên kết quả và mức độ ngưng kết giữa huyết thanh của người bệnh/ người hiến máu với các hồng cầu panel định danh kháng thể bất thường trong từng giai đoạn xét nghiệm ở trên để xác định tên của các kháng thể bất thường.
- Định nhóm kháng nguyên cho người hiến máu/ người bệnh, kết quả kháng nguyên nhóm máu tương ứng với kháng thể bất thường khi được xác định phải không có trên bề mặt hồng cầu người bệnh/ người hiến máu.

### **Những điểm cần chú ý khi làm xét nghiệm:**

- Thực hiện kiểm chứng theo quy định của thông tư 26/ 2013/TT- BYT về Hướng dẫn hoạt động truyền máu [3].
- Đọc kỹ và tuân thủ đúng các bước tiến hành kỹ thuật theo hướng dẫn của nhà sản xuất sinh phẩm hiện đang sử dụng;

### **Tài liệu tham khảo**

1. Denise M Harmening (1999) Modern blood banking and transfusion practices, fourth edition, Book Promotion & Service Co., LTD.
2. Hướng dẫn sử dụng AHG Gel Card và Neutral Gel Card.
3. Thông tư 26/2013/TT- BYT đã được ban hành ngày 16/9/2013 về Hướng dẫn hoạt động truyền máu.

# **GẶN TẾ BÀO MÁU TỪ MÁU NGOẠI VI**

(Dành cho người hiến máu thành phần)

## **I. NGUYÊN LÝ**

Kỹ thuật gạn tách tế bào máu từ máu ngoại vi (Kỹ thuật Apheresis) là một quy trình từ lấy máu toàn phần từ người hiến máu (đối tượng) vào một thiết bị để ly tâm phân tách các thành phần của máu và thu nhận một thành phần tế bào máu theo yêu cầu và truyền trả các thành phần còn lại cho đối tượng.

Hệ thống máy gạn tách tế bào máu có 2 loại: Sử dụng kỹ thuật dòng chảy ngắt quãng (có 1 đường vừa lấy máu ra và trả về) và sử dụng kỹ thuật dòng chảy liên tục (đường lấy máu ra và trả về khác nhau).

Các loại máy gạn tách thành phần máu tự động.

Các sản phẩm gạn tách tế bào máu: Khối hồng cầu, tiểu cầu, bạch cầu...

## **II. CHỈ ĐỊNH**

- Tình nguyện hiến thành phần tế bào máu gạn tách;
- Đạt tiêu chuẩn về hiến thành phần máu;
- Tình trạng ven tốt.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

- Không đạt các tiêu chuẩn về hiến thành phần máu;
- Tình trạng ven không cho phép.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

- Cán bộ được đào tạo về gạn tách tế bào máu: 1 bác sĩ và 1 kỹ thuật viên;
- Rửa tay thường quy, đi găng cao su.

### **2. Phương tiện**

- Máy gạn tách thành phần máu tự động.
- Bộ thu nhận tiểu cầu phù hợp (máy và thành phần gạn tách)
- Chất chống đông ACD-A
- Dụng cụ sát trùng: Bông cotton iod, panh, băng dính, bơm tiêm 5ml;
- Bút marker, bút viết, barcode;
- Máy đo huyết áp đồng hồ/dây ga rô, quả bóp...

### **3. Đối tượng**

- Tiếp nhận và giải thích quy trình;
- Chuẩn bị tư thế nằm và tay sẽ thực hiện lấy ven.

#### **4. Hồ sơ**

- Phiếu đăng ký hiến máu, các phiếu xét nghiệm;
- Phiếu theo dõi chương trình gạn tách tế bào máu.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

#### **1. Kiểm tra hồ sơ**

- Kiểm tra các thông tin hành chính;
- Kết quả tổng phân tích máu, nhóm máu, xét nghiệm HBsAg...
- Kiểm tra lại mạch; huyết áp và tình trạng lâm sàng.

#### **2. Thực hiện kỹ thuật**

Bước 1: Bật máy và chọn chương trình

Bước 2: Lắp đặt bộ thu nhận tế bào

- Lắp đặt bộ thu nhận: Theo các bước CBC;
- Kết nối bộ thu nhận với túi ACD (và NaCl 0,9%);
- Thực hiện đuổi khí và tráng dung dịch chống đông (ACD-A).

Bước 3: Nhập chỉ số và chọn kết quả dự kiến

- Giới tính; Cân nặng; Chiều cao; Hematocrit; Số lượng tiểu cầu/bạch cầu;
- Chọn kết quả dự kiến sẽ gạn tách.

Bước 4: Kết nối với đối tượng

- Quấn băng đo huyết áp trên khuỷu tay và bơm ở huyết áp trung bình;
- Chọn vị trí chọc ven, sát trùng, lấy ven và cố định kim.

Bước 5: Lấy mẫu máu xét nghiệm

- Mở khoá để máu vào túi xét nghiệm khoảng 8ml và đóng khoá;
- Lấy máu xét nghiệm vào ống đông và ống chống đông.
- Bấm nút để bắt đầu chương trình gạn tách.

Bước 6: Máy thực hiện gạn tách tế bào máu

- Máy thực hiện gạn tách theo chương trình lựa chọn;
- Kết thúc gạn tách tế bào máu;
- Trả máu còn lại trong bộ kít về cho đối tượng.

Bước 7: Kết thúc chương trình chạy máy:

- Dừng máy;
- Khóa các van vào, ra và các túi chứa sản phẩm;
- Rút kim ra khỏi đối tượng;
- Tháo kít ra khỏi máy;
- Hàn dây và tách túi sản phẩm ra khỏi bộ kít;

- Ghi chép kết quả chương trình gạn tách và thủ tục hành chính.

**Bước 8:** Lấy mẫu kiểm tra chất lượng khối tế bào máu thu nhận

- Lắc đều túi tế bào máu gạn tách;
- Lấy 3-4 ml sản phẩm vào túi đựng và lấy mẫu kiểm tra chất lượng.

**Bước 9:** Kết thúc và bàn giao:

- Ghi lại kết quả vào hồ sơ;
- Ký tên người thực hiện;
- Bàn giao khối tế bào gạn tách, mẫu xét nghiệm.

## **VI. THEO DÕI**

- Theo dõi diễn biến các thông số của đối tượng;
- Theo dõi diễn biến trong quá trình vận hành của máy;
- Theo dõi kết quả gạn tách tế bào máu;
- Ghi hồ sơ theo dõi.

## **VII. NHỮNG TAI BIẾN VÀ XỬ TRÍ**

Các trường hợp phản ứng hầu hết do quá nhạy cảm, có yếu tố tâm lý: Sự chuẩn bị tư tưởng không tốt, sự lo lắng của đối tượng...

a/- Các biểu hiện phản ứng bất thường:

- *Nhẹ*: Biểu hiện xây xẩm nhưng không mất đi sự nhận biết;
- *Vừa*: Có sự tăng nhanh của phản ứng nhẹ và dẫn đến sự mất nhận biết;
  - *Nặng*: Có các biểu hiện trên kèm theo sự co giật (ít gặp).

b/- Xử trí các trường hợp phản ứng trung bình và nặng:

- Không tiếp tục thực hiện gạn tách;
- Nhấc cao chân và hạ thấp đầu của người hiến máu;
- Nói lỏng hoặc cởi những áo quá chặt, tạo không khí thoáng;
- Trường hợp đối tượng bị nôn: Nằm nghiêng, có đồ chứa chất nôn;
- Kiểm tra biểu hiện ngoài và mạch thường xuyên;
- Nếu tình trạng tốt lên cho đối tượng uống nước mát, nghỉ ngơi đầy đủ;
- Đảm bảo đối tượng hồi phục hoàn toàn trước khi rời nơi thực hiện kỹ thuật;
- Trường hợp các cơn co giật kéo dài hơn 5 phút, đây là tình trạng cấp cứu, bác sĩ phải có mặt và có thể tiêm Diazepam vào tĩnh mạch.
- Ghi lại phản ứng vào hồ sơ.

### **Ghi chú:**

Đây là quy trình kỹ thuật gạn tách tế bào máu từ máu ngoại vi chung cho các máy, trình tự một số bước và yêu cầu cụ thể có thể khác nhau phụ thuộc vào:

- Hệ thống máy gạn tách khác nhau;
- Loại tế bào gạn tách có quy trình khác nhau.

**CHƯƠNG V.**  
**KỸ THUẬT CÔNG NGHỆ TẾ BÀO GỐC ỨNG DỤNG TRONG Y HỌC**  
**(Applications of Stem cell techniques in Medicine)**

**TUYỂN CHỌN NGƯỜI CHO VÀ HUY ĐỘNG TẾ BÀO GỐC**  
**MÁU NGOẠI VI**

**I. NGUYÊN LÝ**

Tuyển chọn người khỏe mạnh để đảm bảo chiết tách đủ số lượng tế bào gốc (TBG) tối thiểu cần truyền cho người bệnh là  $\geq 3 \times 10^6$  tế bào CD34+/kg cân nặng người bệnh nếu ghép đồng loại.

Tuyển chọn người bệnh (Đa u tủy xương, U lympho không Hodgkin và Hodgkin, Lơ xê mi cấp dòng tủy) đủ tiêu chuẩn ghép để gạn tế bào gốc với số lượng  $\geq 2 \times 10^6$  nếu ghép tự thân.

**II. CHỈ ĐỊNH**

- Ghép tế bào gốc tạo máu tự thân điều trị bệnh: Đa u tủy xương, U lympho không Hodgkin, Hodgkin và lơ xê mi cấp dòng tủy...

- Ghép tế bào gốc tạo máu đồng loại điều trị các bệnh máu: Suy tủy xương, Đái huyết sắc tố niệu kịch phát ban đêm, Lơ xê mi cấp và kinh dòng bạch cầu hạt, Rối loạn sinh tủy...

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

**1. Người hiến khỏe mạnh**

Bất cứ tiêu chí nào dưới đây:

- Phụ nữ có thai hoặc đang cho con bú;
- Tuổi dưới 10 hoặc trên 60;
- Cân nặng  $\geq 20$ kg;
- Có bệnh lý về gan, thận, phổi và tim;
- Mắc các bệnh lý ác tính khác có nguy cơ tái phát hay tiến triển trong vòng 5 năm.

**2. Người hiến là người bệnh**

- Tuổi trên 65 đối với Đa u tủy xương và U lympho ác tính; trên 50 tuổi đối với lơ xê mi cấp;
- Thể trạng người bệnh kém;

- Người bệnh không đáp ứng với hoá chất khi điều trị vòng 2 hoặc không đạt lui bệnh hoàn toàn đối với nhóm lơ xê mi cấp;
- Người bệnh có các bệnh lý về gan, thận, phổi và bệnh tim;
- Người nhà và người bệnh không đồng ý ghép.

#### **IV. CHUẨN BỊ**

##### **1. Người thực hiện:**

- Bác sĩ;
- Điều dưỡng;
- Kỹ thuật viên.

##### **2. Phương tiện - Hóa chất**

###### **2.1 Phương tiện**

- Bơm tiêm;
- Máy tách tế bào....;
- Máy bảo quản âm sâu tế bào gốc.

###### **2.2. Hóa chất**

- Hóa chất xét nghiệm: làm các xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu, HLA, sinh hóa, vi sinh....;
- Thuốc: G-CSF, canxi, dung dịch Natrclurua 0,9%;

##### **3. Người hiến tế bào gốc**

Được giải thích kỹ về mục đích tiến hành kiểm tra lựa chọn và quy trình tiến hành gạn tácg tế bào gốc. Người cho tế bào gốc được theo dõi và kiểm tra định kỳ trong và sau khi tiến hành gạn tế bào gốc.

##### **4. Phiếu xét nghiệm**

- Tổng phân tích tế bào máu ngoại vi và túi tế bào gốc;
- Sinh hóa;
- HLA cho ghép tủy;
- Phiếu xét nghiệm HBV, HCV, HIV;
- Anti CMV (IgG, IgM), anti EBV (IgG, IgM);
- Phiếu siêu âm;
- Đếm CD34 máu ngoại vi và túi tế bào gốc;
- Các xét nghiệm đặc thù khác: tỷ lệ tế bào 1 nhân, cấy túi tế bào gốc

#### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

## **1. Quy trình chọn người hiến tế bào gốc; huy động, thu gom và bảo quản tế bào gốc từ người hiến**

### **1.1. Tiêu chuẩn chọn người hiến**

#### **1.1.1. Tiêu chuẩn chọn người hiến ghép TBG đồng loại.**

Những người hiến có các tiêu chuẩn sau được lựa chọn hiến tế bào gốc để ghép cho người bệnh:

- Tuổi trên 10 hoặc dưới 60;
- Cân nặng  $\geq 20\text{kg}$ .
- Anh, chị em ruột của người bệnh phù hợp về HLA-A, B và DR, tối thiểu 5/6 allel với người bệnh;
- Không bị nhiễm HBV, HCV và HIV;
- Hoàn toàn khỏe mạnh, không mắc các bệnh mạn tính.

#### **1.1.2. Tiêu chuẩn chọn người bệnh ghép TBG tự thân gạn TBG.**

##### **1.1.2.1. Đa u tủy xương**

- Sau điều trị tấn công đạt lui bệnh hoàn toàn hoặc lui bệnh một phần, chưa điều trị thuốc ảnh hưởng đến TBG như melphalan...

- Thể trạng lâm sàng tốt.
- Không có các bệnh về thần kinh, tâm thần, gan, thận, tim, phổi.

##### **1.1.2.2. U lympho không Hodgkin (ULPKH)**

- Thể trạng lâm sàng tốt.
- Không có các bệnh về thần kinh, tâm thần, gan, thận, tim, phổi;
- Thời điểm chỉ định ghép: tùy từng thể như sau:

+ ULPKH thể tiến triển [4]:

- DLBCL, PTCL, ALCL: chỉ định ghép tự thân khi kháng với điều trị từ đầu hoặc sau khi tái phát điều trị vòng 2 có đáp ứng hoá chất.
- MCL: chỉ định ghép tự thân ngay sau khi điều trị tấn công đạt lui bệnh.
- ULPKH tế bào T: sau đáp ứng với hoá chất vòng 1 hoặc sau tái phát điều trị cứu vãn vòng 2 có đáp ứng với hoá chất.

+ ULPKH thể âm thầm: ULP thể nang, ULP tế bào dạng lympho và plasmô, ULP tổ chức lympho liên quan màng nhày, ULP tế bào lympho nhỏ và ULP thể vùng rìa lách: chỉ định ghép tự thân cho các trường hợp tái phát điều trị cứu vãn vòng 2 còn đáp ứng với hoá chất.

##### **1.1.2.3. Bệnh Hodgkin**



- Thời điểm chỉ định ghép tự thân: ở các người bệnh kháng thuốc hoặc sau tái phát.

- Thể trạng lâm sàng tốt.

- Không có các bệnh về thần kinh, tâm thần, gan, thận, tim, phổi..

#### *1.1.2.4. Lơ xê mi cấp dòng tủy*

- Chân đoán lơ xê mi cấp dòng tủy nhóm nguy cơ trung bình hoặc cao sau điều trị lui bệnh hoàn toàn đợt 1 hoặc nhóm nguy cơ thấp tái phát điều trị đạt lui bệnh hoàn toàn đợt 2.

- Thể trạng lâm sàng tốt.

- Không có các bệnh về thần kinh, tâm thần, gan, thận, tim, phổi.

### ***1.2. Các xét nghiệm trước ghép của người hiến khỏe mạnh***

#### **Bước 1:**

+ Xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu, các xét nghiệm về chức năng gan thận của người hiến;

+ Xét nghiệm định nhóm HLA-A, B, DR anh, chị em ruột bằng kỹ thuật sinh học phân tử;

+ Xét nghiệm các xét nghiệm về HBV, HCV, HIV bằng kỹ thuật ELISA.

#### **Bước 2:** Nếu phù hợp HLA

+ Xét nghiệm CMV (IgG, IgM) và EBV (IgG, IgM) bằng kỹ thuật ELISA;

+ Định nhóm máu hệ ABO, Rh, phenotype;

+ Siêu âm kiểm tra tổng quát người hiến.

### ***1.3. Các xét nghiệm trước ghép của người bệnh***

+ Xét nghiệm tủy đồ và sinh thiết tủy xương.

+ Các xét nghiệm đánh giá lui bệnh của người bệnh đa u tủy xương, u lympho không Hodgkin và Hodgkin và lơ xê mi cấp dòng tủy.

## **2. Quy trình chiết tách người cho tế bào gốc: huy động, thu gom và bảo quản tế bào gốc.**

### ***2.1. Người hiến khỏe mạnh***

*2.1. Huy động người hiến tế bào gốc được tiêm dưới da G-CSF 10 $\mu$ g/kg cân nặng/ngày, chia hai lần.*

*2.2. Tiến hành kiểm tra số lượng bạch cầu hàng ngày và số lượng tế bào CD34+ sau khi tiêm G-CSF và ngày thứ 4 bằng máy flow cytometry. Khi số lượng tế bào CD34+ đạt trên 10 tế bào/ $\mu$ l.*

## 2.2. Người bệnh

- Huy động TBG ở người bệnh: có một số phương pháp sau:

+ Kích bạch cầu G-CSF đơn thuần: với liều 10 µg/kg/ngày chia 2 lần cách nhau mỗi 12 giờ. Đếm số lượng bạch cầu hàng ngày và số lượng tế bào CD34+ từ ngày thứ 4. Khi số lượng tế bào CD34+ > 10 tế bào/µl thì tiến hành gạn TBG máu ngoại vi. Thường đỉnh huy động đạt cao nhất sau huy động G-CSF đơn thuần là ngày thứ 4-5.

+ Phối hợp hoá chất và G-CSF: thường chỉ định khi tiên lượng huy động kém nếu chỉ sử dụng G-CSF đơn thuần (tỷ lệ xảy ra từ 5-30%), và thường do một số nguyên nhân sau: đã điều trị trước đó bằng những thuốc ảnh hưởng đến tế bào gốc, người bệnh lớn tuổi, đã điều trị tia xạ và có tế bào ác tính xâm lấn tuỷ xương.

\* Với đa u tuỷ xương: Cyclophosphamide (liều 2g/m<sup>2</sup>, 1 lần) phối hợp với G-CSF ( thường bắt đầu từ ngày thứ 6 sau điều trị hoá chất). Thời điểm đạt huy động tế bào gốc cao nhất phụ thuộc tính cá thể từng người bệnh, thông thường sau 10-20 ngày kể từ khi bắt đầu điều trị hoá chất.

\* Với U lympho Hodgkin và không Hodgkin: sau đợt điều trị cứu vãn những người bệnh tái phát hoặc sau đợt cuối điều trị tấn công bằng các phác đồ : ICE, IEV, DHAP hoặc ESHAP kết hợp G-CSF để huy động tế bào gốc.

+ Plerixafor (AMD3100): đơn thuần hay phối hợp G-CSF hoặc phối hợp hoá chất.

## VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Tuyển chọn được người hiến khỏe mạnh phù hợp HLA tối thiểu 5/6 allen.

- Tuyển chọn được người bệnh đủ điều kiện để gạn TBG.

- Ghép đồng loại: Thu gom đủ số lượng tế bào gốc tối thiểu 3x10<sup>6</sup> tế bào CD 34+/kg cân nặng người bệnh.

- Ghép tự thân: Thu gom đủ số lượng tế bào gốc tối thiểu 2x10<sup>6</sup> tế bào CD 34+/kg cân nặng người bệnh cho một lần ghép.

## VII. TÁC DỤNG PHỤ VÀ XỬ TRÍ

- Tác dụng phụ ở người hiến khi sử dụng G-CSF: đau xương, đau đầu, tăng LDH, acid uric, tăng huyết áp, lách to. Xử trí bằng giảm đau, hạ huyết áp.

- Tác dụng phụ ở người hiến trong khi thu gom tế bào gốc: đau đầu, tê vùng môi, chuột rút, rét run. Xử trí bằng truyền canxi, corticoid.

## **THU NHẬN MÁU DÂY RÓN** (Umbilical cord blood collection)

### **I. NGUYÊN LÝ**

Lấy máu từ bánh rau và dây rốn sau đẻ thai qua tĩnh mạch dây rốn vào túi đeo có chất chống đông ngay sau khi cắt rốn của trẻ.

Nguồn gốc kỹ thuật: theo quy trình kỹ thuật của Hiệp hội Ngân hàng máu Mỹ (AABB).

### **II. CHỈ ĐỊNH**

#### **1. Với sản phụ**

- Đồng ý cho việc lưu giữ máu dây rốn của con mình trên cơ sở đã được tư vấn và hướng dẫn đầy đủ về lợi ích, mục đích và các quy trình sẽ thực hiện;

- Không có các bệnh lý kèm theo trước khi sinh: bệnh bẩm sinh, bệnh lao, bệnh ung thư, bệnh tự miễn, bệnh tâm thần và các bệnh lý về sản khoa;

- Các xét nghiệm sàng lọc HIV, HBV, HCV, CMV-IgM, giang mai có kết quả âm tính;

- Không có các tai biến sản khoa;

- Không sốt trong lúc chuyển dạ (< 38°C).

#### **2. Với thai nhi**

- Tuổi thai trên 36 tuần;

- Sinh trước 24h tính từ lúc vỡ ối;

- Cân nặng trẻ sơ sinh  $\geq 2800$  g.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

#### **1. Vi phạm một hoặc nhiều các tiêu chuẩn chỉ định trên**

#### **2. Sau khi sinh**

- Đa thai (đối với thu thập cho ngân hàng máu dây rốn cộng đồng);

- Trẻ có dị tật bẩm sinh khi sinh ra;

- Dây rốn quá ngắn, bị đứt rời, dập nát, hư hỏng;

- Bánh rau bị nghi ngờ nhiễm trùng lúc thu thập (thu thập sau sổ rau).

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

Được đào tạo phù hợp để thực hiện kỹ thuật.

## **2. Phương tiện - Hóa chất**

### **2.1. Dụng cụ**

- Xe thu thập mẫu;
- Bộ thu thập và túi thu thập máu dây rốn;
- Quần áo, mũ, khẩu trang vô trùng;
- Gạc hấp, găng tay vô trùng;
- Cân khối lượng nhỏ từ 0 - 500 gram;
- Ống xét nghiệm có chất chống đông EDTA;
- Phiếu thu thập máu dây rốn, các loại bút viết;

### **2.2. Hóa chất**

- Cồn 70° và cồn iod (Povidine);
- Dung dịch rửa tay nhanh;
- Dung dịch sát khuẩn mặt bàn, dụng cụ xét nghiệm.

**3. Phiếu xét nghiệm:** Phiếu thu thập máu dây rốn, các loại bút viết;

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Tư vấn sản phụ và các thủ tục trước khi sinh**

- Sản phụ đã được tư vấn về vấn đề lưu trữ máu dây rốn sau khi sinh theo mẫu phiếu tư vấn cho sản phụ về tế bào gốc máu dây rốn;

- Sản phụ điền thông tin và ký vào các biểu mẫu theo hướng dẫn.

### **2. Thu thập máu dây rốn**

Tùy theo diễn biến của cuộc đẻ và ý kiến của bác sĩ đỡ đẻ, tiến hành thu thập máu dây rốn trước hoặc sau sổ rau thai.

#### **2.1. Thu thập máu dây rốn trước sổ rau thai**

- Chuẩn bị bộ dụng cụ thu thập, túi thu thập, gạc tẩm Povidine;
- Sau khi kẹp và cắt dây rốn như thao tác đỡ đẻ thông thường;
- Sát trùng bề mặt dây rốn bằng Povidine (từ dây rốn tới bánh rau thai);
- Hạ thấp đầu dây rốn và chọc kim của túi thu thập vào tĩnh mạch dây rốn;
- Lắc túi thu thập để máu trộn đều với dung dịch chống đông;
- Thu thập hết máu trong dây rốn;
- Kẹp dây túi thu thập và rút kim ra;
- Lắc nhẹ nhàng túi thu thập để trộn đều máu với dung dịch chống đông;

- Vuốt sạch máu trong đường dây của túi vào túi máu bằng kim vuốt, kẹp hoặc thắt dây nhằm tránh máu tràn ngược vào dây và chảy ra ngoài;
- Lấy máu tĩnh mạch của sản phụ cho vào ống nghiệm có chất chống đông;
- Điền đầy đủ thông tin yêu cầu vào phiếu thu thập.

## **2.2. Thu thập máu dây rốn sau mổ rau thai**

- Chuẩn bị xe thu thập, bộ dụng cụ thu thập, để khay một bên, khăn treo bánh rau một bên, gạc miếng để trên khăn treo và chia đôi: ½ gạc miếng được tẩm cồn 70° và ½ được tẩm Povidine;
- Ngay sau khi mổ rau thai, đặt bánh rau thai, dây rốn vào khay vô trùng và chuyển ngay về xe thu thập;
- Đặt bánh rau vào khăn có lỗ đặc biệt và treo bánh rau lên một giá cao sao cho dây rốn thông xuống dưới;
- Sát trùng bề mặt dây rốn bằng gạc tẩm cồn và povidine;
- Chọc kim của túi thu thập vào tĩnh mạch dây rốn;
- Lắc nhẹ túi thu thập để máu trộn đều với chất chống đông;
- Thu thập hết máu trong dây rốn;
- Kẹp dây túi thu thập và rút kim ra;
- Lắc nhẹ nhàng túi thu thập để trộn đều máu với dung dịch chống đông;
- Vuốt sạch máu trong đường dây của túi vào túi máu bằng kim vuốt, kẹp hoặc thắt dây nhằm tránh máu tràn ngược vào dây và chảy ra ngoài;
- Lấy máu tĩnh mạch của sản phụ vào ống nghiệm có chất chống đông;
- Điền đầy đủ thông tin yêu cầu vào phiếu thu thập.

## **3. Loại trừ một số trường hợp sau khi thu thập**

- Lượng máu dây rốn thu thập được quá thấp (< 60 gram đối với mẫu hiến hoặc < 30 gram đối với mẫu gửi dịch vụ);
- Sai phạm trong quá trình bảo quản, vận chuyển mẫu;
- Mẫu máu dây rốn nghi ngờ nhiễm trùng lúc thu thập.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- 1. Julie G. Allickson, PhD, MS, MT.** *Umbilical cord blood collection. Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation, Bethesda, MD:AABB, 2009, chapter 24, p.278-290.*

## **THU NHẬN TẾ BÀO GỐC TỪ MÁU NGOẠI VI SAU HUY ĐỘNG** (Peripheral blood stem cell collection)

### **I. NGUYÊN LÝ**

Các thành phần của máu toàn phần có tỷ trọng và độ nhớt khác nhau nên khi ly tâm sẽ phân tách thành các lớp khác nhau. Quy trình sử dụng hệ thống máy gạn tách tự động để ly tâm phân tách các thành phần của máu, thu nhận lớp tế bào đơn nhân có chứa tế bào gốc và truyền trả người cho các thành phần còn lại. Các hệ thống máy tự động được sử dụng gạn tách tế bào gốc từ máu ngoại vi hiện có như: Cobe Spectra, Optia Spectra, Comtec Fresenius...

Nguồn gốc kỹ thuật: theo hướng dẫn của máy và quy trình của Hiệp hội Ngân hàng máu Mỹ (AABB).

### **II. CHỈ ĐỊNH**

- Đạt tiêu chuẩn về hiến tế bào gốc;
- Tình trạng lâm sàng và tĩnh mạch cho phép thực hiện thủ thuật.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

- Không đạt các tiêu chuẩn về hiến thành phần máu;
- Tình trạng lâm sàng và tĩnh mạch không cho phép thực hiện thủ thuật.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

Cán bộ được đào tạo về gạn tách tế bào máu: 1 bác sĩ và 1 KTV;

#### **2. Phương tiện - Hóa chất:**

##### **2.1 Phương tiện:**

- Máy gạn tách thành phần máu tự động và bộ thu nhận (kít) phù hợp;
- Dụng cụ sát trùng: Bông thấm, cồn 70°, cồn iod, kim, băng dính;
- Bơm tiêm 5ml, ống xét nghiệm có chứa chất chống đông;
- Máy đo huyết áp đồng hồ, dây ga rô, quả bóp...

##### **2.2. Hóa chất:**

- Dung dịch chống đông ACD hoặc CPD-A;

### **3. Người hiến:**

- Người hiến: đảm bảo đủ tiêu chuẩn hiến tế bào gốc và được giải thích về quy trình.

### **4. Hồ sơ bệnh án:**

- Hồ sơ, các phiếu xét nghiệm, phiếu theo dõi quá trình gạn tách.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Bật máy và chọn chương trình**

### **2. Lắp đặt bộ thu nhận tế bào**

- Lắp đặt bộ thu nhận: các bước theo hướng dẫn của máy;
- Kết nối kit với dung dịch chống đông (và NaCl 0,9%).

### **3. Nhập chỉ số của người hiến theo yêu cầu**

- Giới tính; cân nặng (kg); chiều cao (cm);
- Hematocrit (%); số lượng bạch cầu (G/l); số lượng CD34 của người hiến;
- Chọn kết quả dự kiến sẽ gạn tách.

### **4. Tráng dung dịch chống đông và đuổi khí trong bộ kit:**

### **5. Kết nối kit với người hiến**

- Ga rô và chọn vị trí chọc tĩnh mạch;
- Sát trùng, lấy tĩnh mạch và cố định kim.

### **6. Lấy mẫu máu xét nghiệm**

- Mở khoá để máu vào khoảng 2ml và đóng khoá;
- Lấy máu xét nghiệm qua túi xét nghiệm vào ống xét nghiệm;
- Bấm nút để bắt đầu chương trình gạn tách.

### **7. Máy thực hiện gạn tách tế bào máu:**

- Máy thực hiện gạn tách theo chương trình lựa chọn (tùy theo máy);
- Điều chỉnh các chỉ số để thu nhận sản phẩm tốt nhất: lượng máu vào, dòng huyết tương, lượng thu nhận, thể tích, số chu kỳ, thời gian xử lý...
- Kết thúc gạn tách tế bào gốc máu ngoại vi khi đạt yêu cầu;
- Trả máu còn lại trong bộ kit về cho người hiến.

### **8. Kết thúc chương trình chạy máy:**

- Dừng máy, khóa các van vào, ra và các túi chứa sản phẩm;
- Rút kim ra khỏi người hiến và cầm máu vị trí chọc tĩnh mạch;
- Tháo kit ra khỏi máy và hàn dây tách túi sản phẩm ra khỏi bộ kit;

- Ghi chép kết quả chương trình gạn tách và thủ tục hành chính.

### **9. Lấy mẫu kiểm tra chất lượng khối tế bào máu thu nhận:**

- Lắc đều túi tế bào máu sau gạn tách;
- Lấy mẫu sản phẩm kiểm tra chất lượng qua túi đựng.

### **10. Kết thúc và bàn giao:**

- Ghi lại kết quả vào bệnh án/phiếu theo dõi gạn tách;
- Bàn giao khối tế bào gạn tách, mẫu xét nghiệm.

## **VI. THEO DÕI**

- Theo dõi diễn biến các thông số của người được gạn tách;
- Theo dõi diễn biến trong quá trình vận hành của máy;
- Theo dõi kết quả gạn tách tế bào máu;
- Ghi hồ sơ bệnh án/phiếu theo dõi theo mẫu.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

### **1. Phản ứng bất thường của người hiến:**

Các trường hợp phản ứng hầu hết do quá nhạy cảm, có yếu tố tâm lý: Sự chuẩn bị tư tưởng không tốt, sự lo lắng của đối tượng...

#### **1.1. Các biểu hiện phản ứng bất thường:**

- Nhẹ: có những biểu hiện xay xảm nhưng không mất đi sự nhận biết;
- Vừa: có sự tăng nhanh của phản ứng nhẹ và dẫn đến sự mất nhận biết;
- Nặng: có các biểu hiện trên kèm theo sự co giật (ít gặp).

#### **1.2. Xử trí các trường hợp phản ứng:**

- Không tiếp tục thực hiện gạn tách;
- Nâng cao chân và hạ thấp đầu của người bệnh/người hiến máu;
- Nới lỏng hoặc cởi những áo quá chật, tạo không khí thoáng;
- Trường hợp đối tượng bị nôn: Nằm nghiêng, có đồ chứa chất nôn;
- Kiểm tra biểu hiện ngoài và mạch thường xuyên;
- Nếu tình trạng tốt lên cho đối tượng uống nước mát, nghỉ ngơi đầy đủ;
- Đảm bảo đối tượng hồi phục hoàn toàn trước khi rời nơi gạn tách;
- Trường hợp cơn co giật kéo dài >5 phút, có thể tiêm Diazepam tĩnh mạch.
- Ghi lại phản ứng vào bệnh án/hồ sơ hiến máu.

### **2. Hạ can xi huyết:**

- Trường hợp nhẹ: dị cảm môi, mặt. Xử trí: giảm tốc độ lấy máu ra và trả về của máy, có thể ngâm viên can xi;



- Trường hợp nặng: co rút cơ nhiều, đau, khó thở... Tạm ngừng chương trình và tiêm can xi tĩnh mạch; Khi người hiến hết triệu chứng có thể chạy tiếp.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Fresenius HemoCare.** The new Cell Separator: COM.TEC. *Fresenius Transfusion GmbH*, 2011.
2. **Gambro BCT Inc.** Essentials guide. *Cobe Spectra apheresis system manual*. March 2005.
3. **Lefrere F, et al.,** Evaluation of an algorithm based on peripheral blood hematopoietic progenitor cell and CD34+ cell concentrations to optimize peripheral blood progenitor cell collection by apheresis. *Transfusion*.47. (2007) p1851-1857
4. **Michael L.Linenberger.** Collection of cellular therapy products by apheresis. *Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation*, Bethesda, MD:AABB, 2009, chapter 23, p.251-277.
5. **Terumo BCT Inc.** Mononuclear cell collection. *Spectra optia apheresis system manual*, 2012.

## **THU NHẬN TẾ BÀO LYMPHO TỪ NGƯỜI HIẾN**

(Donors Lymphocyte collection)

### **I. NGUYÊN LÝ**

Các thành phần của máu toàn phần có tỷ trọng và độ nhớt khác nhau nên khi ly tâm sẽ phân tách thành các lớp khác nhau. Quy trình sử dụng hệ thống máy gạn tách tự động lấy máu từ người hiến, ly tâm phân tách máu toàn phần thành các lớp, thu nhận lớp có chứa tế bào lympho và truyền trả các thành phần còn lại cho người hiến. Các hệ thống máy được sử dụng gạn tách tế bào lympho từ máu ngoại vi hiện có như: Cobe Spectra, Comtec Fresenius...

Nguồn gốc kỹ thuật: theo hướng dẫn của máy và quy trình của Hiệp hội Ngân hàng máu Mỹ (AABB).

### **II. CHỈ ĐỊNH**

- Đạt tiêu chuẩn về hiến thành phần máu;
- Tình trạng lâm sàng và tĩnh mạch cho phép thực hiện thủ thuật.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

- Không đạt các tiêu chuẩn về hiến thành phần máu;
- Tình trạng lâm sàng và tĩnh mạch không cho phép thực hiện thủ thuật.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện:**

Cán bộ được đào tạo về gạn tách tế bào máu: 1 bác sĩ và 1 KTV;

#### **2. Phương tiện - Hóa chất:**

##### **2.1. Dụng cụ:**

- Máy gạn tách thành phần máu tự động và bộ kit thu nhận phù hợp;
- Dụng cụ sát trùng: Bông cồn iod, panh, băng dính, bơm tiêm 5ml;
- Máy đo huyết áp đồng hồ/dây ga rô, quả bóp...
- Găng tay vô trùng;
- Bút marker, bút viết, barcode;

## **2.2. Hóa chất:**

Chất chống đông ACD-A;

## **3. Chuẩn bị người hiến:**

- Tiếp nhận và giải thích quy trình;
- Chọn tĩnh mạch và chuẩn bị tư thế người hiến;

## **4. Hồ sơ:**

- Hồ sơ người hiến, các phiếu xét nghiệm;
- Phiếu theo dõi chương trình gạn tách tế bào Lympho.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Bật máy và chọn chương trình “Lymphocytes”**

### **2. Lắp đặt bộ thu nhận tế bào**

- Lắp đặt bộ kit thu nhận: Theo hướng dẫn và sơ đồ của máy;
- Kết nối túi ACD (và NaCl 0,9%);

### **3. Nhập chỉ số của người hiến theo yêu cầu**

- Giới tính; Cân nặng (kg); Chiều cao (cm);
- Hematocrit (%); Số lượng bạch cầu (G/l)
- Chọn kết quả dự kiến sẽ gạn tách

### **4. Tráng dung dịch ACD và đuổi khí trong bộ kit**

### **5. Kết nối kit với người hiến**

- Ga rô và chọn vị trí chọc tĩnh mạch;
- Sát trùng, lấy tĩnh mạch và cố định kim.

### **6. Lấy mẫu máu xét nghiệm**

- Mở khoá để máu vào khoảng 2ml và đóng khoá;
- Lấy máu xét nghiệm qua túi xét nghiệm vào ống xét nghiệm;
- Bấm nút để bắt đầu chương trình gạn tách.

### **7. Máy thực hiện gạn tách tế bào máu:**

- Máy thực hiện gạn tách theo chương trình lựa chọn (tùy theo máy);
- Điều chỉnh số chu kỳ để thu lượng tế bào lympho theo mong muốn;
- Kết thúc gạn tách tế bào lympho ngoại vi khi đạt kết quả;
- Trả máu còn lại trong bộ kit về cho người hiến.

### **8. Kết thúc chương trình chạy máy:**

- Dừng máy, khóa các van vào, ra và các túi chứa sản phẩm;
- Rút kim ra khỏi người hiến và cầm máu vị trí chọc tĩnh mạch;
- Tháo kit ra khỏi máy;

- Hàn dây và tách túi sản phẩm ra khỏi bộ kit;
- Ghi chép kết quả chương trình gạn tách và thủ tục hành chính.

#### **9. Lấy mẫu kiểm tra chất lượng khối tế bào máu thu nhận**

- Lắc đều túi tế bào máu gạn tách;
- Lấy mẫu kiểm tra chất lượng qua túi sản phẩm: số lượng tế bào có nhân; số lượng tế bào lympho (đếm CD3, CD4, CD7, CD8...).

#### **10. Kết thúc quy trình:**

- Ghi lại kết quả vào bệnh án/phiếu theo dõi gạn tách;
- Bàn giao khối tế bào gạn tách, mẫu xét nghiệm.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- 1. Bộ Y tế.** Thông tư Hướng dẫn hoạt động Truyền máu, năm 2013.
- 2. Bruce C. McLeod.** Apheresis: Principles and Practice. *AABB Press. 2007*
- 3. Fresenius HemoCare.** The new Cell Separator: Contec. *Fresenius Transfusion GmbH, 2011.*
- 4. Gambro BCT Inc.** Essentials guide. *Cobe Spectra apheresis system manual. March 2005.*
- 5. Terumo BCT Inc.** Mononuclear cell collection. *Spectra optia apheresis system manual, 2012.*

## **THU NHẬN TẾ BÀO GỐC TỪ TỦY XƯƠNG**

(Bone marrow stem cell collection)

### **I. NGUYÊN LÝ**

Sử dụng kim chọc tủy xương chuyên dụng chọc hút dịch từ tủy xương có chứa nhiều tế bào gốc tạo máu, tế bào trung mô, tế bào đầu dòng nội mạc, nguyên bào sợi...

Nguồn gốc kỹ thuật: theo quy trình kỹ thuật của Hiệp hội Ngân hàng máu Mỹ (AABB).

### **II. CHỈ ĐỊNH**

- Người hiến tế bào gốc tạo máu tủy xương: sau khi đã kiểm tra đầy đủ các thông số xét nghiệm máu cũng như các xét nghiệm cận lâm sàng khác;
- Người bệnh có chỉ định điều trị bằng phương pháp ghép tế bào gốc tạo máu tự thân.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

- Người có thể trạng yếu, mắc bệnh phối hợp nặng, dị ứng thuốc gây mê...
- Người có bệnh lý ác tính có di căn tủy xương;
- Người có bệnh lý về rối loạn đông máu.

### **IV. CHUẨN BỊ**

- 1. Phòng lấy tủy xương:** đảm bảo vô trùng cho phẫu thuật;
- 2. Trang thiết bị và thuốc:** cho quá trình vô cảm người bệnh;
- 3. Người thực hiện:** Bác sĩ đa khoa, chuyên khoa huyết học đã được đào tạo;
- 4. Người hiến tủy xương:**
  - Người hiến và gia đình: được giải thích đầy đủ về thủ thuật;
  - Người hiến nhịn ăn trước 6 giờ;
  - Người hiến được tiền mê và gây tê tủy sống hoặc gây mê toàn thân;
  - Hồ sơ: ghi đầy đủ, chi tiết các lần thăm khám, hội chẩn, giải thích.
- 5. Phương tiện – Hóa chất**

- Săng lỗ vô khuẩn; Găng tay vô khuẩn;
- Băng, gạc, bông vô khuẩn;
- Miếng xốp cầm máu (gelatin);
- Bông cồn 70° và cồn iod;
- Bơm tiêm: 20 bơm tiêm 10 ml;
- Kim chọc hút tủy chuyên dụng (có lỗ ở bên);
- Cốc đựng dung dịch chống đông;
- Dung dịch chống đông: 50 đơn vị Heparine/1ml NaCl 0,9%;
- Dụng cụ chứa dịch tủy (túi chuyên dụng hoặc cốc inox hoặc ống Falcon).

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Người bệnh nằm sấp và được gây mê hoặc gây tê tủy sống;
2. Sát trùng rộng vùng chọc và phủ săng có lỗ;
3. Vị trí chọc tủy: gai chậu sau trên hoặc mào chậu hai bên, các vị trí chọc cách nhau 3-5mm;
4. Chọc kim vào khoang tủy: dùng kim chọc tủy chuyên dụng chọc từ nhiều ổ, xiên hình nan quạt so với mặt da, mỗi một hướng kim chọc 3 lần ở các mức độ sâu, nông và xoay lỗ bên kim theo hướng khác nhau;
5. Hút dịch tủy: Dùng bơm tiêm 10ml đã có 1ml dung dịch chống đông lắp vào kim chọc tủy để hút đạt 5ml dịch (4ml dịch tủy + 1ml chống đông);
6. Chuyển bơm tiêm đã hút dịch tủy xương cho người phụ để cho vào dụng cụ chứa dịch tủy;
7. Tiếp tục chọc và hút dịch tủy xương đến khi đạt yêu cầu;
8. Kết thúc chọc hút dịch tủy: Khi đạt yêu cầu hoặc có bất thường không cho phép thực hiện thủ thuật;
  - Cầm máu vị trí chọc hút: ấn gạc lên vị trí chọc hút từ 10 phút, kiểm tra đến khi hết chảy máu thì đặt xốp cầm máu và băng ép vị trí chọc;
  - Chuyển dịch tủy xương thu được cho bộ phận tiếp theo để xử lý.

## VI. THEO DÕI

- Mạch, nhịp thở, nhiệt độ;
- Theo dõi các biến chứng sau gây tê tủy sống hoặc gây mê;
- Tình trạng vùng lấy tủy xương: sưng nề, chảy máu...
- Kháng sinh, giảm đau trong 3 ngày đầu;
- Sau 1 ngày vận động bình thường.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Tụ máu vùng lấy tủy: Rạch lấy máu tụ, băng ép.
- Nhiễm trùng vùng lấy tủy: Nạo viêm, làm sạch và điều trị kháng sinh.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Thomas R. Spiter, MD.** *Bone Marrow collection. Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation*, Bethesda, MD: AABB, 2009, chapter 22, p.236-250.

### PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC BẰNG TÚI LẤY MÁU

(Stem cell isolation by blood collection bags)

## I. NGUYÊN LÝ

Các thành phần trong dịch tủy xương, khối tế bào gốc từ máu ngoại vi, máu dây rốn có tỷ trọng và độ nhớt khác nhau nên khi ly tâm sẽ phân tách thành các lớp khác nhau. Quy trình sử dụng kỹ thuật ly tâm và ép tách túi dẻo để loại bỏ các thành phần hồng cầu, tiểu cầu, huyết tương, xương vụn... để thu được khối tế bào gốc tinh sạch.

Nguồn gốc: theo quy trình kỹ thuật của Hiệp hội Ngân hàng máu Mỹ (AABB).

## II. CHỈ ĐỊNH

- Khối tế bào gốc gạn tách từ máu ngoại vi;
- Máu dây rốn;
- Dịch tủy xương.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định:

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện:

Người thực hiện: được đào tạo kỹ thuật phân lập tế bào gốc.

### 2. Phương tiện:

- Tủ vô trùng có đèn cồn;
- Máy ly tâm lạnh có bucket văng cho túi máu;
- Bàn ép túi máu, kìm vuốt, kìm kẹp dây, kéo cắt, máy hàn dây túi máu;
- Túi dẻo lấy máu loại túi 4;
- Gạc, bông thấm vô trùng;
- Bông tẩm cồn sát trùng 70°, cồn iod;

### 3. Mẫu nguyên liệu:

Dịch tủy xương/ máu dây rốn/ túi tế bào gốc gan tách từ máu ngoại vi.

**4. Hồ sơ:** Hồ sơ xử lý cô đặc và tinh sạch tế bào gốc (1 bộ).

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

1. Thời gian thực hiện: trước 24 giờ kể từ khi thu thập;
2. Người thực hiện: kỹ thuật đi găng tay, đội mũ, đeo khẩu trang;
3. Khử trùng tay, găng tay bằng cồn 70°;
4. Lấy mẫu trước xử lý: 1 ml để làm xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu, đếm tế bào CD34, tỷ lệ tế bào sống chết trước xử lý.
5. Nếu là dịch hút tủy xương:
  - + Lọc dịch qua lưới lọc để loại bỏ cục máu đông, mảnh xương, tế bào mỡ trong dịch tủy,
  - + Sau đó pha loãng dịch tủy gấp 2 lần với dung dịch NaCl 0,9%.
6. Bơm dịch hút tủy xương sau lọc, máu dây rốn, khối tế bào gốc tách từ máu ngoại vi (150 - 300ml) vào túi lấy máu loại 4 túi;
7. Ly tâm lần 1: Ly tâm ngược túi, tốc độ 3.870g x 10phút, nhiệt độ phòng;
8. Dùng bàn ép đẩy khối hồng cầu sang túi phụ cho tới khi lớp phân tách giữa huyết tương và khối hồng cầu cách đáy túi 15mm;
9. Cắt bỏ túi đựng khối hồng cầu;
10. Ly tâm lần 2: Ly tâm thẳng túi, tốc độ 1.200g x 7phút, nhiệt độ phòng;
11. Dùng bàn ép đẩy khối huyết tương sang túi phụ cho tới khi bề mặt huyết tương cách lớp buffy-coat khoảng 4cm;
12. Cắt và thu túi đựng khối tế bào gốc cô đặc;
13. Lấy mẫu sau xử lý: Lấy 1 ml để xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu, đếm tế bào CD34, tỷ lệ tế bào sống sau xử lý;
14. Kết thúc quy trình:
  - Chuyển túi sản phẩm để trộn dung dịch bảo quản;
  - Bàn giao mẫu xét nghiệm cho các bộ phận liên quan.
  - Hoàn thiện và lưu hồ sơ quá trình xử lý.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. **Melissa Croskell, Kathy Loper, and David H. McKenna.** *Basic cellular therapy manufacturing procedures. Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation*, Bethesda, MD: AABB, 2009, chapter 26, p.303-329.



## **PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC TỪ MÁU DÂY RÓN BẰNG PHƯƠNG PHÁP LY TÂM CÓ SỬ DỤNG HES**

(Umbilical cord blood stem cell isolation by centrifuge method using HES solution)

### **I. NGUYÊN LÝ**

Các phân tử của dung dịch HES (Hydroxy Ethyl Starch) liên kết với hồng cầu làm tăng tỷ trọng, khi ly tâm phức hợp này nhanh lắng xuống trước, để lại lớp có nhiều tế bào có nhân.

Nguồn gốc kỹ thuật: theo quy trình kỹ thuật của Hiệp hội Ngân hàng máu Mỹ (AABB).

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Các mẫu máu dây rốn sau thu thập đạt tiêu chuẩn xử lý.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Các mẫu không đạt tiêu chuẩn.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện:**

Người thực hiện: được đào tạo kỹ thuật phân lập tế bào gốc.

#### **2. Phương tiện – Hóa chất**

##### **2.1. Phương tiện:**

- Tủ an toàn sinh học;
- Tủ lạnh 4°C;
- Máy ly tâm lạnh;
- Bàn ép túi máu; máy hàn dây; kìm vuốt dây túi máu;
- Máy lắc túi máu;
- Cân điện tử;
- Máy phân tích huyết học > 18 thông số;
- Bộ túi xử lý máu dây rốn;
- Hộp đựng bông tiệt trùng;
- Kìm kẹp dây túi máu;

- Đồng hồ bấm giây;
- Bơm và kim tiêm các loại;
- Ống đựng mẫu xét nghiệm;
- Tất cả các dụng cụ phải được hấp tiệt trùng.

## **2.2. Hoá chất**

- Dung dịch HES 6%;
- Cồn 70°;
- Chai cây vi trùng vi nấm;
- Hóa chất tiệt trùng bàn xét nghiệm, dụng cụ.

Tất cả các môi trường hoá chất đều đã được tiệt trùng.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Túi máu dây rốn (MDR) được sát trùng bằng cồn 70° chuyển vào phòng xử lý. Quá trình xử lý tiến hành trong phòng sạch cấp độ B.

### **1. Chuẩn bị mẫu để ly tâm lần 1:**

- Cân túi MDR lần 1 trừ bì (gồm túi và chất chống đông);
- Dán barcode và ghi các thông tin vào hồ sơ xử lý;
- Hàn dây túi thu thập MDR, bỏ đi các đoạn dây không cần thiết;
- Đặt túi MDR lên máy lắc đều 5 phút;
- Sát trùng bên ngoài túi MDR chuyển vào tủ an toàn sinh học;
- Gắn kim lấy mẫu vào miệng túi máu;
- Lấy mẫu xét nghiệm: Tổng phân tích tế bào máu, cấy vi khuẩn, vi nấm;
- Cân lại túi máu và tính lượng HES cần dùng;
- Bơm HES với tốc độ 0,5ml/giây
- Lắc trộn đều trong vòng 10phút;

### **2. Ly tâm lần 1:**

- Chuyển túi MDR vào cốc ly tâm, tính toán đối trọng cho mẫu ly tâm;
- Ly tâm lần 1: lực ly tâm 150G trong 5 phút, ở nhiệt độ 10°C.

### **3. Chuẩn bị mẫu ly tâm lần 2:**

- Đưa bàn ép túi máu, cân điện tử, bộ túi xử lý vào tủ an toàn sinh học;
- Đặt túi MDR sau ly tâm vào bàn máy ép, gắn đầu kim túi xử lý vào túi MDR, đặt túi chuyển 1 lên cân điện tử. Ép túi MDR chuyển phần huyết tương và phần buffy-coat vào trong túi chuyển 1 cho đến khi lớp hồng cầu vừa tới miệng túi chuyển 1 thì bắt đầu tính lượng hồng cầu lấy thêm. Lượng hồng cầu lấy thêm được tính như sau:

<b>Lượng HES thêm vào</b>	<b>Lượng RBC cần chuyển</b>
< 20 ml	17 gram
20 – 29 ml	18 gram
30 – 39 ml	19 gram
> 40 ml	20 gram

- Khi thêm đủ lượng hồng cầu vào thì khoá van, mở bàn ép và trả phần hồng cầu ở đoạn dây vào túi MDR, hàn và tách rời túi MDR khỏi túi xử lý;

- Tính trọng lượng của MDR trong túi chuyển 1 (P1): Trọng lượng túi xử lý trừ bì.

#### **4. Ly tâm lần thứ 2:**

- Xếp bộ túi xử lý vào cốc ly tâm và cân bằng đối trọng;

- Ly tâm lần thứ 2: lực ly tâm 400G trong 10 phút, ở nhiệt độ 10°C.

#### **5. Chuẩn bị mẫu để lưu trữ:**

- Chuẩn bị 7ml dung dịch bảo quản: dung dịch DMSO + dung dịch Dextran T40 với tỷ lệ 1:1 vào ống kim tiêm 20 ml để vào tủ lạnh ở 4°C;

- Đặt túi chuyển 1 sau ly tâm vào bàn ép, đặt túi huyết tương lên cân điện tử, ép túi chuyển 1 để đưa huyết tương tới miệng túi huyết tương, bắt đầu tính lượng huyết tương lấy ra: P1 trừ đi hằng số cố định 24.9g;

- Sau khi lấy đủ lượng huyết tương, dùng kim vuốt phần huyết tương còn ở đoạn dây trả lại vào túi chuyển 1; hàn cắt rời túi chuyển 1;

- Cân sản phẩm: trọng lượng túi chuyển 1 trừ bì (trọng lượng túi xử lý);

- Trộn đều túi sản phẩm và lấy 1ml sản phẩm để xét nghiệm CD34 và tổng phân tích tế bào máu.

#### **6. Kết thúc quy trình:**

- Bàn giao sản phẩm, mẫu lưu và mẫu xét nghiệm đánh giá;

- Hoàn thiện và lưu hồ sơ.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- 1. Melissa Croskell, Kathy Loper, David H.McKenna.** *HES sedimentation for Manual Red Cell Removal, in Basic Cellular therapy manufacturing procedures, Method 26-2; Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation. Bethesda, MD:AABB, 2009, chapter 26, p.312-314.*

## **PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC**

### **BẢNG ỒNG LY TÂM 50ml, KHÔNG DÙNG HÓA CHẤT**

(Stem cell isolation by falcon 50ml centrifuge tube without additional reagents)

#### **I. NGUYÊN LÝ**

Các thành phần trong dịch tủy xương, khối tế bào gốc từ máu ngoại vi, máu dây rốn có tỷ trọng và độ nhớt khác nhau nên khi ly tâm sẽ phân tách thành các lớp khác nhau, qua đó loại bỏ phần lớn hồng cầu, tiểu cầu, huyết tương ra khỏi mẫu để thu được sản phẩm có chứa nhiều tế bào gốc.

Nguồn gốc kỹ thuật: Áp dụng từ quy trình tách khối buffy-coat kinh điển dùng trong miễn dịch và huyết học.

#### **II. CHỈ ĐỊNH**

Phân lập tế bào gốc từ:

- Khối tế bào gốc gạn tách từ máu ngoại vi;
- Máu dây rốn;
- Dịch hút tủy xương.

#### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

#### **IV. CHUẨN BỊ**

##### **1. Người thực hiện:**

Người đã được đào tạo thực hiện kỹ thuật.

##### **2. Phương tiện:**

- Tủ an toàn sinh học có đèn cồn;
- Máy ly tâm lạnh có công suất cho ống ly tâm 50ml;
- Ống ly tâm 50ml (ống Falcon);
- Pipet điện hút chân không;
- Pipet paster thủy tinh và quả bóp; pipet thủy tinh/nhựa loại 10 - 20ml;
- Các ống đong thủy tinh 100 ml, 250 ml; cốc thủy tinh;
- Lưới thép mịn;
- Bơm tiêm 15 ml, 20 ml; kim 18G;
- Bông gạc vô trùng; bông cồn ethanol 70° và cồn iod.

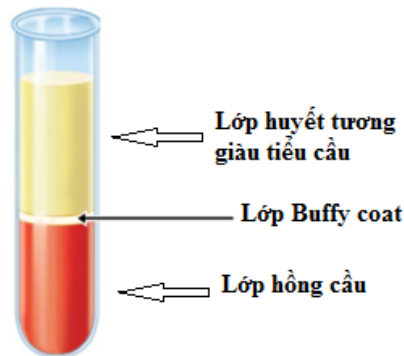
Tất cả các thiết bị, dụng cụ đều được tiệt trùng.

##### **3. Mẫu nguyên liệu**

Dịch hút tủy xương, máu dây rốn, túi tế bào gốc tách từ máu ngoại vi.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Thời gian thực hiện: càng sớm càng tốt, ngay khi mẫu tế bào gốc được đưa đến phòng labo;
2. Người thực hiện: kỹ thuật đi găng tay, đội mũ, đeo khẩu trang;
3. Khử trùng tay, găng tay bằng cồn ethanol 70°;
4. Lấy 1 ml mẫu trước xử lý để xét nghiệm: tổng phân tích tế bào máu, tế bào CD34, tỷ lệ tế bào sống chết trước xử lý;
5. Nếu là dịch hút tủy xương:
  - + Lọc dịch qua lưới lọc để loại bỏ cục máu đông, mảnh xương trong các ống dịch tủy;
  - + Sau đó pha loãng dịch tủy xương 2 lần bằng dung dịch NaCl 0,9%.
6. Ly tâm chuẩn 4.700 vòng trong 10 phút, tách thành 3 lớp: huyết tương – buffy coat – hồng cầu;



7. Dùng pipete thủy tinh vô khuẩn hút bỏ tối đa lớp hồng cầu và lớp huyết tương giàu tiểu cầu. Tránh làm mất lớp buffy-coat;
8. Lắc đều và dồn dịch tủy từ 2-3 ống vào 1 ống;
9. Lặp lại bước 6 và 7 cho tới khi loại bỏ được tối đa hồng cầu và huyết tương giàu tiểu cầu;
10. Vortex lắc trộn khối Buffy-coat cô đặc, có thể rửa bằng nước muối sinh lý và đưa về thể tích yêu cầu;
11. Lấy 1 ml mẫu sau xử lý để xét nghiệm đánh giá kết quả;
12. Kết thúc quy trình:
  - Ghi thể tích mẫu trước xử lý, thể tích sau xử lý;
  - Thực hiện xét nghiệm đánh giá: số lượng tế bào máu, tế bào CD34, tỷ lệ tế bào sống sau xử lý;
  - Hoàn thiện và lưu hồ sơ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Shinisuke Sakai, Hajime Mishima, Tomoo Ishii, et al.** (2008). Concentration of bone marrow aspirate for osteogenic repair using simple centrifugal methods. *Acta Orthopaedica*; 79 (3): 445–448

# CÔ ĐẶC VÀ TINH SẠCH TẾ BÀO GỐC BẰNG ỐNG RES-Q60

(Stem cell concentration and purification by RES-Q60 tube)

## I. NGUYÊN LÝ

Các thành phần trong dịch tủy xương có tỷ trọng và độ nhớt khác nhau nên khi ly tâm sẽ phân tách thành các lớp khác nhau. Quy trình sử dụng ống RES-Q60 với máy ly tâm chuyên dụng để loại bỏ phần lớn hồng cầu, tiểu cầu, bạch cầu hạt, huyết tương khỏi dịch hút tủy xương và thu nhận khối tế bào gốc cô đặc và tinh sạch.

Nguồn gốc: áp dụng theo quy trình của hãng Themogenesis.

## II. CHỈ ĐỊNH

Cô đặc và tinh sạch tế bào gốc từ dịch tủy xương.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

- Khối tế bào gốc gạn tách từ máu ngoại vi;
- Máu dây rốn.

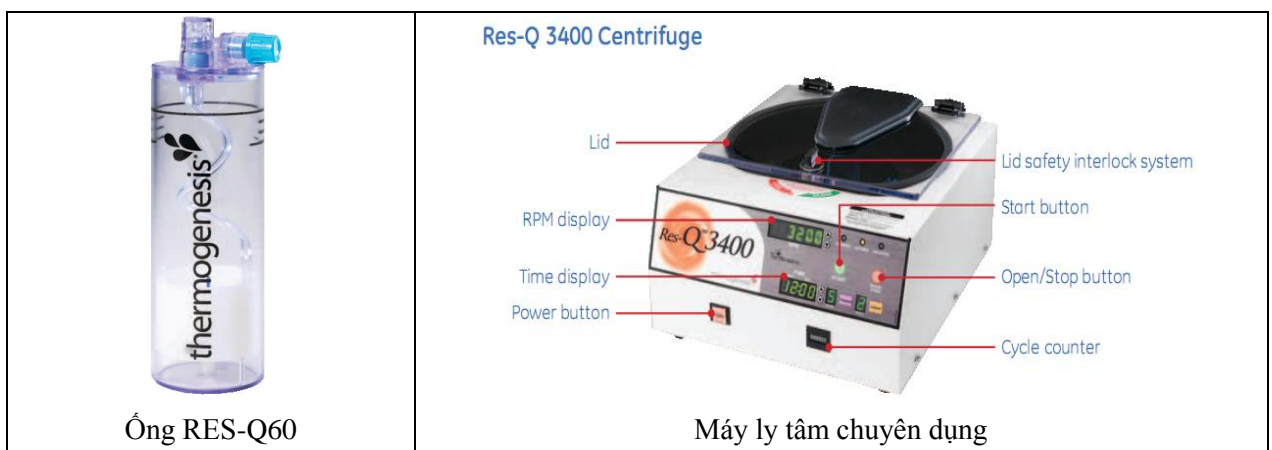
## IV. CHUẨN BỊ

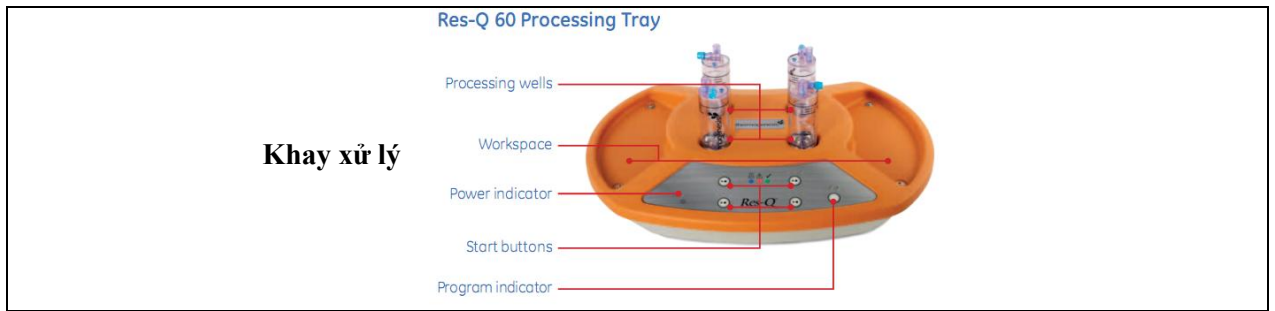
### 1. Người thực hiện:

Bác sĩ và kỹ thuật viên được đào tạo để thực hiện kỹ:

### 2. Phương tiện:

- Máy ly tâm chuyên dụng cho ống RES-Q60;
- Khay xử lý chuyên dùng cho ống RES-Q60;
- Bộ kit RES-Q60: ống RES-Q60, bộ lọc, bơm tiêm 10ml, đoạn dây truyền.





### 3. Mẫu nguyên liệu:

Dịch tủy xương hoặc máu dây rốn.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Thời gian thực hiện: ngay khi mẫu được đưa đến phòng labo;
2. Người thực hiện: kỹ thuật đi găng tay, đội mũ, đeo khẩu trang;
3. Tính toán số ống RES-Q60 cần dùng (mỗi ống xử lý được 60ml);
4. Khử trùng tay, găng tay bằng cồn ethanol 70°;
5. Lấy mẫu xét nghiệm trước xử lý 1ml để làm xét nghiệm: Tổng phân tích tế bào máu, tế bào CD34, tỷ lệ tế bào sống chết;
6. Đặt ống RES-Q60 vào vị trí trên giá tách chuyên dụng;
7. Dùng bơm tiêm 20ml và đoạn dây truyền của kit hút khối dịch nguyên liệu cần cô đặc và tinh chế (khối dịch hút tủy xương hoặc máu dây rốn) bơm qua bộ lọc vào ống RES-Q60 qua van đở tới vạch 60ml;
8. Ly tâm ống RES-Q60 bằng máy chuyên dụng 3200 vòng/phút x 12 phút;
9. Lấy ống RES-Q60 khỏi máy ly tâm, để dụng đứng trên khay xử lý;
10. Dùng bơm tiêm 10ml vô khuẩn kèm theo kit để hút khoảng 6-10 ml lớp buffy coat giàu tế bào gốc;
11. Lấy mẫu xét nghiệm sau xử lý 1ml làm xét nghiệm: Tổng phân tích tế bào máu, tế bào CD34, tỷ lệ tế bào sống chết;
12. Kết thúc quy trình:
  - Bàn giao sản phẩm và mẫu xét nghiệm cho bộ phận tiếp theo;
  - Hoàn thiện và lưu hồ sơ thực hiện.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Thermogenesis Corporation.** Bone marrow concentration for laboratory and point of care. *Res-Q 60 BMC system guideline*, 2012.



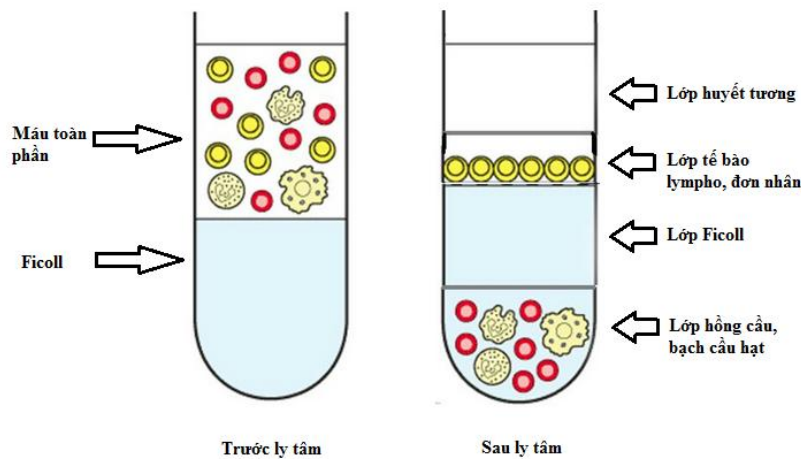
# PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC BẰNG PHƯƠNG PHÁP LY TÂM PHÂN LỚP THEO TỶ TRỌNG SỬ DỤNG FICOLL

(Stem cell isolation by density gradient method using Ficoll)

## I. NGUYÊN LÝ

Dựa vào tỷ trọng của Ficoll và tỷ trọng của tế bào máu: tỷ trọng của Ficoll là 1,077, cao hơn tỷ trọng của bạch cầu lympho nhưng lại thấp hơn tỷ trọng của hồng cầu và bạch cầu hạt. Khi ly tâm, hồng cầu và bạch cầu hạt lắng xuống đáy ống ly tâm, còn bạch cầu lympho và bạch cầu đơn nhân nằm ở trên lớp Ficoll. Thu hoạch lớp tế bào ở trên lớp Ficoll rất giàu tế bào gốc tạo máu.

Nguồn gốc: Theo quy trình của hãng Mass Miltenyi Biotec.



## II. CHỈ ĐỊNH

- Khối tế bào gốc tách từ máu ngoại vi;
- Máu dây rốn;
- Dịch hút tủy xương.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện:

Kỹ thuật viên được đào tạo để thực hiện kỹ thuật.

### 2. Phương tiện - Hóa chất

#### 2.1. Phương tiện:

- Hốt vô trùng có đèn cồn;
- Máy ly tâm lạnh có bucket văng cho ống Falcon 50 ml;
- Pipet điện hút chân không;
- Các ống đong thủy tinh 100, 250 ml (đã hấp khử trùng);

- Các pipet paster thủy tinh (đã hấp khử trùng, 1 hộp);
- Cốc thủy tinh (đã hấp sấy khử trùng, 02 cái);
- Lưới thép mịn (đã hấp sấy khử trùng, 3 cái);
- Các pipet thủy tinh hoặc nhựa vô khuẩn loại 10 - 20 ml (2 cái mỗi loại);
- Máy ly tâm lạnh;
- Quả bóp cao su dùng cho pipet pasteau (đã hấp khử trùng, 02 cái);
- Ống tiêm 15 ml, 20 ml;
- Kim 18G;
- Bông cồn iod;

## 2.2. Hóa chất

- Dung dịch Ficoll 1,077 vô trùng;

**3. Mẫu nguyên liệu:** dịch hút tủy xương, máu dây rốn, túi tế bào gốc tách từ máu ngoại vi.

**4. Hồ sơ:** Hồ sơ xử lý cô đặc và tinh sạch tế bào gốc (1 bộ).

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Thời gian thực hiện: Càng sớm càng tốt, ngay khi mẫu được đưa đến labo;
2. Người thực hiện: kỹ thuật đi găng tay, đội mũ, đeo khẩu trang;
3. Tính số lượng ống Falcon 50 ml cần dùng (mỗi ống xử lý được 30ml máu/dịch hút tủy xương);
4. Khử trùng tay, găng tay bằng cồn ethanol 70°;
5. Lấy 1ml mẫu xét nghiệm trước xử lý để xét nghiệm: Tổng phân tích tế bào máu, tế bào CD34, tỷ lệ tế bào sống chết;
6. Pha loãng dịch xử lý đã chống đông với dung dịch PBS theo tỷ lệ 6:1 (30 ml máu dây rốn/dịch hút tủy xương + 5 ml PBS);
7. Nếu dùng dịch hút tủy xương:
  - + Lọc qua màng lọc 100 micromet để loại mảnh xương và xơ sợi;
  - + Pha loãng 2 lần bằng dung dịch NaCl 0,9%.
8. Cho 15 ml Ficoll-Paque vào ống Falcon 50 ml. Nhẹ nhàng đặt 35 ml dịch đã pha loãng lên trên lớp Ficoll-Paque;
9. Ly tâm với lực 445g trong 30 phút, ở nhiệt độ 20°C;
10. Hút bỏ lớp huyết tương, và hút lớp nhân bạch cầu chuyển sang ống Falcon 50ml mới;

11. Rửa tế bào 2 lần bằng thêm 40 ml PBS, ly tâm 300g trong 10 phút, ở nhiệt độ 20°C; loại bỏ dịch nổi và giữ cặn tế bào;
12. Tái huyền dịch cặn tế bào trong 15-20 ml dung dịch nước muối sinh lý;
13. Lấy mẫu xét nghiệm sau xử lý 1ml để làm xét nghiệm: tổng phân tích tích tế bào máu, tế bào CD34, tỷ lệ tế bào sống chết;
14. Kết thúc quy trình:
  - Bàn giao sản phẩm và mẫu xét nghiệm;
  - Hoàn thiện và lưu hồ sơ thực hiện.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Miltenyl Biotec Inc.** Isolation of mononuclear cells from human cord blood by density gradient centrifugation. [www.miltenylbiotec.com](http://www.miltenylbiotec.com), 2008.
2. **Ivan Roitt (1998)**. Density gradient separation of lymphocyte on Ficoll isopaque. In Immunology 5<sup>th</sup> Edition by Ivan Roitt, Pub by Moskey, 1998, p.391.

# **PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC BẰNG HỆ THỐNG MÁY TỰ ĐỘNG SEPAX**

(Stem cell isolation using Sepax full-automatic system)

## **I. NGUYÊN LÝ**

Các thành phần trong dịch tủy xương, khối tế bào gốc từ máu ngoại vi, máu dây rốn có tỷ trọng và độ nhớt khác nhau nên khi ly tâm sẽ phân tách thành các lớp khác nhau. Hệ thống máy Sepax sẽ tự động hút mẫu vào buồng phân tách để ly tâm phân lớp và sử dụng hệ thống cảm quang để nhận biết, thu nhận lớp chứa các tế bào gốc.

Nguồn gốc kỹ thuật: theo hướng dẫn của máy và quy trình kỹ thuật của Hiệp hội ngân hàng máu Mỹ (AABB).

## **II. CHỈ ĐỊNH**

- Khối tế bào gốc tách từ máu ngoại vi;
- Máu dây rốn;
- Dịch tủy xương.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện:**

Được đào tạo để thực hiện kỹ thuật.

### **2. Phương tiện**

- Hệ thống máy xử lý chính của Sepax;
- Máy nối dây túi máu hoặc thiết bị kết nối vô trùng (nếu cần);
- Máy hàn dây túi máu;
- Các vật liệu phòng thí nghiệm cần thiết;
- 1 bộ kit đơn chuyên dụng;
- Túi đông lạnh đảm bảo thể tích;
- Bơm tiêm dùng một lần các loại và kim 18G, 20G;
- Ống đựng mẫu xét nghiệm;
- Băng, gạc vô trùng;
- Quần áo, mũ, khẩu trang, bao chân, găng tay vô trùng;

### **3. Mẫu nguyên liệu:**

### **4. Hồ sơ: Hồ sơ xử lý (1 bộ).**

Dịch tủy xương, máu dây rốn hoặc khối tế bào gốc tách từ máu ngoại vi.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### *Bước 1: Cài đặt các chỉ số:*

- Bật thiết bị và chọn chương trình.
- Cài đặt các chỉ số: thể tích ban đầu, thể tích sản phẩm, lượng dung dịch HES bổ sung.

### *Bước 2: Chuẩn bị kit*

- Kiểm tra: hạn dùng và sự nguyên vẹn của kit;
- Kết nối kit với túi thu nhận và túi đầu vào (nối vô trùng).

### *Bước 3: Lắp đặt kit*

- Lắp kit theo trình tự: buồng ly tâm, cảm biến quang và áp lực, van chữ T, treo túi huyết tương, túi hồng cầu và túi xử lý vào giá thích hợp;
- Đảm bảo các điều kiện: nắp buồng ly tâm được đóng kín, đường cảm biến áp lực được kết nối, van kết nối với túi sản phẩm đầu vào được khóa, các van được kết nối ở vị trí chữ T;
- Sau khi kết nối xong bấm nút start để hệ thống kiểm tra kit tự động.

### *Bước 4: Quy trình tự động của máy*

- Màn hình nhắc “Open roller clamp”: Mở kẹp con lăn ở ống nối với túi chứa mẫu đầu vào.
- Ấn  sepax sẽ tự động thực hiện quy trình:
  - + Máy hút mẫu vào khoang phân tách và ly tâm tách lớp;
  - + Đẩy huyết tương ra túi chứa tương ứng, đẩy lớp buffy-coat ra túi sản phẩm, sau đó đẩy hồng cầu ngược lại vào túi chứa mẫu ban đầu.
  - + Kết thúc 1 chu kỳ phân tách, máy tạm dừng và bắt đầu bằng tiếng bíp;
  - + Chu kỳ phân tách tiếp theo lập lại.

### *Lưu ý:*

- Trộn đều túi đầu vào sau mỗi chu kỳ.
- Mỗi chu kỳ xử lý tối đa 220 ml; mỗi lần thực hiện từ 30 - 3.300 ml.

### *Bước 5: Kết thúc quy trình xử lý:*

- Thực hiện theo hướng dẫn hiển thị trên màn hình: ấn enter, mở đường bạch cầu, hồng cầu và huyết tương; đóng các khóa và tháo kit;
- Tách túi sản phẩm (hàn đường thu nhận ngay trên các khóa);
- Trộn đều sản phẩm và lấy mẫu xét nghiệm;
- Bàn giao sản phẩm và mẫu xét nghiệm;

- Hoàn thiện và lưu hồ sơ.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Biosafe.** Sepax cell processing system. *Operator's manual.* 2012.
2. **Lapierre et al.** Cord blood volume reduction using an automated system (Sepax) vs. a semi- automated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study. *Cytotherapy*, 2007, 9(2): 165-169.
3. **Solves et al.** New automatic device for routine cord blood banking: Critical analysis of different volume reduction methodologies. *Cytotherapy*, 2009, 11(8): 1101-1107
4. **Philip H.Coelho, Kathy Loper.** Automated processing of Umbilical Cord Blood with Biosafe Sepax system and related accessories. *in umbilical cord blood processing, Method 27-1; Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation.* Bethesda, MD:AABB, 2009, chapter 27, p.336-338.

# PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC MÁU DÂY RÓN BẰNG HỆ THỐNG TỰ ĐỘNG AXP

(Umbilical cord blood stem cell isolation using AXP system)

## I. NGUYÊN LÝ

Các thành phần trong máu dây rốn có tỷ trọng và độ nhớt khác nhau nên khi ly tâm sẽ phân tách thành các lớp khác nhau. Hệ thống máy AXP sử dụng rô bốt có cấu trúc khe rãnh nhằm phân lớp máu dây rốn khi ly tâm, thu nhận lớp có chứa tế bào gốc và loại bỏ phần lớn bạch cầu hạt, hồng cầu, tiểu cầu, plasma.

Nguồn gốc kỹ thuật: theo hướng dẫn sử dụng AXP và quy trình kỹ thuật của Hiệp hội ngân hàng máu Mỹ (AABB).

## II. CHỈ ĐỊNH

Các mẫu máu dây rốn sau thu thập đảm bảo tiêu chuẩn xử lý.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Các mẫu không đạt tiêu chuẩn.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện:

Được đào tạo để thực hiện kỹ thuật.

### 2. Phương tiện – Hóa chất:

#### 2.1. Phương tiện:

- Tủ an toàn sinh học;
- Hệ thống AXP kèm máy tính;
- Máy ly tâm chuyên dụng để phân tách máu;
- Máy lắc túi máu;
- Máy hàn dây;
- Máy hàn ép chân không;
- Bơm và kim tiêm;
- Thanh treo túi máu;
- Tủ lạnh 4°C;
- Cân điện tử;
- Bộ túi xử lý máu dây rốn;
- Hộp bảo vệ túi bao ngoài;
- Mã barcode;
- Hộp đựng gạc tiệt trùng;
- Đầu nối dây túi máu;

- Kim kẹp dây túi máu, kéo cắt;
- Pipetman và đầu côn; Pipet Pasteur;
- Bơm và kim tiêm;
- Ống nghiệm lưu mẫu các loại.

Tất cả các dụng cụ đã được chuẩn bị và hấp tiệt trùng.

## **2.2. Hóa chất**

- Cồn 70°;
- Nước muối sinh lý;
- Nước cất.

Tất cả các môi trường hóa chất đều đã được tiệt trùng và loại trừ độc tố.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Quá trình xử lý tiến hành trong phòng sạch cấp độ B.

### **1. Chuẩn bị mẫu để ly tâm**

- Túi máu sau khi tiếp nhận được sát trùng sạch sẽ bằng cồn 70° bên ngoài và mang túi máu cân trọng lượng: xử lý với mẫu từ 30gram đến 150gram;
- Kiểm tra kỹ các vị trí nối của bộ túi xử lý;
- Kẹp khoá ở hai đường ống dẫn túi lấy mẫu xét nghiệm;
- Chuyển van điều tiết tới vị trí 45°C giữa túi hồng cầu và túi xử lý, chuyển toàn bộ khí có trong túi đông lạnh ra ngoài qua đường bơm DMSO;
- Dán barcode cho túi đông lạnh;
- Nối túi máu thu thập với bộ xử lý máu, giai đoạn này được tiến hành trong tủ cấy an toàn sinh học;
- Chuyển toàn bộ mẫu máu trong túi thu thập sang túi xử lý. Hàn dây phía trên chỗ lấy mẫu máu và cắt bỏ phần túi thu thập dính liền với màng lọc;
- Trộn kỹ túi máu sau đó lấy mẫu để xét nghiệm;
- Hàn tách rời túi lấy mẫu xét nghiệm;
- Cân trọng lượng của mẫu máu: Bằng trọng lượng cân được trừ đi 55gr bì;
- Lắp đặt bộ túi xử lý vào rô bốt theo thứ tự: Túi đông lạnh, xử lý, đường DMSO, túi lấy mẫu, túi hồng cầu. Đậy nắp và cho rô bốt vào ống ly tâm;
- Chuẩn bị một cốc ly tâm nữa cân bằng với cốc ly tâm mẫu;
- Cho cốc ly tâm vào máy ly tâm và kiểm tra: Đèn pin trên AXP sáng, vị trí mũi tên trên nắp AXP hướng vào tâm, xoay cốc ly tâm quanh trục để chắc chắn rằng cốc ly tâm không bị vung;
- Đóng nắp máy ly tâm.



## **2. Giai đoạn ly tâm**

- Ly tâm lần thứ nhất: lực ly tâm 400G trong 20 phút ở nhiệt độ 22°C;
- Ly tâm lần thứ hai: lực ly tâm thấp 80G trong 10 phút ở nhiệt độ 22°C.

## **3. Giai đoạn lấy mẫu xét nghiệm**

Dùng bơm kim hút hết lượng máu trong túi ra để xét nghiệm: đếm tế bào máu, HLA, cấy vi khuẩn và vi nấm.

## **4. Giai đoạn lưu thông tin vào máy tính**

- Sau khi ly tâm lấy rô bột ra khỏi máy ly tâm, tháo rời bộ túi xử lý mẫu và đặt rô bột vào đế sạc để gửi dữ liệu vào phần mềm;
- Hàn dây bỏ túi hồng cầu;
- Mang bộ túi xử lý máu và túi hồng cầu vào tủ an toàn sinh học;
- Dùng bơm kim hút huyết tương trong túi xử lý cho vào ống lưu trữ;
- Dùng kim vuốt hết sản phẩm còn lại trên đường ống vào túi đông lạnh;
- Chuyển toàn bộ sản phẩm từ túi xử lý sang túi đông lạnh;
- Lấy mẫu xét nghiệm:
  - + Lấy mẫu sản phẩm sau xử lý đếm tế bào máu và tỷ lệ tế bào sống;
  - + Lấy mẫu xét nghiệm điện di và lưu trữ: dùng bơm tiêm và đầu nối để hút mẫu trong túi hồng cầu.

## **5. Kết thúc quy trình:**

- Bàn giao sản phẩm và mẫu xét nghiệm;
- Hoàn thiện và lưu hồ sơ.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- 1. Philip H.Coelho, Kathy Loper.** Automated Volume Reduction of Umbilical Cord Blood using the AutoXpress System. *in umbilical cord blood processing, Method 27-2; Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation.* Bethesda, MD:AABB, 2009, chapter 27, p.338-340.

**PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC**  
**TỪ DỊCH HÚT TỦY XƯƠNG BẰNG MÁY COMTEC**  
(Bone marrow stem cell isolation using COMTEC apheresis system)

**I. NGUYÊN LÝ**

Các thành phần trong dịch hút tủy xương có tỷ trọng và độ nhớt khác nhau nên khi ly tâm sẽ phân tách thành các lớp khác nhau. Máy Comtec sẽ ly tâm dịch tủy xương để thu nhận lớp có chứa tế bào gốc và loại bỏ phần lớn hồng cầu, tiểu cầu, plasma, mảnh xương vụn... khỏi dịch hút tủy xương.

Nguồn gốc kỹ thuật: Theo quy trình hướng dẫn của máy và AABB.

**II. CHỈ ĐỊNH**

Dịch tủy xương sau khi thu thập.

**III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

**IV. CHUẨN BỊ**

**1. Người thực hiện:**

Được đào tạo để thực hiện kỹ thuật.

**2. Phương tiện – Hóa chất:**

**2.1. Phương tiện:**

- Bộ kit phân lập tế bào gốc từ dịch tủy xương (P1Y + BMSC);
- Túi dung dịch chống đông ACD-A 600ml;
- Quần áo vô trùng, mũ, khẩu trang, ủng giấy;
- Bơm tiêm 3ml;
- Găng tay vô trùng;
- Kim tiêm 20G.

**2.2. Hóa chất:**

- NaCl 0.9%, Albumin;
- Cồn 70°, Iod 10%;
- Dung dịch lau bàn, dung dịch rửa tay nhanh.

**3. Mẫu bệnh phẩm:**

Túi dịch tủy xương sau khi thu thập.

**V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Bước 1: Pha loãng dịch tủy xương

Pha dịch tủy xương trong dung dịch albumin đạt nồng độ 1,5% để điều chỉnh hematocrit đạt khoảng 25-30%.

Bước 2: Cài đặt các thông số của máy

- Bật máy Comtec, chọn chương trình (BMSC);
- Lắp bộ kit P1Y theo hướng dẫn của chương trình;
- Chạy chương trình tráng kit (priming) bằng NaCl 0,9%;
- Cài đặt các thông số;
- Kết nối túi chứa dịch tủy xương vào bộ kit P1Y.

Bước 3: Chạy chương trình phân lập tế bào gốc

- Bấm start để chạy chương trình;
- Máy thực hiện phân lập theo chương trình;
- Điều chỉnh các chỉ số để thu nhận sản phẩm tốt nhất: lượng máu vào, lượng thu nhận, thể tích...
- Kết thúc quy trình phân lập: trả các thành phần loại bỏ về túi ban đầu.

Bước 4: Kết thúc chạy máy

- Dừng máy, khóa các van vào, ra và các túi chứa sản phẩm;
- Tháo kit ra khỏi máy và hàn dây tách túi sản phẩm ra khỏi bộ kit;
- Tách túi sản phẩm và lấy mẫu để xét nghiệm: tổng phân tích tế bào máu; đếm số lượng tế bào gốc; nuôi cấy cụm.

Bước 5: Hoàn thiện hồ sơ và thu dọn dụng cụ

- Hoàn thiện và dán nhãn sản phẩm;
- Ghi chép kết quả chương trình gạn tách và thủ tục hành chính.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Fresenius HemoCare.** The new Cell Separator: Comtec. *Fresenius Transfusion GmbH*, 2011.
2. **Michael L.Linenberger.** Collection of cellular therapy products by apheresis. Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation, Bethesda, MD:AABB, 2009, chapter 23, p.251-277.

# **PHÂN LẬP TẾ BÀO GỐC**

## **TỪ DỊCH HÚT TỦY XƯƠNG BẰNG MÁY HARVEST-TERUMO**

(Bone marrow stem cell isolation using HARVEST-TERUMO system)

### **I. NGUYÊN LÝ**

Các thành phần trong dịch tủy xương có tỷ trọng và độ nhớt khác nhau nên khi ly tâm sẽ phân tách thành các lớp khác nhau. Máy Harvest-Terumo với cốc ly tâm có cấu trúc đặc biệt để khi ly tâm dịch hút tủy xương thì phần chứa các tế bào có nhân sẽ được phân tách sang bộ phận riêng biệt qua đó thu thập tế bào gốc và loại bỏ phần lớn hồng cầu, tiểu cầu, plasma, mảnh xương vụn...

Nguồn gốc kỹ thuật: Theo quy trình hướng dẫn của máy và AABB.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Dịch tủy xương sau khi thu thập,

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện:**

Được đào tạo để thực hiện kỹ thuật.

#### **2. Phương tiện:**

- Máy ly tâm của Harvest-Terumo;
- Bộ kit của Harvest-Terumo với cốc ly tâm chuyên dụng;
- Quần áo vô trùng, mũ, khẩu trang, bao chân;
- Găng tay vô trùng;
- Gạc hấp vô trùng;
- Bút marker, bút bi

#### **3. Hồ sơ:**

- Hồ sơ xử lý.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

Thực hiện tại phòng phẫu thuật/phòng sạch cấp độ B.

#### **Bước 1: Phân tách các thành phần máu**

- Chuyển dịch tủy xương từ trong bộ túi thu thập vào các cốc quay ly tâm bằng bơm tiêm;
- Đặt ống quay vào máy ly tâm;
- Ly tâm 14 phút;
- Nhấc các ống chứa dịch tủy xương ra.

### Bước 2: Thu hoạch tế bào gốc

Dùng bơm tiêm rút bớt huyết tương dư thừa ra ngoài (giữ lại khoảng 10ml plasma trên bề mặt lớp tế bào);

- Trộn đều phần tế bào gốc với phần huyết tương còn lại trong cốc;
- Hút phần đã trộn vào bơm tiêm vô trùng;
- Tráng 2ml Bicarbonate vào một bơm tiêm vô trùng mới;
- Chuyển 40ml tế bào gốc tủy xương vào bơm tiêm vô trùng đã được tráng dung dịch Bicarbonate;
- Lấy 0,5ml tế bào đếm tế bào gốc;
- Thêm lượng huyết tương cho đủ 60ml;
- Chia nhỏ 60ml từ bơm tiêm lớn vào các bơm tiêm nhỏ để chuẩn bị cho việc ghép.

### Bước 3: Kết thúc quy trình

- Bàn giao sản phẩm cho bộ phận sử dụng;
- Hoàn thiện hồ sơ.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. **Harvest Technologies, Terumo company.** SmartPReP2: Theory of operation. 2006.
2. **Thomas R.Spitzer.** Bone marrow collection. *Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation, Bethesda, MD:AABB, 2009, chapter 23, Method 22-1: Harvesting bone marrow. p.247-250.*

# **BẢO QUẢN ĐÔNG LẠNH TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU BẰNG BÌNH NITƠ LỎNG**

(Cryopreservation of hematopoietic stem cell concentrate in liquid nitrogen)

## **I. NGUYÊN LÝ**

Lưu giữ khối tế bào gốc có chất bảo quản DMSO trong môi trường nitơ lỏng (-150°C đến -196°C).

Nguồn gốc kỹ thuật: Theo quy trình hướng dẫn của hãng Thermo và AABB.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

- Lưu trữ đông lạnh dài ngày khối tế bào gốc;
- Các khối tế bào gốc thu thập và xử lý đạt tiêu chuẩn.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Các khối tế bào gốc không đạt tiêu chuẩn và có nguy cơ nhiễm trùng.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện:**

Kỹ thuật viên đã được đào tạo thực hiện quy trình.

### **2. Phương tiện – Hóa chất:**

#### **2.1. Phương tiện:**

- Phòng thủ thuật đảm bảo vô trùng;
- Tủ an toàn sinh học; tủ lạnh 4°C;
- Bơm tiêm điện tự động;
- Máy lắc mặt ngang lắc theo kiểu xoắn ốc;
- Máy hàn dây bằng sóng cao tần;
- Máy hàn túi plastic có hút chân không;
- Máy hạ lạnh theo chương trình;
- Bình lưu trữ tế bào bằng nitơ lỏng;
- Túi bao ngoài, hộp bảo vệ;
- Bơm kim tiêm sử dụng một lần các loại và kim tiêm 18G;
- Ống xét nghiệm 0,5 ml;
- Quần áo, khẩu trang, găng tay, mũ vô trùng.

#### **2.2. Hoá chất:**

- DMSO (Sigma); Dextran T40 trong NaCl 0,9%;
- Nguồn nitơ lỏng cho hạ lạnh và lưu trữ tế bào.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Trộn tế bào gốc với dung dịch bảo quản:

- Khối tế bào gốc: Sau khi đã xử lý và lấy mẫu xét nghiệm xong;
- Chuẩn bị 7ml dung dịch DMSO và Dextran T40 tỷ lệ 1:1 vào bơm tiêm 20ml và giữ ở 4°C;
- Gắn bơm tiêm đã chuẩn bị trên vào đầu có màng lọc 2µl của bộ xử lý, mở van và bơm DMSO đến tận miệng của túi sản phẩm thì khoá van;
- Đặt bộ túi xử lý mẫu và bơm kim DMSO ở 4°C trong 10-15 phút;
- Lấy bộ xử lý mẫu và bơm kim DMSO ra, kẹp túi sản phẩm vào giữa hai miếng gel lạnh đặt lên máy lắc, lắp bơm DMSO vào máy bơm tự động;
- Bật máy lắc và máy bơm DMSO vào túi đông lạnh ở tốc độ 24ml/h;
- Sau khi bơm xong khoá đường DMSO và hàn cắt bỏ đường DMSO;
- Bỏ túi đông lạnh ra khỏi gel lạnh;
- Dựng đứng túi đông lạnh, mở van giữa túi đông lạnh với túi xử lý cho lượng dung dịch DMSO thừa trên ống dẫn chảy hết vào túi xử lý; Mở khoá ở túi lấy mẫu, điều chỉnh van loại bỏ hết khí trong túi đông lạnh;
- Hàn đoạn dây của túi đông lạnh cách miệng túi 0,5cm, đoạn dây tiếp theo 2cm và đoạn dây cuối 5 cm;
- Cho túi đông lạnh vào hộp định vị để hàn tiếp 2 vị trí gần trên túi;
- Cho túi đông lạnh vào túi bao ngoài và hàn đuôi khí bằng máy hàn.

### 2. Hạ lạnh và lưu giữ khối tế bào gốc đã trộn với dung dịch bảo quản:

- Cho túi đông lạnh vào hộp bảo vệ, dán barcode và cho vào buồng hạ lạnh của máy hạ lạnh theo chương trình;
- Bật máy hạ lạnh theo chương trình, mở khoá cấp nitơ cho máy;
- Chạy chương trình hạ lạnh cho tế bào gốc tạo máu qua 7 bước để mẫu đạt đến nhiệt độ -90°C;
- Kết thúc quy trình hạ lạnh, chuyển mẫu vào bình lưu giữ;
- Hoàn thiện hồ sơ lưu giữ mẫu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Allison Hubel.** Cryopreservation of cellular therapy products. *Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation*. Bethesda, MD:AABB, 2009, chapter 28, p.342-357.
2. **Kelvin G.M.Brockbank, James C.Covault, Michael J.Taylor.** A guide to cryopreservation techniques. *Cryopreservation manual by Artisan technology group-Thermo Scientific corp, 2003.*

# **RÃ ĐÔNG KHỐI TẾ BÀO GỐC ĐÔNG LẠNH**

(Thawing of frozen stem cell concentrate)

## **I. NGUYÊN LÝ**

Sử dụng bình cách thủy 37°C để đưa các sản phẩm tế bào bảo quản đông lạnh về điều kiện sử dụng trong khoảng thời gian nhất định.

Nguồn gốc kỹ thuật: Theo quy trình hướng dẫn của AABB.

## **II. CHỈ ĐỊNH**

Khối tế bào được bảo quản đông lạnh trước khi sử dụng, bao gồm:

- Khối tế bào gốc từ máu ngoại vi, dịch tủy xương, máu dây rốn;
- Các sản phẩm tế bào trị liệu.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Trong các trường hợp không sử dụng.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện:**

Người thực hiện: đã được đào tạo thực hiện quy trình.

### **2. Phương tiện – Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện:**

- Bể cách thủy 37°C;
- Bộ bảo hộ khi tiếp xúc với nitơ lỏng;
- Hộp vận chuyển mẫu;
- Hồ sơ lưu mẫu.

#### **2.2. Hóa chất:**

Nước cất.

### **3. Mẫu bệnh phẩm:**

Mẫu sản phẩm tế bào đông lạnh.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

1. Người thực hiện: mặc đồ bảo hộ;
2. Kiểm tra mực nước cất và nhiệt độ trong bể cách thủy;
3. Lấy sản phẩm đông lạnh ra khỏi hộp vận chuyển/tank lưu trữ;
4. Kiểm tra sự toàn vẹn, đối chiếu thông tin;
5. Đặt mẫu đông lạnh vào bể cách thủy cho tới khi tan đông (khoảng 5 phút);
6. Lấy mẫu để kiểm tra tỷ lệ tế bào sống;



7. Sử dụng sản phẩm rã đông để tiêm/truyền cho người bệnh;
8. Kết thúc quá trình rã đông, hoàn thiện hồ sơ.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. **Meghan Delaney, Richard L.Haspel.** Thawing and infusing cellular therapy products. *Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation*. Bethesda, MD:AABB, 2009, chapter 31, p.375-396.

# **ĐÁNH GIÁ TỶ LỆ SỐNG CỦA TẾ BÀO**

## **BẰNG KỸ THUẬT NHUỘM XANH TRYPAN**

(Cellular viability assessment using Trypan blue)

### **I. NGUYÊN LÝ**

Các tế bào chết sẽ bắt màu khi nhuộm xanh trypan và các tế bào sống sẽ không bắt màu. Thông qua đếm số lượng tế bào không bắt màu và bắt màu sau khi nhuộm để tính tỷ lệ sống của tế bào.

Nguồn gốc kỹ thuật: Áp dụng theo quy trình kỹ thuật của AABB

### **II. CHỈ ĐỊNH**

- Máu dây rốn;
- Tế bào gốc máu ngoại vi;
- Dịch tủy xương.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện:**

Người thực hiện: được đào tạo phù hợp để thực hiện kỹ thuật.

#### **2. Phương tiện – Hóa chất:**

##### **2.1. Phương tiện:**

- Kính hiển vi quang học vật kính 10X và 40X;
- Máy đếm tế bào huyết học.
- Buồng đếm hồng cầu; lamên;
- Ống eppendorf;
- Pipet các cỡ để hút được 2 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, từ 20 đến 100 $\mu$ l;
- Đầu côn vàng.

##### **2.2. Hóa chất:**

- Cồn 70°, nước muối;
- Dung dịch thuốc nhuộm xanh trypan 0,4%.

#### **3. Mẫu bệnh phẩm**

Mẫu máu dây rốn, dịch tủy xương, tế bào gốc máu ngoại vi.

### **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

1. Tổng phân tích tế bào máu;
2. Chuẩn bị kính hiển vi, buồng đếm gắn sẵn lamên;

3. Pha loãng mẫu với dung dịch nước muối sinh lý, dựa trên số lượng bạch cầu đo được đảm bảo mật độ tế bào khoảng 500 tế bào/ $\mu\text{l}$  là phù hợp;
4. Nhuộm với dung dịch xanh trypan theo tỷ lệ 1:1 về thể tích;
5. Nhỏ 10 $\mu\text{l}$  tế bào đã nhuộm vào mép lamên để dịch mao dẫn vào trong buồng đếm;
6. Đọc kết quả ở vật kính 40X;
7. Đưa vi trường theo đường zíc-zắc để tránh đếm lặp lại các tế bào, đếm số tế bào sống và tế bào chết trong đó các tế bào chết là tế bào bị nhuộm màu xanh. Đếm tổng số ít nhất 200 tế bào.
8. Tính tỷ lệ tế bào sống:
 
$$\text{Tỷ lệ tế bào sống} = \frac{\text{Số tế bào sống}}{\text{Tổng số tế bào đếm được}} \times 100\%$$
9. Ghi lại kết quả và hoàn thiện hồ sơ.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. **Nicholas Greco, Lynn O'Donnel.** Determining cellular viability using Trypan blue. *Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation*, Bethesda, MD:AABB, 2009, chapter 47, Method 47-1. p.565-566.

# NUÔI CÂY CỤM TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU

(Hematopoietic colony-forming cell assays)

## I. NGUYÊN LÝ

Trong môi trường nuôi cấy có các chất kích thích phát triển thích hợp tế bào gốc sẽ phát triển thành các cụm biệt hóa của các dòng tế bào khác nhau. Dựa vào phương pháp này để đánh giá chất lượng khối tế bào gốc.

Nguồn gốc kỹ thuật: Theo quy trình kỹ thuật của AABB.

## II. CHỈ ĐỊNH

- Máu dây rốn;
- Tế bào gốc máu ngoại vi;
- Dịch tủy xương.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện:

Người thực hiện: được đào tạo để thực hiện kỹ thuật.

### 2. Phương tiện - Hóa chất

#### 2.1. Phương tiện:

- Tủ an toàn sinh học;
- Tủ nuôi cấy tế bào;
- Kính hiển vi đảo ngược;
- Máy trộn Vortex;
- Micro-pipet;
- 02 ống nghiệm 1ml;
- 06 đĩa Petri d=35mm; 02 đĩa Petri d=100mm;
- 40 ống nghiệm 10ml có nắp tiệt trùng;
- 01 kim Catheran; 01 bơm tiêm một lần 3ml, 02 kim 18G.

#### 2.2. Hóa chất

- Methocellulose (MethoCult GF H4434V);
- Nước cất.

### 3. Mẫu bệnh phẩm

Mẫu tế bào gốc máu dây rốn, tế bào gốc tủy xương, tế bào gốc máu ngoại vi.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

### 1. Nuôi cấy tế bào:

- Giải đông lọ môi trường methycellulose;
- Trộn kỹ mẫu máu trên máy votex;
- Dùng micro-pipet hút mẫu máu theo thể tích:
  - + Hút 2  $\mu$ l nếu mật độ tế bào nuôi cấy < 40 G/l;
  - + Hút 1  $\mu$ l nếu mật độ tế bào nuôi cấy  $\geq$  40 G/l.
- Cho mẫu máu vừa hút vào ống chứa 2,5ml MethoCult GF H4434V:
  - Dùng bơm tiêm 1ml, kim 18G rút chính xác 1ml cho vào đĩa petri d=35mm. Xoay tròn đĩa để môi trường phủ đều khắp mặt đĩa petri;
  - Tiến hành tương tự với đĩa thứ 2;
  - Đặt 2 đĩa nuôi cấy vào trong đĩa petri d=100mm, đặt thêm một đĩa petri bỏ nắp d=35mm có khoảng 0,5ml nước cất;
  - Đậy nắp đĩa petri d=100mm, ghi mã số mẫu và ngày thực hiện;
  - Cho đĩa môi trường vào tủ nuôi cấy tế bào ở nhiệt độ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>;
  - Ghi theo dõi: mã, thể tích, ngày cấy mẫu, ngày đọc kết quả...

#### IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Sau 14 ngày kể từ ngày cấy mẫu, lấy mẫu ra đọc kết quả.

##### 1. Xác định và phân biệt các loại cụm tế bào:

- BFU-e (Burst Forming Unit-erythrocyte):
  - + Số cụm hồng cầu từ 1 đến 2, hoặc bao gồm 8 đến 20 nguyên hồng cầu gọi là CFU-E.
  - + Số cụm hồng cầu  $\geq$  3 cụm, trên 200 nguyên hồng cầu gọi là BFU-E.
- CFU-GM (colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage): Một cụm bao gồm  $\geq$  40 bạch cầu hạt hoặc đại thực bào.
  - CFU-Mix (Colony Forming Unit - Mixed): Một cụm bao gồm hồng cầu trưởng thành và  $\geq$  20 bạch cầu hạt/đại thực bào/mẫu tiểu cầu

##### 2. Đánh giá cụm dưới kính hiển vi quang học đảo ngược

Màu sắc tế bào	Số lượng tế bào trong một cụm	Đánh giá kết quả
Duy nhất hồng cầu (màu đỏ)	$\geq$ 8 tế bào	01 BFU-e
	< 8 tế bào	Không đếm
Duy nhất bạch cầu	$\geq$ 40 tế bào	01 CFU-GM
	< 40 tế bào	Không đếm
Bạch cầu + Hồng cầu	$\geq$ 20 tế bào bạch cầu	CFU-Mix
	< 20 tế bào bạch cầu	BFU-E

Các loại khác		Không đếm
---------------	--	-----------

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Emer Clarke.** Colony forming cell assays for determining potency of cellular therapy products. *Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation, Bethesda, MD:AABB, 2009, chapter 48, p.573-580.*

# VẬN CHUYỂN TẾ BÀO GỐC SAU BẢO QUẢN

(Transportation of cryopreserved stem cell)

## I. NGUYÊN LÝ

Duy trì nhiệt độ bảo quản đông lạnh trong quá trình vận chuyển để đảm bảo chất lượng của khối tế bào gốc.

Nguồn gốc kỹ thuật: theo quy trình kỹ thuật của AABB.

## II. CHỈ ĐỊNH

Khối tế bào gốc lưu trữ đông lạnh.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Khối tế bào gốc chưa đông lạnh hoặc đã rã đông.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện:

Được đào tạo phù hợp để thực hiện kỹ thuật.

### 2. Phương tiện – Hóa chất

#### 2.1 Phương tiện:

- Thùng bảo quản lạnh, kèm các thiết bị theo dõi;
- Bộ bảo hộ khi tiếp xúc với nitơ lỏng.

#### 2.2. Hóa chất:

Nitơ lỏng.

### 3. Mẫu bệnh phẩm:

Khối tế bào gốc đông lạnh.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Chuẩn bị thùng chuyên dụng chứa nitơ lỏng, hộp bảo vệ (nếu có) và các thiết bị theo dõi nhiệt độ;

- Người thực hiện: thực hiện mặc bộ bảo hộ khi tiếp xúc với nitơ lỏng;

- Cấp nitơ vào thùng chuyên dụng với dung lượng đến vạch quy định;

- Chuyển mẫu vào thùng chuyên dụng, đậy nắp bình đảm bảo nitơ không thoát ra ngoài;

- Niêm phong bằng khóa số hoặc kẹp chì;

- Theo dõi nhiệt độ khoang chứa trong quá trình chuyên mẫu;

- Vận chuyển thùng chứa mẫu đến địa điểm yêu cầu;

- Bàn giao mẫu và hoàn thiện hồ sơ.

**Lưu ý:** Phải có các cảnh báo nguy hiểm theo quy định để tránh người vận chuyển và người khác tiếp xúc trực tiếp với nitơ lỏng.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- 1. Donna Regan.** Transporting and shipping of cellular therapy products. *Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation*, Bethesda, MD: AABB, 2009, **chapter 30**, p.362-374.



# **ĐỊNH NHÓM HLA ĐỘ PHÂN GIẢI CAO BẰNG KỸ THUẬT SSO-LUMINEX**

(Performing high-resolution HLA typing by SSO Luminex Technique)

## **I. NGUYÊN LÝ**

Dựa trên nguyên lý lai giữa đầu dò DNA với sản phẩm DNA của mẫu xét nghiệm đánh dấu bằng huỳnh quang, trong đó các đầu dò DNA được thiết kế đặc hiệu cho từng alen HLA ở độ phân giải cao (High resolution). Tùy theo mật độ huỳnh quang tương ứng, hệ thống Luminex đọc và xác định được tên đầu dò đã gắn với chuỗi DNA của mẫu và kiểu gen HLA tương ứng.

Nguồn gốc quy trình: theo quy trình kỹ thuật của Hiệp hội Ngân hàng máu Mỹ AABB và của hãng (1,2,3)

## **II. CHỈ ĐỊNH**

- Người bệnh ghép tế bào gốc tạo máu đồng loại, ghép cơ quan từ người cho;
- Mẫu máu của người hiến mô và các cơ quan;
- Các sản phẩm thu được từ người hiến tế bào gốc: máu ngoại vi, dịch tủy xương, máu dây rốn.

## **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Người bệnh ghép tế bào gốc tự thân.

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Người thực hiện**

Cán bộ được đào tạo để thực hiện kỹ thuật.

### **2. Phương tiện – Hóa chất**

#### **2.1. Phương tiện**

- Máy PCR, máy ủ nhiệt;
- Hệ thống Luminex;
- Máy ly tâm lạnh;
- Máy trộn mẫu vortex;
- Máy tính và phần mềm phân tích kết quả (LABScan);
- Micro Pipet, đầu côn lọc, ống nghiệm 1,5 ml, hốt vô trùng;
- Găng tay, mũ, khẩu trang.

#### **2.2. Hóa chất**

- Kít PCR gồm khay 96 giếng hoặc ống nghiệm chạy PCR, mồi DNA (primer) đặc hiệu HLA, đệm D-mix;

- Kít lai DNA chứa hạt nhựa gắn đầu dò (probe) đặc hiệu DNA đối với từng alen HLA, dung dịch streptavidin gắn huỳnh quang (SAPE), dung dịch đệm lai, đệm hồi tính, đệm biến tính, đệm rửa;

- Taq polymerase;
- Dung dịch sheath chạy máy;
- Cồn 96° – 100°C;
- Nước khử ion.

### **3. Mẫu bệnh phẩm**

Mẫu DNA (nồng độ 20-200 ng/μl) đã tách từ bệnh phẩm máu ngoại vi, máu dây rốn, dịch tủy xương.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Khuếch đại mẫu DNA sau tách**

- Hút 2 μl DNA vào mỗi ống nghiệm hoặc giếng;
- Trộn mỗi DNA, dung dịch đệm D-mix và Taq polymerase theo tỷ lệ phù hợp, trộn đều;
- Thêm 18μl hỗn hợp trên vào mỗi giếng hoặc ống nghiệm đã có DNA, đạt thể tích cuối cùng 20μl;
- Đậy kín phiến hoặc ống nghiệm, chuyển vào máy và chạy PCR.

### **2. Lai sản phẩm DNA đã khuếch đại với hạt SSO**

- *Biến tính và hồi tính:*
  - + Chuyển 5μl sản phẩm DNA khuếch đại vào mỗi giếng của phiến 96 giếng mới (số lượng giếng cần dùng tùy thuộc vào số locus cần xét nghiệm);
  - + Thêm 2,5μl đệm biến tính vào mỗi giếng, trộn đều, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút;
  - + Thêm 5μl đệm hồi tính, trộn đều;
  - + Giữ phiến trong bể đá trước khi lai.
- *Lai với đầu dò DNA:*
  - + Trộn hạt nhựa gắn đầu dò DNA và đệm lai theo tỷ lệ phù hợp vào mỗi giếng của phiến đã xử lý, đậy chặt phiến, vortex nhẹ;
  - + Ủ phiến trong máy ủ nhiệt ở 60°C, trong 15 phút;
  - + Thêm 100 μl đệm rửa vào mỗi giếng, đậy kín, ly tâm 1.000-1.300g trong 5 phút, hút bỏ dịch nổi, lặp lại bước rửa 2 lần.
- *Đánh dấu và phân tích:*
  - + Hút 50 μl dung dịch SAPE 1X vào mỗi giếng, đậy phiến, trộn nhẹ;

- + Chuyển phiên vào máy ủ nhiệt, ủ phiên ở 60°C trong 5 phút;
- + Rửa phiên, chuyển vào hệ thống máy Luminex để đọc;
- + Chạy máy theo chương trình và phân tích kết quả dựa theo phần mềm đi kèm với kit.

### **3. Trả kết quả**

- Ghi kết quả vào phiếu xét nghiệm; số
- Ký duyệt và kết quả cho bộ phận chỉ định;

### **4. Thu dọn dụng cụ, vệ sinh máy**

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. **Heather Dunckley** (2012). HLA typing by SSO and SSP methods. *Immunogenetics-Method in Molecular Biology*, **Volume 882**, p 9-25.
2. **Luminex** (2008). Luminex 200 system user manual.
3. **One Lambda** (2008). LAB Type SSO typing test product insert, Canoga Park.

## CHƯƠNG VI. QUY TRÌNH KỸ THUẬT LÂM SÀNG (Clinical techniques)

### TRAO ĐỔI HUYẾT TƯƠNG

#### I. NGUYÊN LÝ

Tách huyết tương từ máu của người bệnh bỏ đi và đồng thời truyền trả các thành phần hữu hình của máu cùng với huyết tương thay thế cùng nhóm của người khỏe mạnh hoặc các dung dịch điện giải thay thế.

#### II. CHỈ ĐỊNH

##### 1. Bệnh lý thần kinh

- Bệnh nhược cơ nặng;
- Bệnh viêm mạn tính đa dây thần kinh mất myelin;
- Hội chứng Guillain- Barré.

##### 2. Bệnh về thận

- Hội chứng Goodpasture;
- Viêm cầu thận ác tính.

##### 3. Bệnh về máu

- Hội chứng tăng độ quánh máu;
- Thiếu máu tan máu tự miễn;
- Ban xuất huyết giảm tiểu cầu tắc mạch (TTP);
- Ban xuất huyết giảm tiểu cầu sau truyền máu;
- Thiếu máu tan máu ở trẻ sơ sinh do bất đồng nhóm máu mẹ - con.

##### 4. Bệnh chuyển hoá

- Tăng cholesterol;
- Tăng tryglycerid.

##### 5. Ngộ độc thuốc và các hoá chất

Thuốc digitalis, asen, quinine...

#### III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

- Không có chống chỉ định tuyệt đối;
- Thận trọng trong các trường hợp người bệnh nặng có suy hô hấp, suy tuần hoàn và nhiễm trùng nặng.

#### IV. CHUẨN BỊ

### **1. Người thực hiện:**

- Một bác sĩ được đào tạo kỹ thuật trao đổi huyết tương;
- Một y tá được đào tạo kỹ thuật trao đổi huyết tương.

### **2. Phương tiện**

- Máy tách các thành phần máu tự động;
- Dụng cụ và vật tư tiêu hao tùy theo từng loại máy sử dụng và quy định của hãng sản xuất;
- Dung dịch thay thế theo chỉ định của bác sĩ điều trị: huyết tương thay thế cùng nhóm máu người bệnh, albumin...;
- Phiếu theo dõi thực hiện thủ thuật;
- Dụng cụ để chọc tĩnh mạch ngoại vi: bông, cồn, dây garo, băng dính cố định, găng tay, mũ, khẩu trang bảo hộ...;
- Bảng đo huyết áp, ống nghe;
- Cơ số thuốc cấp cứu theo quy định;
- Nếu dùng đường tĩnh mạch trung tâm: Bộ dụng cụ đã tiệt trùng để đặt catheter, ... theo quy trình tiêu chuẩn.

### **3. Người bệnh và người nhà người bệnh**

- Được giải thích kỹ về mục đích trao đổi huyết tương điều trị bệnh, các biến chứng có thể xảy ra trong và sau khi thực hiện thủ thuật, và phải ký vào giấy cam kết chấp nhận làm thủ thuật điều trị;
- Làm các xét nghiệm máu thường qui, các xét nghiệm Viêm gan virus B, C, HIV và các xét nghiệm đặc hiệu khác nếu cần (tùy theo từng bệnh), các xét nghiệm theo dõi và đánh giá kết quả điều trị.

### **4. Nơi làm thủ thuật**

- Nên thực hiện thủ thuật ở phòng vô trùng và có đủ phương tiện cấp cứu khi cần.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Tính toán lượng huyết tương thay thế:**

- Cần tính toán cụ thể số lượng huyết tương dự định loại bỏ và lượng dịch thay thế hoặc huyết tương thay thế truyền vào cho người bệnh theo công thức tính tiêu chuẩn.
- Thông thường máy trao đổi huyết tương trong thời gian 2 giờ có thể loại bỏ từ 1500 - 2000 ml huyết tương, đồng thời cần truyền vào 1500 - 2000 ml dịch thay thế hoặc huyết tương của người khỏe mạnh cùng nhóm máu.

## **2. Đường vào tĩnh mạch**

- Các người bệnh thay thế huyết tương cần có đường vào mạch máu đủ lớn để duy trì lưu lượng dòng chảy máu vào máy và đảm bảo thông thoáng cho đường máu trả về người bệnh, chọn vị trí lấy ven sao cho thủ thuật tiến hành thuận lợi nhất.

- Thiết lập một đường truyền tĩnh mạch ngoại vi khác để có thể song song đưa thuốc vào người bệnh trong trường hợp cần thiết.

## **3. Thiết lập vòng tuần hoàn ngoài cơ thể và trao đổi huyết tương theo quy trình của nhà sản xuất máy**

- Chọn chương trình;
- Chuẩn bị bộ kít;
- Chuẩn bị thực hiện thay thế huyết tương:
  - + Nhập thông tin người bệnh;
  - + Thực hiện quy trình trao đổi huyết tương;
  - + Kết nối người bệnh.

## **VI. THEO DÕI TRONG QUÁ TRÌNH ĐIỀU TRỊ**

Theo dõi hoạt động của máy và tình trạng người bệnh qua màn hình của máy, kết hợp với thăm khám lâm sàng để có thái độ xử trí đúng và kịp thời.

## **VII. CÁC XÉT NGHIỆM MÁU THEO DÕI NGƯỜI BỆNH**

### **1. Xét nghiệm trước và ngay sau khi tiến hành thủ thuật**

- Lấy mẫu máu xét nghiệm máu ngoại vi, máu xét nghiệm trong khoảng thời gian 24h trước khi tiến hành thủ thuật, gồm các xét nghiệm: Tổng phân tích máu ngoại vi, sinh hóa máu (điện giải đồ), đông máu cơ bản.

- Lấy mẫu máu ngay sau khi kết thúc thủ thuật; lấy mẫu máu tổng phân tích máu ngoại vi, xét nghiệm đông máu cơ bản, Sinh hóa máu ngay sau khi kết thúc thủ thuật để đánh giá kết quả và các thay đổi chỉ số máu ngay sau khi thực hiện thủ thuật, từ đó có chỉ định điều chỉnh các thay đổi kịp thời.

### **2. Xét nghiệm theo dõi**

- Sau khi kết thúc thủ thuật tại thời điểm 8h và 24h, tiến hành lấy mẫu xét nghiệm máu ngoại vi về tổng phân tích tế bào, Đông máu cơ bản và Sinh hóa máu để đánh giá thay đổi và hiệu quả của thủ thuật.

- Lưu ý: Vị trí lấy mẫu xét nghiệm tại thời điểm ngay sau kết thúc và ở mỗi lần lấy mẫu xét nghiệm tại một ven, mà ở đó không có đường truyền tĩnh mạch khác đang truyền.

## **VIII. THEO DÕI NGƯỜI BỆNH VÀ ĐIỀU CHỈNH**

**1. Người bệnh phải được theo dõi các dấu hiệu sinh tồn:** mạch, huyết áp, nhiệt độ...

- Theo dõi các thông số của máy và điều chỉnh thông số theo từng loại máy sử dụng.

- Theo dõi các xét nghiệm thường quy và đặc hiệu (tùy theo từng bệnh) để đánh giá kết quả điều trị.

**2. Kết thúc điều trị trả máu về:**

## **IX. NHỮNG TAI BIẾN VÀ XỬ TRÍ**

Trong quá trình điều trị có thể xảy ra các tai biến:

- Tụt huyết áp: Có thể xảy ra nhưng ít, khi huyết áp tối đa dưới 90 mmHg, hoặc giảm trên 30 mmHg ở người có tăng huyết áp: Xử trí truyền dịch NaCl 0,9% hoặc dung dịch cao phân tử, nếu không nâng được huyết áp thì cần sử dụng thuốc vận mạch theo phác đồ tiêu chuẩn.

- Các phản ứng không mong muốn cấp tính khi truyền các chế phẩm máu thay thế: Tùy theo các mức độ biểu hiện trên lâm sàng như mẩn ngứa, sốt, shock...xử trí thuốc theo phác đồ tiêu chuẩn trong “Quy chế truyền máu năm 2007”.

- Chảy máu: Thường gặp khi người bệnh có số lượng tiểu cầu thấp hay các rối loạn đông máu, xử trí truyền tiểu cầu hay các chế phẩm huyết tương phù hợp (huyết tương tươi đông lạnh, tủa lạnh).

- Nhiễm trùng: Đề dự phòng cần tiến hành thủ thuật trong phòng vô trùng tốt và nếu có nhiễm trùng phải sử dụng kháng sinh theo quy định.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Trung C.Nguyen, Joseph E. Kiss, et al. (2012), “the role of plasmapheresis in critical illness” Crit care clin. 2012 july; 28 (3). 453-468

# QUY TRÌNH GẠY BẠCH CẦU ĐIỀU TRỊ

## I. NGUYÊN LÝ

Hệ thống máy gặt tách tự động phân tách và thu nhận bạch cầu đơn nhân theo nguyên lý: Trong suốt quá trình gặt bạch cầu, máu toàn phần của người bệnh được chống đông bằng dung dịch chống đông tại vị trí lấy máu vào máy. Hệ thống buồng ly tâm phân tách máu toàn phần thành 3 lớp, lớp hồng cầu ở phía ngoài cùng, lớp buffy coat chứa bạch cầu ở giữa và lớp huyết tương giàu tiểu cầu ở trong cùng của buồng ly tâm. Hệ thống phân tách thành lớp ổn định giữa bề mặt hồng cầu/huyết tương sau khi quá trình phân tách bề mặt kết thúc, dòng chảy huyết tương trả về người bệnh sẽ được điều chỉnh bởi người vận hành để duy trì bề mặt ổn định. Hệ thống sẽ thu nhận bạch cầu đơn nhân từ buồng ly tâm qua dây thu nhận bạch cầu, trong khi đó huyết tương giàu tiểu cầu sẽ theo dây huyết tương để trộn với hồng cầu để trả về người bệnh theo dây dẫn trả máu.

## II. CHỈ ĐỊNH

Điều trị giảm tế bào lơ xê mi trong bệnh;

- Lơ xê mi cấp có số lượng bạch cầu  $\geq 100$  G/l;
- Lơ xê mi kinh dòng bạch cầu hạt số lượng bạch cầu  $\geq 100$  G/l;
- Tăng bạch cầu có kèm theo triệu chứng tắc mạch.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

- Không có chống chỉ định tuyệt đối;
- Thận trọng trong trường hợp người bệnh có giảm tiểu cầu kèm theo triệu chứng xuất huyết, người bệnh thiếu máu nặng;
- Người bệnh có rối loạn đông máu (DIC);
- Các tình trạng cấp cứu khác.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

- Bác sĩ ghi y lệnh và thực hiện kỹ thuật gặt bạch cầu điều trị;
- Y tá thực hiện quy trình lấy ven tĩnh mạch và thực hiện theo y lệnh của bác sĩ.

### 2. Phương tiện dụng cụ- hóa chất xét nghiệm

- Hệ thống máy lọc máu tự động;
- Bộ mâm ly tâm một chu trình của máy;
- Bộ sơ đồ lắp dây dẫn gặt bạch cầu điều trị kèm theo máy;



- Bộ kit gạn bạch cầu dùng 1 lần;
- Dung dịch chống đông máu ACD - A túi thể tích 750ml;
- 1000 ml dung dịch nước muối sinh lý 0,9% để tráng bộ kit trong chương trình gạn bạch cầu;
- Bộ dụng cụ lấy máu tĩnh mạch vô trùng.

### **3. Bệnh phẩm**

Mẫu máu tĩnh mạch: để xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu, xét nghiệm sinh hóa, xét nghiệm đông máu.

### **4. Phiếu xét nghiệm**

- Phiếu xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu;
- Phiếu xét nghiệm sinh hóa máu;
- Phiếu xét nghiệm đông máu.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

1. Giải thích thủ thuật và ký cam kết thực hiện thủ thuật của người nhà người bệnh.
2. Thực hiện theo quy trình hướng dẫn sử dụng của hệ thống gồm các bước:
  - Chuẩn bị dụng cụ lấy máu tĩnh mạch;
  - Lắp đặt bộ kit tách theo quy trình lắp đặt của máy;
  - Tráng dây bộ kit tách bạch cầu;
  - Nhập các thông số theo yêu cầu của chương trình gạn bạch cầu;
  - Kết nối ven người bệnh với bộ kit gạn bạch cầu;
  - Vận hành theo quy trình của máy gạn bạch cầu;
  - Theo dõi và xử trí lỗi trong quá trình gạn bạch cầu theo hướng dẫn của từng lỗi;
    - Kết thúc chương trình theo đúng quy trình kỹ thuật của máy;
    - Ghi chép hồ sơ các thông tin và kết quả chương trình;
    - Lấy mẫu máu làm xét nghiệm sau khi gạn bạch cầu, tổng phân tích tế bào máu, sinh hóa và đông máu.

## **VI. CÁC XÉT NGHIỆM MÁU THEO DÕI NGƯỜI BỆNH**

### **1. Xét nghiệm trước và ngay sau khi tiến hành thủ thuật**

- Lấy mẫu máu xét nghiệm máu ngoại vi, máu xét nghiệm trong khoảng thời gian 24h trước khi tiến hành thủ thuật, gồm các xét nghiệm: Tổng phân tích máu ngoại vi, sinh hóa máu (điện giải đồ), đông máu cơ bản.

- Lấy mẫu máu ngay sau khi kết thúc thủ thuật; lấy mẫu máu tổng phân tích máu ngoại vi, xét nghiệm đông máu cơ bản, Sinh hóa máu ngay sau khi kết thúc thủ thuật để đánh giá kết quả và các thay đổi chỉ số máu ngay sau khi thực hiện thủ thuật, từ đó có chỉ định điều chỉnh các thay đổi kịp thời.

## **2. Xét nghiệm theo dõi**

- Sau khi kết thúc thủ thuật tại thời điểm 8h và 24h, tiến hành lấy mẫu xét nghiệm máu ngoại vi về tổng phân tích tế bào, Đông máu cơ bản và Sinh hóa máu để đánh giá thay đổi và hiệu quả của thủ thuật.

- Lưu ý: Vị trí lấy mẫu xét nghiệm tại thời điểm ngay sau kết thúc và ở mỗi lần lấy mẫu xét nghiệm tại một ven, mà ở đó không có đường truyền tĩnh mạch khác đang truyền.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

### **1. Áp lực máu dòng vào quá thấp**

- Kiểm tra xem dây garo có bị gập hay xoắn không;
- Dây garo có thắt đúng không, thắt lại dây garo cho đúng;
- Kim lấy máu có bị chệch khỏi ven, chỉnh lại kim hoặc lấy lại ven khác.

### **2. Áp lực máu dòng trả về quá cao**

- Kiểm tra dây máu trả về có bị gập hoặc xoắn không, chỉnh lại dây khỏi gập, xoắn;
- Kim lấy máu trên đường máu về bị chệch khỏi ven, chỉnh lại kim nếu không được, lấy lại ven khác.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. **Vũ Văn Đỉnh**, “Hồi sức toàn tập”, Nhà xuất bản y học, 2005, Tr 610-625.
2. Cobespectra apheresis system operators manual.
3. Comtec apheresis system operators manual.
4. Apheresis, 2007.

# QUY TRÌNH GẶN TIỂU CẦU ĐIỀU TRỊ

## I. NGUYÊN LÝ

Hệ thống máy gạn tách tự động phân tách và thu nhận tiểu cầu theo nguyên lý: Trong suốt quá trình gạn tiểu cầu, máu toàn phần của người bệnh được chống đông bằng dung dịch chống đông tại vị trí lấy máu vào máy, hệ thống phân tách máu toàn phần thành 2 lớp. Trong lớp thứ nhất gồm hồng cầu và bạch cầu, trong lớp thứ 2 gồm huyết tương giàu tiểu cầu. Hồng cầu và bạch cầu sẽ trả về người bệnh qua dây thoát của hồng cầu. Huyết tương giàu tiểu cầu sẽ được phân tách lần 2. Tiểu cầu đậm đặc sẽ qua khe thu nhận tiểu cầu và theo dây thu nhận tiểu cầu lên túi thu nhận. Phần huyết tương còn lại sẽ quay trở về người bệnh theo dây huyết tương.

## II. CHỈ ĐỊNH

- Điều trị loại bỏ tiểu cầu khi số lượng tiểu cầu cao  $\geq 1000$  G/l;
- Loại bỏ tiểu cầu trong trường hợp số lượng tiểu cầu cao kèm theo triệu chứng tắc mạch

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

- Không có chống chỉ định tuyệt đối;
- Thận trọng trong trường hợp người bệnh có triệu chứng xuất huyết, người bệnh thiếu máu nặng;
- Người bệnh có rối loạn đông máu (DIC);
- Các tình trạng cấp cứu khác.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

- Bác sĩ ghi y lệnh và thực hiện kỹ thuật gạn tiểu cầu điều trị;
- Y tá thực hiện quy trình lấy ven tĩnh mạch và thực hiện theo y lệnh của bác sĩ.

### 2. Phương tiện dụng cụ- hóa chất xét nghiệm

- Hệ thống máy lọc máu tự động;
- Bộ mâm ly tâm tiểu cầu;
- Bộ sơ đồ lắp dây dẫn gạn tiểu cầu điều trị kèm theo máy;
- Bộ kit gạn tiểu cầu dùng 1 lần;
- Dung dịch chống đông máu ACD - A túi thể tích 750ml;

- 1.000 ml dung dịch nước muối sinh lý 0,9% để tráng bộ kit trong chương trình gạn tiểu cầu;
- Bộ dụng cụ lấy máu tĩnh mạch vô trùng.

### **3. Bệnh phẩm**

Mẫu máu tĩnh mạch: để xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu, xét nghiệm sinh hóa, xét nghiệm đông máu.

### **4. Phiếu xét nghiệm**

- Phiếu xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu;
- Phiếu xét nghiệm sinh hóa máu;
- Phiếu xét nghiệm đông máu.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

1. Giải thích thủ thuật và ký cam kết thực hiện thủ thuật của người nhà người bệnh
2. Thực hiện theo quy trình hướng dẫn sử dụng của hệ thống gồm các bước:
  - Chuẩn bị dụng cụ lấy ven;
  - Lắp đặt bộ kit tách theo quy trình lắp đặt của máy;
  - Tráng dây bộ kit tách tiểu cầu;
  - Nhập các thông số theo yêu cầu của chương trình gạn tiểu cầu;
  - Kết nối ven người bệnh với bộ kit gạn tiểu cầu;
  - Vận hành theo quy trình của máy gạn tiểu cầu;
  - Theo dõi và xử trí lỗi trong quá trình gạn tiểu cầu theo hướng dẫn của từng lỗi;
    - Kết thúc chương trình theo đúng quy trình kỹ thuật của máy;
    - Ghi chép hồ sơ các thông tin và kết quả chương trình;
    - Lấy mẫu máu làm xét nghiệm sau khi gạn tiểu cầu, tổng phân tích tế bào máu, sinh hóa và đông máu.

## **VI. CÁC XÉT NGHIỆM MÁU THEO DÕI NGƯỜI BỆNH**

### **1. Xét nghiệm trước và ngay sau khi tiến hành thủ thuật**

- Lấy mẫu máu xét nghiệm máu ngoại vi, máu xét nghiệm trong khoảng thời gian 24h trước khi tiến hành thủ thuật, gồm các xét nghiệm: Tổng phân tích máu ngoại vi, sinh hóa máu (điện giải đồ), đông máu cơ bản.
- Lấy mẫu máu ngay sau khi kết thúc thủ thuật; lấy mẫu máu tổng phân tích máu ngoại vi, xét nghiệm đông máu cơ bản, Sinh hóa máu ngay sau khi kết

thúc thủ thuật để đánh giá kết quả và các thay đổi chỉ số máu ngay sau khi thực hiện thủ thuật, từ đó có chỉ định điều chỉnh các thay đổi kịp thời.

## **2. Xét nghiệm theo dõi**

- Sau khi kết thúc thủ thuật tại thời điểm 8h và 24h, tiến hành lấy mẫu xét nghiệm máu ngoại vi về tổng phân tích tế bào, Đông máu cơ bản và Sinh hóa máu để đánh giá thay đổi và hiệu quả của thủ thuật.

- Lưu ý: Vị trí lấy mẫu xét nghiệm tại thời điểm ngay sau kết thúc và ở mỗi lần lấy mẫu xét nghiệm tại một ven, mà ở đó không có đường truyền tĩnh mạch khác đang truyền.

## **VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ**

### **1. Áp lực máu dòng vào quá thấp**

- Kiểm tra xem dây garo có bị gập hay xoắn không;
- Dây garo có thắt đúng không, thắt lại dây garo cho đúng;
- Kim lấy máu có bị chệch khỏi ven, chỉnh lại kim hoặc lấy lại ven khác.

### **2. Áp lực máu dòng trả về quá cao**

- Kiểm tra dây máu trả về có bị gập hoặc xoắn không, chỉnh lại dây khỏi gập, xoắn;
- Kim lấy máu trên đường máu về bị chệch khỏi ven, chỉnh lại kim nếu không được, lấy lại ven khác.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. **Vũ Văn Đính**, “Hồi sức toàn tập”, Nhà xuất bản y học, 2005, Tr 610-625.
2. Cobespectra apheresis system operators manual.
3. Comtec apheresis system operators manual.
4. Apheresis, 2007.

# QUY TRÌNH TRUYỀN HÓA CHẤT ĐƯỜNG TĨNH MẠCH

## I. ĐẠI CƯƠNG

Truyền thuốc hóa chất đường tĩnh mạch (hóa trị liệu) là một phương pháp điều trị cơ bản trong ung thư và một số bệnh lý. Đa số các thuốc hóa chất được đưa vào cơ thể bằng đường tĩnh mạch. Tuy nhiên, không đơn giản chỉ là tiêm truyền tĩnh mạch, quy trình truyền hóa chất có những điểm đặc biệt riêng.

## II. CHỈ ĐỊNH

Trong hầu hết các bệnh lý ung thư, có thể sử dụng đơn độc hoặc phối hợp với xạ trị và/hoặc phẫu thuật.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

- Tuổi quá cao (không có giới hạn tuyệt đối, tuy nhiên thường hạn chế khi tuổi > 70 tuổi);
- Suy chức năng cơ quan (suy tim, suy gan, suy thận nặng), phải điều chỉnh liều cho phù hợp;
- Gia đình người bệnh không đồng ý điều trị.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người bệnh

- Giải thích cho người bệnh và người nhà người bệnh về tình trạng bệnh và sự cần thiết phải điều trị hóa chất đường tĩnh mạch, những tác dụng phụ có thể gặp phải (cần hết sức thận trọng, tránh gây ra suy sụp tinh thần ở người bệnh);
- Làm xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu và các xét nghiệm đánh giá chức năng tim, gan, thận: điện tim, siêu âm tim (nếu cần thiết), ure, creatinin, acid uric, men gan, bilirubin;
- Đo chiều cao, cân nặng, tính diện tích da cơ thể của người bệnh (BSA);
- Tiến hành đặt catheter tĩnh mạch trung tâm hoặc buồng truyền dưới da (tùy vào điều kiện thực tế tại mỗi cơ sở điều trị).

### 2. Thuốc, hóa chất

- Thuốc hóa chất sẽ được pha trong dung dịch natri clorua 0.9% hoặc dung dịch glucose 5% (tùy theo đặc tính của từng loại thuốc hóa chất). Việc chuẩn bị thuốc hóa chất trước khi truyền sẽ được thực hiện tại khoa Dược lâm sàng, trong các buồng an toàn sinh học;

- Khoa Dược lâm sàng sẽ chuyển các chai dung dịch hóa chất đã pha với liều lượng theo đúng chỉ định của bác sĩ điều trị đến khoa lâm sàng.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

- Điều dưỡng lâm sàng sau khi nhận thuốc hóa chất đã pha thành dung dịch cần phải kiểm tra lại các thông tin dán trên nhãn chai thuốc, bao gồm: các thông tin hành chính về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, năm sinh, số giường bệnh), tên loại thuốc hóa chất, hàm lượng thuốc được pha trong chai, thời điểm pha thuốc, đối chiếu với y lệnh đã ghi trong bệnh án;

- Đo các chỉ số sinh tồn của người bệnh (mạch, nhiệt độ, huyết áp) trước khi tiến hành truyền thuốc hóa chất;

- Thiết lập đường truyền tĩnh mạch cho người bệnh với dung dịch natri clorua 0.9%, nên sử dụng dây truyền đếm giọt. Trong trường hợp không có điều kiện đặt catheter tĩnh mạch trung tâm thì đặt đường truyền tĩnh mạch ngoại vi phải đảm bảo kim nằm trong lòng mạch, tránh lấy các tĩnh mạch nhỏ dễ vỡ dẫn đến thuốc hóa chất ra ngoài mạch làm viêm mô mềm xung quanh;

- Thay chai dung dịch natri clorua 0.9% bằng chai dung dịch hóa chất đã được chuẩn bị sẵn, điều chỉnh tốc độ truyền theo y lệnh ghi trong bệnh án. Một số thuốc đòi hỏi phải được truyền tĩnh mạch liên tục trong 24 giờ hoặc tốc độ truyền tăng dần theo thời gian;

- Theo dõi sát người bệnh trong suốt quá trình truyền thuốc hóa chất đường tĩnh mạch. Một số tác dụng phụ có thể xảy ra ngay khi truyền: phản ứng phản vệ, dị ứng, buồn nôn, nôn, đau đầu, chóng mặt;

- Ngừng truyền thuốc hóa chất ngay nếu có phản ứng bất thường xảy ra, kiểm tra các dấu hiệu sinh tồn, duy trì đường truyền tĩnh mạch bằng dung dịch natri clorua và báo ngay cho bác sĩ điều trị biết để kịp xử trí.

## **VI. NHỮNG TAI BIẾN VÀ XỬ TRÍ**

- Hội chứng tiêu khối u (Tumor lysis syndrome): gây ra bởi sự phá hủy hàng loạt các tế bào u, giải phóng ồ ạt các chất trong bào tương tế bào gây tăng acid uric, tăng kali máu, và gây suy thận cấp. Để hạn chế hội chứng tiêu khối u, cần truyền dịch cho người bệnh trước và sau khi truyền hóa chất song song với sử dụng thuốc lợi niệu, thông thường cần truyền thêm 2000-3000ml dịch/ m<sup>2</sup> da cơ thể.

- Thuốc chống nôn do tác dụng của hóa chất: Ondansetron tiêm tĩnh mạch hoặc uống trước khi bắt đầu truyền hóa chất 20-30 phút. Có thể kết hợp thêm Primperan và/ hoặc Corticoid.

- Duy trì cân bằng nước và điện giải (đặc biệt là kali máu).

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Patient and provider safety with the chemotherapy infusion process, 2011
2. Chemotherapy administration, 2012



# **TRUYỀN MÁU TẠI GIƯỜNG BỆNH**

## **(Người bệnh điều trị nội trú và ngoại trú)**

### **I. ĐẠI CƯƠNG**

Truyền máu tại giường bệnh là bước cuối của quy trình truyền máu lâm sàng, Trực tiếp đưa máu của người cho vào máu của người nhận do đó đòi hỏi an toàn cao và theo dõi cẩn trọng tại giường bệnh.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Mỗi loại chế phẩm máu có chỉ định riêng biệt

#### **1. Máu toàn phần**

- Thay thế hồng cầu trong mất máu cấp không kèm theo giảm thể tích toàn phần;

- Truyền thay máu;

- Người bệnh cần truyền hồng cầu mà không có sẵn khối hồng cầu đậm đặc.

#### **2. Khối hồng cầu đậm đặc**

- Thay thế hồng cầu ở người bệnh thiếu máu;

- Sử dụng cùng các dung dịch thay thế (dung dịch keo hoặc dung dịch tinh thể) trong mất máu cấp.

#### **3. Khối tiểu cầu**

Điều trị chảy máu do (giảm số lượng tiểu cầu, giảm chức năng tiểu cầu).

#### **4. Huyết tương tươi đông lạnh**

Điều trị thay thế tình trạng thiếu nhiều yếu tố đông máu;

- Bệnh gan (suy gan, xơ gan);

- Quá liều thuốc chống đông Warfarin;

- Giảm yếu tố đông máu trên người bệnh truyền máu khối lượng lớn;

- Đông máu rải rác trong lòng mạch (DIC);

- Xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP).

#### **5. Tủa lạnh**

- Thiếu yếu tố VIII (bệnh Hemophilia A);

- Thiếu yếu tố XIII;

- Bệnh Von Willebrand;

- Thiếu hụt fibrinogen, DIC.

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

Không có chống chỉ định

## **IV. CHUẨN BỊ**

### **1. Bảo quản chế phẩm máu trước khi truyền**

#### **1.1. Hồng cầu và máu toàn phần**

- Hồng cầu và máu toàn phần phải được bảo quản ở nhiệt độ trong khoảng từ 2°C đến 6°C;

- Hồng cầu và máu toàn phần phải được truyền trong vòng 30 phút sau khi bỏ ra khỏi tủ lạnh.

#### **1.2. Khô tiểu cầu**

- Khô tiểu cầu phải được đặt trong hộp cách nhiệt chuyên dụng để giữ nhiệt độ vào khoảng 20°C đến 24°C;

- Khô tiểu cầu phải được truyền ngay sau khi lĩnh.

#### **1.3. Huyết tương tươi đông lạnh và tủa lạnh**

- Huyết tương tươi đông lạnh cần được truyền trong vòng 30 phút sau khi phá đông.

- Nếu chưa cần sử dụng ngay, huyết tương tươi đông lạnh phải được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 2°C đến 6°C và truyền trong vòng 24 giờ.

### **2. Kiểm tra túi máu trước khi truyền**

- Bất cứ dấu hiệu nào của tan máu trong lớp huyết tương đều là dấu hiệu cho thấy máu đã bị nhiễm khuẩn, bị làm đông hoặc làm ấm ở nhiệt độ quá cao.

- Bất cứ dấu hiệu nào của nhiễm khuẩn, ví dụ như sự đổi màu sắc của hồng cầu, trông sẫm hơn hoặc chuyển màu tím/đen.

- Bất cứ cục máu đông nào cũng cho thấy có thể máu đã không được lắc đúng quy cách để chất chông đông hoà đều khi lấy máu từ người cho.

- Bất cứ dấu hiệu nào cho thấy túi máu bị thủng hoặc bị mở ra từ trước.

*Nếu có bất cứ dấu hiệu bất thường nào tìm thấy trên túi máu thì không được truyền đơn vị máu đó và phải thông báo ngay cho ngân hàng máu.*

### **3. Kiểm tra để xác định chính xác họ tên người bệnh và chế phẩm máu trước khi truyền**

Việc kiểm tra lần cuối này phải được làm ngay tại giường người bệnh ngay trước khi bắt đầu truyền chế phẩm máu, do điều dưỡng hoặc bác sĩ thực hiện.

#### **Kiểm tra xác định chính xác người bệnh lần cuối cùng:**

- Hỏi người bệnh để kiểm tra tên, họ, ngày sinh và các thông tin cần thiết khác.

Nếu người bệnh đang trong tình trạng hôn mê thì cần hỏi người nhà người bệnh hoặc một nhân viên khác để xác định chính xác người bệnh.

- Kiểm tra chính xác người bệnh trên cơ sở đối chiếu với:

Hồ sơ bệnh án

- Kiểm tra các chi tiết sau trên nhãn hoà hợp dán trên túi máu xem có phù hợp chính xác với hồ sơ người bệnh của người bệnh không:

+ Họ tên người bệnh;

+ Giường bệnh, phòng bệnh hoặc phòng mổ;

+ Nhóm máu của người bệnh;

+ Túi máu;

+ Nhãn hoà hợp.

- Kiểm tra ngày hết hạn của túi máu.

## **V. ĐỊNH LẠI NHÓM MÁU TẠI GIƯỜNG**

Trực tiếp đưa máu (truyền máu) vào tĩnh mạch người bệnh: bước cuối cùng của truyền máu do đó bác sĩ điều trị cần kiểm tra lại kết quả định lại nhóm máu, nếu phù hợp hoàn toàn, theo y lệnh của bác sĩ, điều dưỡng mở khóa dây truyền máu, từ từ 10, 20 giọt cho đến mức tối đa theo y lệnh.

- Truyền máu toàn phần, khối hồng cầu, bạch cầu: sử dụng huyết thanh mẫu định lại nhóm máu ABO của người bệnh và đơn vị máu trước truyền.

- Truyền khối tiểu cầu, huyết tương: sử dụng huyết thanh mẫu định lại nhóm máu ABO của người bệnh và làm phản ứng chéo giữa mẫu máu người bệnh và mẫu chế phẩm máu.

## **VI. THEO DÕI TRUYỀN MÁU VÀ CHẾ PHẨM MÁU**

### **1. Đối với mỗi đơn vị máu truyền vào, cần phải theo dõi người bệnh ở từng giai đoạn của quá trình truyền máu**

- Trước khi bắt đầu truyền máu;

- 15 phút sau khi bắt đầu truyền máu;

- Ít nhất mỗi giờ trong quá trình truyền máu;

- Khi truyền máu xong;

- 4 giờ sau khi truyền máu xong.

### **2. Tại mỗi giai đoạn nêu trên, cần ghi lại thông tin vào bảng theo dõi người bệnh**

Toàn trạng của người bệnh, các chỉ số sinh tồn

### **3. Ghi chép lại vào phiếu truyền máu**

- Thời gian bắt đầu truyền máu;

- Thời gian hoàn tất truyền máu;

- Thể tích và số lượng tất cả các chế phẩm máu được truyền vào;
- Tất cả các phản ứng phụ có hại xảy ra.

## **VII. NHỮNG TAI BIẾN VÀ XỬ TRÍ**

### **1. Phát hiện và xử trí các tác dụng không mong muốn trong truyền máu và ngay sau truyền máu:**

- Khi xuất hiện các triệu chứng bất thường ở người bệnh đang truyền máu hoặc chế phẩm máu, phải ngừng truyền ngay và báo cáo bác sĩ điều trị để xử trí kịp thời. Khi cần thiết phải mời bác sĩ hoặc người phụ trách của cơ sở cung cấp máu để phối hợp xử trí.

- Trường hợp người bệnh có phản ứng nặng hoặc tử vong có liên quan đến truyền máu thì cơ sở cung cấp máu phải báo cáo ngay với lãnh đạo bệnh viện và cơ sở cung cấp máu để phối hợp tìm nguyên nhân và đề xuất ý kiến giải quyết.

- Lập báo cáo tác dụng không mong muốn liên quan đến truyền máu (theo mẫu số 6), bàn giao cho cơ sở cung cấp máu các túi máu, chế phẩm máu, dây truyền máu và các loại thuốc tiêm, dịch truyền khác sử dụng cho người bệnh vào thời điểm xảy ra tác dụng không mong muốn. Thời gian lưu giữ các bệnh phẩm trên và các mẫu máu có liên quan ít nhất là 14 ngày kể từ lúc xảy ra tác dụng không mong muốn.

- Cơ sở cung cấp máu phải xét nghiệm các mẫu bệnh phẩm để xác định nguyên nhân và lập phiếu xét nghiệm tác dụng không mong muốn liên quan đến truyền máu.

### **2. Phát hiện và xử trí tác dụng không mong muốn xảy ra chậm sau truyền máu:**

Cơ sở điều trị sử dụng máu cần phối hợp với cơ sở cung cấp máu để xác định nguyên nhân tác dụng không mong muốn xảy ra chậm và áp dụng các biện pháp theo dõi và điều trị tích cực theo quy định của Bộ Y tế.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Quy chế truyền máu 2013.
2. Sử dụng máu trong lâm sàng.

# RÚT MÁU

## I. NGUYÊN LÝ

Dựa trên kỹ thuật như lấy máu từ người cho máu, nhưng trên người bệnh bị bệnh đa hồng cầu cần nhanh chóng tháo bỏ máu để giảm độ quánh của máu, tránh các tai biến do tăng độ quánh máu gây ra, là một phương pháp điều trị bệnh lý tăng sinh quá mức dòng hồng cầu.

## II. CHỈ ĐỊNH

Người bệnh được chẩn đoán bệnh đa hồng cầu có hematocrit  $>0,45(1/1)$  ở nam và  $> 0,42(1/1)$  ở nữ.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

- Không có chống chỉ định tuyệt đối;
- Thận trọng ở người bị bệnh lý tim mạch, phụ nữ mang thai.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

Cần 01 Bác sĩ, 01 điều dưỡng đã được đào tạo chuyên khoa huyết học truyền máu.

### 2. Phương tiện dụng cụ

- Túi lấy máu chất dẻo loại 350 ml trở lên;
- Dây ga ro, bông băng, cồn sát trùng;
- Ống nghe, huyết áp kế;
- Cân túi máu...

### 3. Người bệnh: Có chỉ định rút máu

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Thăm khám người bệnh, làm xét nghiệm công thức máu, độ quánh máu.
2. Giải thích cho người bệnh và người nhà về lợi ích của việc tháo máu và các khó khăn khi rút máu.
3. Thông báo cho điều dưỡng chuẩn bị dụng cụ phương tiện để tiến hành rút máu
4. Thực hiện rút máu theo cáo bước sau.

Bước 1: Chuẩn bị người bệnh: để người bệnh nằm ngửa, tư thế đầu thấp, thỏa mái, Xác định vị trí chọc kim tháo máu.

Bước 2: Chuẩn bị túi tháo máu ghi thông tin người bệnh trên túi, ghi rõ máu hủy, làm một nút thắt mỏng cách kim khoảng 10cm, đảm bảo khi tháo máu vẫn chảy được qua nút thắt bình thường.

Bước 3: Ga ro trên vị trí tháo máu 7-10 cm, sát trùng.

Bước 4: Chọc tĩnh mạch cho máu chảy vào túi máu.

Bước 5: Không tháo dây ga ro để máu chảy vào túi máu, có thể bảo người bệnh nắm mở tay nhẹ nhàng để máu chảy nhanh và đều hơn, đến khi đủ lượng máu cần tháo.

Bước 6: Thắt chặt nút thắt đã làm, tháo bỏ ga ro, rút kim, băng cầm máu vị trí chọc.

Bước 7: Chuyển túi máu hủy theo qui chế rác thải y tế.

Bước 8: Theo dõi sát người bệnh trong quá trình rút máu và sau rút máu 15 phút.

Bước 9: Ghi chép bệnh án tình trạng trước sau tháo máu, toàn thân, mạch nhiệt độ, huyết áp. Ghi sổ thủ thuật theo quy định.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Người bệnh thấy dễ chịu, nhiều người bệnh hết triệu trứng đau đầu, khó chịu, các tác dụng phụ xảy ra hết nhanh.

- Máu rút đủ số lượng theo chỉ định, thủ thuật an toàn.

## **VII. NHỮNG TAI BIẾN VÀ XỬ TRÍ**

- Ngất xỉu, hạ huyết áp.. Xử lý nằm đầu thấp, thở sâu, rút máu tốc độ chậm lại, trợ tim, trường hợp nặng ngừng tim, ngừng hô hấp (rất hiếm) tiến hành hồi sức nhân tạo ngay.

- Buồn nôn và nôn: sẽ hết dần.

- Co giật hay co cứng cơ: sẽ hết dần.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Đỗ Trung Phần, “Tế bào gốc và bệnh lý tế bào gốc tạo máu, chẩn đoán, phân loại điều trị”, NXB Y học, 2008, Tr 291-298.
2. Bài giảng Huyết học – Truyền máu sau đại học “Các bệnh tăng sinh tủy mạn ác tính”, NXB Y học, 2006, Tr 138-142.

# CHỌC TỦY SỐNG LẤY DỊCH NÃO TỦY XÉT NGHIỆM

## I. NGUYÊN LÝ

Là phương pháp đưa kim vào khoang dưới nhện vùng thắt lưng để lấy dịch não tủy.

## II. CHỈ ĐỊNH

### 1. Các bệnh nhiễm khuẩn

- Viêm màng não
- Viêm não
- Áp xe não

### 2 Các bệnh viêm không do nhiễm khuẩn

- Xơ hệ thống.
- Guillain - Barré.
- Bệnh Luput ban đỏ hệ thống.

### 3. Các bệnh ung thư

- Loxêmi cấp dòng Tủy, dòng Lympho và U lympho có thâm nhiễm thần kinh trung ương.
- Các bệnh ung thư có thâm nhiễm não và màng não.
- U não.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

- Tăng áp lực nội sọ quá cao do khối u chón chỗ hoặc do tắc hệ thống dẫn lưu của não thất.
- Chấn thương tủy hoặc chèn ép tủy.
- Nhiễm trùng tại chỗ vị trí chọc dò.
- Bệnh lý giảm tiểu cầu, rối loạn đông máu.
- Suy hô hấp, suy tuần hoàn nặng.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

- Bác sĩ
- Điều dưỡng phụ (nếu bệnh nhi thì cần thêm 1 điều dưỡng)

### 2. Phương tiện, dụng cụ

- Kim chọc dò kích cỡ 22G hoặc 20G, với trẻ em thì sử dụng kim ngắn hơn.
- Bơm tiêm

- Thuốc gây tê.
- Dung dịch sát khuẩn Povidone Iodine 10% (Betadine)
- Khăn vô khuẩn.
- Ống nghiệm (4 ống).

### **3. Người bệnh**

Được giải thích kỹ về mục đích làm thủ thuật, người thực hiện:, nơi và thời gian thực hiện. Người bệnh được dặn không ăn uống gì và đại tiểu tiện trước khi và sau khi thực hiện thủ thuật.

### **4. Phiếu xét nghiệm**

- Sinh hóa nước dịch.
- Tế bào nước dịch.
- Nuôi cấy vi khuẩn.
- Các xét nghiệm đặc thù chuyên khoa khác (BK, PCR lao, tìm nấm, virus...)

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Tư thế người bệnh**

Người bệnh ngồi hoặc nằm cong lưng về phía thầy thuốc, cúi gập đầu về phía ngực, co hai đùi và căng chân về phía bụng. Với trẻ em thì cần một điều dưỡng một tay giữ gáy một tay giữ khoeo chân chân để tránh phản ứng bất thường.

### **2. Xác định mốc.**

Đường nối hai mào chậu của người bệnh sẽ đi qua thân đốt sống L4, vị trí chọc thường ở giữa L3-L4 hoặc cao hơn L2-L3.

### **3. Sát trùng và gây tê.**

Bác sĩ tiến hành thủ thuật đi găng vô khuẩn, sát trùng vị trí chọc từ trong ra ngoài. Trải khăn vô khuẩn. Điều dưỡng đưa bơm tiêm có thuốc gây tê để thủ thuật viên gây tê cho người bệnh.

### **4. Tiến hành chọc dò.**

Chọc kim chính giữa cột sống tại vị trí khe giữa hai đốt sống một góc chéo 15<sup>0</sup>, đưa kim qua da, tổ chức dưới da, các dây chằng cột sống, khoang ngoài màng cứng, màng cứng rồi vào khoang dưới nhện. Kéo nòng kim để dịch chảy ra.

Nếu không thấy dịch phải rút kim ra và điều chỉnh lại.



5. Điều dưỡng viên đưa áp kế cho thủ thuật viên đo áp lực dịch não tủy. Tiếp đó lần lượt hứng dịch não tủy vào từng ống xét nghiệm.

6. Thủ thuật viên rút kim chọc dò, điều dưỡng phụ đặt gạc lên vùng lưng vừa chọc và dán băng giữ bên ngoài.

7. Người bệnh nằm sấp hoặc nằm nghiêng sau chọc dò. Theo dõi toàn trạng người bệnh.

8. Thủ thuật viên ghi kết quả việc chọc dò vào hồ sơ bệnh án. Điều dưỡng kiểm tra họ tên người bệnh trên ống và giấy xét nghiệm, ghi chép vào phiếu chăm sóc người bệnh.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

### **1. Dịch não tủy bình thường**

- Dịch trong không màu.
- Áp lực 50-180mmHg
- Protein 15-40mg/100ml.
- Glucose 50-80mg/100ml.
- Tế bào: 0-4 bạch cầu/mm<sup>3</sup>.

### **2. Dịch não tủy bệnh lý**

#### **2.1 Thay đổi về áp lực.**

- Tăng áp lực dịch não tủy do khối u chèn chỗ hoặc do nhiễm trùng.
- Giảm áp lực dịch não tủy do tắc nghẽn lưu thông phía trên chỗ chọc dò.

#### **2.2 Thay đổi màu sắc.**

- Dịch đục do tăng bạch cầu trong dịch não tủy thường gặp do nhiễm khuẩn.
- Màu đỏ do chảy máu khoang dưới nhện, chấn thương do chính thủ thuật.
- Màu vàng do tổn thương lao, chảy máu cũ.

#### **2.3 Thành phần dịch não tủy.**

- Tăng protein: Do viêm, khối u, chảy máu vào dịch não tủy.
- Giảm protein: Dịch não tủy tiết ra nhiều hơn bình thường.
- Glucose tăng: Tăng đường máu toàn thân.
- Glucose giảm: Nhiễm trùng, lao.
- Tăng bạch cầu: Viêm màng não, áp xe não, thâm nhiễm do bệnh ác tính.
- Có hồng cầu: Do chảy máu khoang dưới nhện, chạm vào mạch máu vùng chọc dò.

## **VII. NHỮNG TAI BIẾN VÀ XỬ TRÍ**

- Thoát vị não (lọt hạnh nhân tiêu não hoặc lọt cực thái dương) có thể gây tử vong. Nếu nghi ngờ có thể chụp CT trước.
- Nhức đầu sau chọc dò: Nằm nghỉ, giảm đau.
- Chảy máu ở vị trí chọc có thể gây chèn ép tủy hoặc chảy máu vào tủy sống: Theo dõi và điều chỉnh rối loạn đông cầm máu nếu có.
- Nhiễm khuẩn: Kháng sinh toàn thân
- Rỉ dịch tại chỗ chọc: Theo dõi và vệ sinh tại chỗ.
- Choáng do đau hoặc thuốc gây tê: Xử trí theo phác đồ chống choáng.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật bệnh viện, tập 1, Nhà xuất bản y học, 1999, tr 61-63.

# CHỌC TỬY SỐNG TIÊM HÓA CHẤT NỘI TỬY

## I. NGUYÊN LÝ

Là phương pháp đưa hóa chất qua kim chọc dò vào khoang dưới nhện vùng thất lưng để điều trị.

## II. CHỈ ĐỊNH

- Điều trị hoặc dự phòng thâm nhiễm thần kinh trung ương bệnh Loxêmi cấp dòng Tủy, dòng Lympho và U lympho;
- Các bệnh ung thư có di căn não và màng não;
- Dự phòng thâm nhiễm thần kinh trung ương trong Hội chứng thực bào máu.

## III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

- Nhiễm trùng tại chỗ vị trí chọc;
- Giảm tiểu cầu nặng, rối loạn đông máu;
- Suy hô hấp, suy tuần hoàn nặng.

## IV. CHUẨN BỊ

### 1. Người thực hiện

- Bác sĩ;
- Điều dưỡng phụ (nếu bệnh nhi thì cần thêm 1 điều dưỡng).

### 2. Phương tiện, dụng cụ

- Kim chọc dò kích cỡ 22G hoặc 20G, với trẻ em thì sử dụng kim ngắn hơn;
- Bơm tiêm;
- Thuốc gây tê;
- Hóa chất điều trị: Thường được sử dụng là Cytarabin, Methotrexate hoặc Methylprednisolone;
- Dung dịch sát khuẩn Povidone Iodine 10% (Betadine);
- Khăn vô khuẩn;
- Ống nghiệm (2 ống).

### 3. Người bệnh

Được giải thích kỹ về mục đích làm thủ thuật, người thực hiện:, nơi và thời gian thực hiện. Người bệnh được dặn không ăn uống gì và đại tiểu tiện trước khi và sau khi thực hiện thủ thuật.

### 4. Phiếu xét nghiệm

- Sinh hóa nước dịch;
- Tế bào nước dịch.

## **V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH**

### **1. Tư thế người bệnh**

Người bệnh ngồi hoặc nằm cong lưng về phía thầy thuốc, cúi gập đầu về phía ngực, co hai đùi và căng chân về phía bụng. Với trẻ em thì cần một điều dưỡng một tay giữ gáy một tay giữ khoeo chân chân để tránh phản ứng bất thường.

### **2. Xác định mốc.**

Đường nối hai mào chậu của người bệnh sẽ đi qua thân đốt sống L4, vị trí chọc thường ở giữa L3-L4 hoặc cao hơn L2-L3.

### **3. Sát trùng và gây tê.**

Bác sĩ tiến hành thủ thuật đi găng vô khuẩn, sát trùng vị trí chọc từ trong ra ngoài. Trải khăn vô khuẩn. Điều dưỡng đưa bơm tiêm có thuốc gây tê để thủ thuật viên gây tê vị trí chọc.

### **4. Tiến hành tiêm tủy sống.**

Chọc kim chính giữa cột sống tại vị trí khe giữa hai đốt sống một góc chéo  $15^\circ$ , đưa kim qua da, tổ chức dưới da, các dây chằng cột sống, khoang ngoài màng cứng, màng cứng rồi vào khoang dưới nhện. Kéo nòng kim để dịch chảy ra. Nếu không thấy dịch phải rút kim ra và điều chỉnh lại.

5. Điều dưỡng viên lần lượt hứng dịch não tủy vào từng ống xét nghiệm. Thủ thuật viên lắp bơm tiêm có sẵn hóa chất vào đốc kim và rút nhẹ nếu thấy có dịch chảy vào bơm tiêm thì mới được bơm thuốc, nếu không phải điều chỉnh lại kim cho đến khi hút được dịch ra.

6. Thủ thuật viên rút kim tiêm tủy, điều dưỡng phụ đặt gạc lên vùng lưng vừa chọc và dán băng giữ bên ngoài.

7. Người bệnh nằm sấp hoặc nằm nghiêng sau khi tiêm. Theo dõi toàn trạng người bệnh.

8. Thủ thuật viên ghi kết quả việc tiêm tủy sống vào hồ sơ bệnh án. Điều dưỡng kiểm tra họ tên người bệnh trên ống và giấy xét nghiệm, ghi chép vào phiếu chăm sóc người bệnh.

## **VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ**

- Khi rút bơm tiêm có dịch trong chảy ra và khi bơm thuốc thấy nhẹ là thuốc đã vào khoang dưới nhện;

- Dịch não tủy có màu hồng do kim chạm vào mạch máu vùng chọc dò;
- Bơm thuốc thấy nặng có thể kim chưa vào đúng khoang dưới nhện hoặc vùng tiêm bị xơ do những lần tiêm trước.

## **VII. NHỮNG TAI BIẾN VÀ XỬ TRÍ**

- Nhức đầu sau chọc dò: Nằm nghỉ, giảm đau;
- Chảy máu ở vị trí chọc có thể gây chèn ép tủy hoặc chảy máu vào tủy sống: Theo dõi và điều chỉnh rối loạn đông cầm máu nếu có;
- Nhiễm khuẩn tại chỗ hoặc hệ thống não tủy: Kháng sinh toàn thân;
- Rỉ dịch tại chỗ chọc: Theo dõi và vệ sinh tại chỗ;
- Choáng do đau hoặc thuốc gây tê: Xử trí theo phác đồ chống choáng.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật bệnh viện*, tập 1, Nhà xuất bản y học, 1999, tr 61-63.

# **GHÉP TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU TỰ THÂN**

## **(Autologous stem cell transplantation)**

### **I. ĐẠI CƯƠNG**

Ghép tế bào gốc tạo máu tự thân là phương pháp sử dụng tế bào gốc của người bệnh ghép lại cho người bệnh. Đây là một phương pháp được xem như một đợt hóa trị liệu liều cao nhằm mục đích điều trị cho các bệnh máu ác tính không đáp ứng với các phác đồ đa hóa trị liệu chuẩn hoặc tái phát. Hiệu quả của ghép tế bào gốc tự thân chủ yếu có được là nhờ đa hóa trị liệu liều cao. Đây là một biện pháp hỗ trợ hệ thống sinh máu của người bệnh phục hồi nhanh chóng sau đa hóa trị liệu liều cao để phòng tránh những biến chứng đe dọa tính mạng người bệnh.

Nguồn tế bào gốc tạo máu có thể là tế bào gốc tủy xương hoặc tế bào gốc máu ngoại vi. Bên cạnh đó có thể sử dụng tế bào gốc máu dây rốn tự thân đã bảo quản lạnh.

Tiêu chuẩn số lượng tế bào gốc tạo máu đủ để ghép dựa vào số lượng tế bào CD34+ phải đạt  $> 3 \times 10^6$ /kg cân nặng của người bệnh.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

#### **Ghép tự thân**

- Các bệnh ác tính về máu: Đa u tủy xương, U lympho không Hodgkin, loxêmi cấp dòng tủy...
- Các bệnh u bướu: ung thư vú, buồng trứng, phổi, u tế bào mầm...
- Các bệnh tự miễn: ban đỏ rải rác, xơ hoá hệ thống, viêm khớp dạng thấp, xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch...

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

- Tuổi trên 65 đối với Đa u tủy xương và trên 60 tuổi đối với U lympho ác tính không Hodgkin;
- Người bệnh có các bệnh lý về gan, thận, phổi và bệnh tim.

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

Bác sĩ, điều dưỡng và kỹ thuật viên chuyên khoa huyết học - truyền máu.

## 2. Phương tiện

### 2.1. Buồng bệnh:

- Buồng bệnh có hệ thống lọc không khí áp lực dương;
- Hệ thống nước sinh hoạt trong buồng bệnh đã được lọc vi khuẩn;
- Hệ thống máy gạn tách tế bào gốc máu ngoại vi;
- Hệ thống máy theo dõi các dấu hiệu sinh tồn và các khí trong máu, máy điện tim, máy giúp thở;

### 2.2. Thuốc:

- Các thuốc đặc trị:
  - + Huy động tế bào gốc: dùng các thuốc kích thích tăng trưởng tế bào gốc tạo máu (G-CSF, GM-CSF).
  - + Thuốc điều trị trước ghép: tùy từng bệnh có phác đồ và có các loại thuốc khác nhau.
  - + Thuốc điều kiện hóa cho ghép: tùy theo từng bệnh.
- Các thuốc hỗ trợ khác.

## 3. Người bệnh

- Người bệnh đã đạt được lui bệnh hoàn toàn hoặc một phần bằng hoá trị liệu;
- Người bệnh không mắc bệnh di truyền bẩm sinh, không bị các bệnh tim, gan, thận;
- Người bệnh và gia đình đồng ý tiến hành ghép tế bào gốc.

## 4. Hồ sơ bệnh án: theo quy định của Bộ Y tế.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**Bước 1:** Người bệnh được điều trị hóa chất trước ghép theo phác đồ. Đặt catheter Hiskman vào tĩnh mạch trung tâm.

**Bước 2:** Chuẩn bị khối tế bào gốc cho ghép

+ Huy động tế bào gốc ở người bệnh: Tiêm thuốc kích bạch cầu G-CSF đơn thuần với liều 10 µg/kg/ngày hoặc phối hợp Cyclophosphamide (liều 2g/m<sup>2</sup>, 1 lần) với G-CSF. Đếm số lượng bạch cầu và số lượng tế bào CD34+

hàng ngày. Nếu số lượng tế bào CD34+ > 10 tế bào/ml thì tiến hành thu thập tế bào gốc máu ngoại vi.

+ Thu thập tế bào gốc máu ngoại vi bằng máy tách tế bào trong túi tế bào gốc. Kết thúc thu gom khi số lượng CD34+ >  $3 \times 10^6$ /kg cân nặng.

+ Lưu trữ tế bào gốc máu ngoại vi ở nhiệt độ  $-196^{\circ}\text{C}$  trong nitơ lỏng hoặc nhiệt độ  $2-8^{\circ}\text{C}$  trong vòng 72 giờ.

**Bước 3:** Điều kiện hóa trước ghép cho người bệnh: tùy theo từng bệnh, ví dụ:

+ Đa u tủy xương: Melphalan liều  $200\text{mg}/\text{m}^2$

+ U lympho ác tính không Hodgkin: phác đồ BEAM hoặc LEED.

**Bước 4:** Truyền khối tế bào gốc và chăm sóc

+ Truyền khối tế bào gốc: truyền vào thời điểm 24h sau khi kết thúc điều kiện hóa. Nếu là dịch tủy xương hoặc tế bào gốc ngoại vi truyền 40 giọt/phút. Nếu dịch tế bào máu dây rốn thì bơm chậm qua ống thông Hiskman từ 10 - 15 phút.

+ Chăm sóc người nhận ghép: Theo phương pháp chăm sóc toàn diện. Theo dõi xét nghiệm tổng phân tích máu hàng ngày, các xét nghiệm chức năng gan, thận 3 ngày/lần.

+ Chống nhiễm khuẩn, nhiễm nấm: Sử dụng kháng sinh phòng ngừa.

+ Truyền chế phẩm máu: truyền khối hồng cầu và khối tiểu cầu gạn tách từ một người cho khi có chỉ định.

+ Sử dụng thuốc kích bạch cầu (G-GSF, GM-CSF).

+ Kiểm tra tủy đồ ngày thứ 30 sau ghép.

**Bước 5:** Đánh giá người bệnh để ra viện:

- Người bệnh không sốt, không cần dinh dưỡng qua đường tĩnh mạch;

- Không cần truyền tiểu cầu hay ít hơn 2 tuần/lần;

- Số lượng tuyệt đối bạch cầu trung tính (ANC) >  $1\text{G}/\text{L}$ .

## VI. THEO DÕI

- Theo dõi diễn biến của các dấu hiệu sinh tồn, lượng khí trong máu lúc ghép hoặc thu thập tế bào gốc máu ngoại vi.



- Theo dõi lâm sàng và xét nghiệm sau ghép cho đến khi tuỷ đã mọc trong cơ thể người bệnh.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Trong quá trình truyền tế bào gốc: thường không có tai biến; có thể có tăng huyết áp cần cho thuốc hạ áp, phản ứng rét run do dị ứng xử trí corticoid...

- Sau ghép: có thể có sốt nhiễm trùng, nhiễm nấm cần điều trị bằng kháng sinh tĩnh mạch.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1. Jo JC, Kang BW, Jang G, Sym SJ, Lee SS, Koo JE, Kim JW, Kim S, Huh J, Suh C.** BEAC or BEAM high-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma patients: comparative analysis of efficacy and toxicity. *Ann Hematol.* 2008 Jan;87(1):43-8
- 2. Takamatsu H, Munemoto S, Murata R, Terasaki Y, Nakajima K, Nakao S.** Post-transplantation Consolidation and Maintenance Therapy with lenalidomide for Japanese Patients with Multiple Myeloma. *Anticancer Res.* 2013 Dec;33(12):5681-5.
- 3. McCarthy PL, Hahn T.** Strategies for induction, autologous hematopoietic stem cell transplantation, consolidation, and maintenance for transplantation-eligible multiple myeloma patients. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* ;2013:496-503.
- 4. Fratino L, Rupolo M, Mazzucato M, Berretta M, Lleshi A, Tirelli U, Michieli M.** Autologous stem cell transplantation as a care option in elderly patients. A review. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013 Nov;13(9):1419-29.

# **GHÉP TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU ĐỒNG LOẠI**

## **(Allogeneic stem cell transplantation)**

### **I. ĐẠI CƯƠNG**

Ghép tế bào gốc đồng loại là phương pháp truyền tế bào gốc tạo máu từ người cho cùng huyết thống hay không cùng huyết thống phù hợp hệ kháng nguyên bạch cầu HLA (Human Leukocyte Antigen).

Nguồn tế bào gốc tạo máu có thể là tế bào gốc tủy xương. Tuy nhiên, hiện nay tế bào gốc ở máu ngoại vi dần thay thế. Bên cạnh đó có thể sử dụng tế bào gốc máu dây rốn.

Tiêu chuẩn số lượng tế bào gốc tạo máu đủ để ghép dựa vào số lượng tế bào CD34+ phải đạt  $> 3 \times 10^6$ /kg cân nặng của người bệnh.

### **II. CHỈ ĐỊNH**

Ghép đồng loại

- Các bệnh máu ác tính: loxêmi cấp, loxêmi kinh, rối loạn sinh tủy, U lympho ác tính.

- Các bệnh di truyền bẩm sinh

- Các bệnh lý huyết học không ác tính: suy tủy xương, đái huyết sắc tố, Thalassemia...

### **III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH**

- Người bệnh có các bệnh lý về gan, thận, phổi và tim bẩm sinh, suy tim.

- Tuổi  $> 55$ .

### **IV. CHUẨN BỊ**

#### **1. Người thực hiện**

Bác sĩ, điều dưỡng và kỹ thuật viên chuyên khoa huyết học - truyền máu.

#### **2. Phương tiện**

##### **2.1. Buồng bệnh**

- Buồng bệnh có hệ thống lọc không khí áp lực dương;

- Hệ thống nước sinh hoạt trong buồng bệnh đã được lọc vi khuẩn;

- Hệ thống máy gan tách tế bào gốc máu ngoại vi;

- Hệ thống máy theo dõi các dấu hiệu sinh tồn và các khí trong máu, máy điện tim, máy giúp thở;

##### **2.2. Thuốc:**

- Các thuốc đặc trị

- + Huy động tế bào gốc: sử dụng các thuốc kích thích tăng trưởng tế bào (G-CSF, GM-CSF);
- + Diệt tuỷ xương: Busulfan, Melphalan.
- + Thuốc ức chế miễn dịch: Fludarabin, Cyclophosphamide, ATG.
- + Thuốc ức chế miễn dịch phòng ghép chống chủ: Cyclosporin A, Methotrexate, Cellcept (MMF), Tacrolimus.
- Các thuốc hỗ trợ khác.

### 2.3. Vật tư tiêu hao:

- Bộ kit lọc bạch cầu của khối hồng cầu, tiểu cầu;
- Kit sàng lọc CMV cho chế phẩm máu.

### 3. Người bệnh

- Người bệnh đã đạt được lui bệnh hoàn toàn hoặc một phần bằng điều trị bằng điều trị hoá chất;
- Người bệnh không mắc bệnh di truyền bẩm sinh, không bị các bệnh tim, gan, thận;
- Người cho sản phẩm ghép bao gồm tuỷ xương, tế bào gốc tạo máu ngoại vi hay máu dây rốn phải khoẻ mạnh; không bị các bệnh nhiễm trùng đặc biệt là HIV; không bị nhiễm HCV, HBV giai đoạn tiến triển; không mắc các bệnh ở tim, gan, thận... không có nguy cơ tuần hoàn, hô hấp khi chiết tách tế bào gốc máu ngoại vi và nguy cơ biến chứng gây mê khi lấy tuỷ xương.

### 4. Hồ sơ bệnh án: theo quy định của Bộ Y tế.

## V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

**Bước 1:** Kiểm tra xét nghiệm HLA người cho và người nhận. Nếu phù hợp thì tiến hành bước 2.

**Bước 2:** Kiểm tra lâm sàng người cho và người nhận về tim, phổi, thần kinh... các xét nghiệm máu; chức năng gan, thận, các yếu tố lây nhiễm...; các xét nghiệm phân tích nước tiểu, điện tim, siêu âm tim...

**Bước 3:** Chuẩn bị khối tế bào gốc cho ghép:

- Huy động tế bào gốc của người cho: tiêm thuốc kích bạch cầu G-CSF với liều 10 µg/kg/ngày. Đếm số lượng bạch cầu và số lượng tế bào CD34+ hàng ngày. Nếu số lượng tế bào CD34+ > 10 tế bào/ml thì tiến hành thu thập tế bào gốc máu ngoại vi.

- Thu thập tế bào gốc máu ngoại vi bằng máy tách tế bào trong túi tế bào gốc. Kết thúc thu gom khi số lượng CD34+ > 3x10<sup>6</sup>/kg cân nặng.

- Lưu trữ tế bào gốc máu ngoại vi ở nhiệt độ -196°C trong nitơ lỏng hoặc nhiệt độ 2-8°C trong vòng 72 giờ.

**Bước 4:** Người bệnh được đặt ống thông Hiskman vào tĩnh mạch trung tâm và điều trị điều kiện hóa theo phác đồ giảm cường độ liều hay diệt tủy theo phác đồ.

**Bước 5:** Truyền khối tế bào gốc: truyền vào thời điểm 24-48h sau khi kết thúc điều kiện hóa. Nếu là dịch tủy xương hoặc tế bào gốc ngoại vi truyền 40 giọt/phút. Nếu dịch tế bào máu dây rốn thì bơm chậm qua ống thông Hiskman từ 10 - 15 phút.

**Bước 6:** Các bước theo dõi và xử trí biến chứng sau ghép.

+ Phòng ghép chống chủ nếu ghép từ anh chị em ruột phù hợp HLA: Sử dụng các thuốc ức chế miễn dịch (Cyclosporin A) từ ngày D-4, liều 3 mg/kg/ngày (tĩnh mạch) hoặc 5mg/kg/ngày (uống). Phối hợp methotrexate liều thấp 5mg/m<sup>2</sup>/ngày x ngày thứ 1, 3, 6.

+ Chống nhiễm khuẩn, nấm: Có thể sử dụng kháng sinh phòng ngừa.

+ Sử dụng các chế phẩm máu: loại bạch cầu bằng máy lọc bạch cầu, tia xạ gamma và sàng lọc CMV âm tính.

+ Sử dụng thuốc kích bạch cầu (G-CSF, GM-CSF) tùy từng trường hợp.

+ Chăm sóc người nhận ghép: Theo dõi lượng nước đưa vào (ăn, uống, truyền dịch) và lượng nước thải ra phải đảm bảo cân bằng. Theo dõi xét nghiệm tổng phân tích tế bào máu hàng ngày, các xét nghiệm chức năng gan, thận 3 ngày/lần.

+ Kiểm tra: các xét nghiệm định lượng CMV và nồng độ Cyclosporin định kỳ, kiểm tra tủy đồ ngày thứ 30 sau ghép.

**Bước 7:** Đánh giá người bệnh để ra viện:

- Người bệnh không sốt, không cần dinh dưỡng qua đường tĩnh mạch.

- Không cần truyền tiểu cầu hay ít hơn 2 tuần/lần.

- Số lượng tuyệt đối bạch cầu trung tính (ANC) > 1G/L.

## VI. THEO DÕI

- Theo dõi diễn biến của các dấu hiệu sinh tồn, lượng khí trong máu lúc ghép hoặc thu thập tế bào gốc máu ngoại vi.

- Theo dõi lâm sàng và xét nghiệm sau ghép cho đến khi tủy đã mọc trong cơ thể người bệnh.

## VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

### 1. Các biến chứng sớm

- Nhiễm trùng: vi khuẩn, vi rút (BK, CMV và EBV tái hoạt động trở lại), nhiễm nấm;

- Viêm bàng quang chảy máu;
- Hội chứng mọc mảnh ghép;
- Ghép chống chủ cấp tính;
- Thải ghép;
- Tái phát.

## **2. Các biến chứng muộn**

- Ghép chống chủ mạn tính;
- Giảm tiểu cầu: do phá huỷ ở ngoại vi hay do tủy bị ức chế;
- TTP hay HUS: hay liên quan thuốc ức chế MD như CSA;
- Suy thận: lưu ý do thuốc, TTP;
- Biến chứng thần kinh: hội chứng PRES (do CSA);
- Viêm BQ chảy máu: do Cyclo, BK và Adeno VR;
- Tăng sinh lympho do EBV hoạt động trở lại.

## **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- 1. Childs R, (2005)**, “Protocol title: Non-myeloablative Allogeneic Peripheral Blood Mobilized hematopoietic Precursor Cell Transplantation for Benign Hematological Disorders and solid Tumors. American Society of Hematology Education Program Book”, *Hematology*: 372-397.
- 2. Cho BS, KS Eom, YJ Kim, HJ Kim, S Lee, CK Min, SG Cho, WS Min, CW Park, CC Kim and JW Lee (2010)**, “HLA-matched sibling transplantation with BM and CD34+-purified PBSCs in adult patients with high-risk severe aplastic anemia to overcome graft rejection without an increase in GVHD”, *Bone Marrow Transplantation*, 45, 1497-1501.(2).
- 3. Islam MS, Anoop P, Datta P. (2010)**, “ Implications of CD34+ cell dose on clinical and haematological outcome of allo-SCT for acquired aplastic anaemia”, *Bone Marrow Transplantation (2010)* 45, 886–894.