

ỦY BAN NHÂN DÂN TỈNH TÂY NINH
SỞ Y TẾ TÂY NINH

TÀI LIỆU HƯỚNG DẪN ÔN THI
Tuyển dụng viên chức ngành y tế năm 2017
Đối tượng: Cử nhân xét nghiệm

Tây Ninh, tháng 6 năm 2017



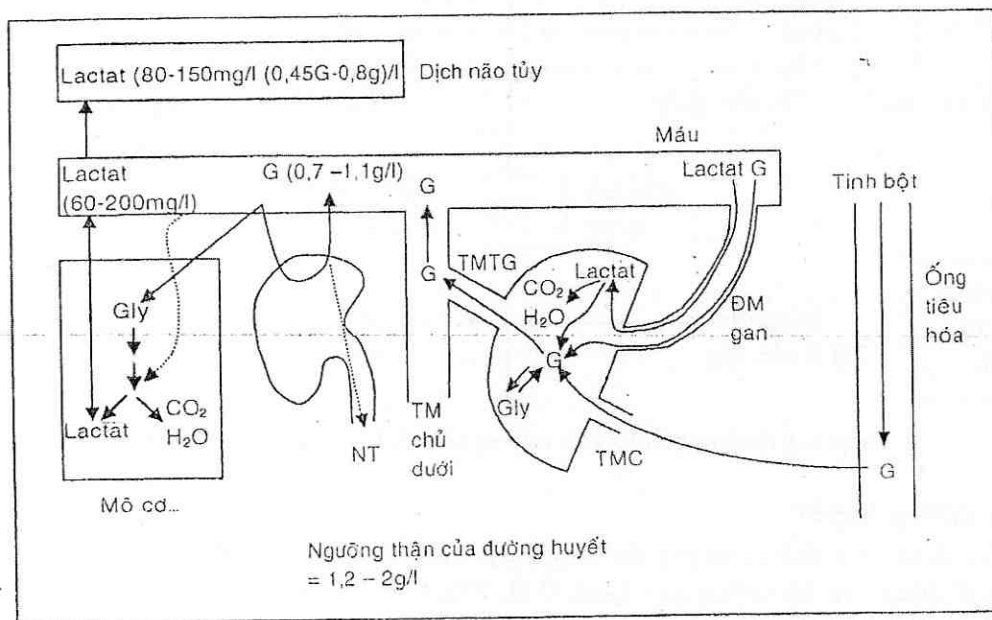
NỘI DUNG ÔN TẬP LÝ THUYẾT VÀ THỰC HÀNH

1. Glucose huyết, đường niệu, lactat
2. Các xét nghiệm một số bệnh thận
3. Các xét nghiệm thường dùng trong chẩn đoán bệnh gan mật
4. Huyết đồ
5. Kỹ thuật định nhóm máu ABO
6. Các phương pháp nhuộm
7. Nhuộm kháng acid
8. Kỹ thuật làm phản ứng chéo
9. Kỹ thuật chạy công thức máu trên máy huyết học
10. Kỹ thuật sử dụng vật kính 100x
11. Kỹ thuật làm phết nhuộm gram vi khuẩn, đọc tiêu bản sau nhuộm
12. Kiểm định nhóm máu ABO bằng phương pháp Beth-Vincent
13. Kỹ thuật xác định thời gian máu chảy - Kỹ thuật Lee White trong ống nghiệm

CHƯƠNG 7

GLUCOSE-HUYẾT (ĐƯỜNG-HUYẾT) ĐƯỜNG NIỆU, LACTAT VÀ THỂ CÊTON

Glucose là cơ chất chuyển hóa chủ yếu của glucid. Glucose huyết (đường huyết), đường niệu, lactat và thể ceton có nhiều ý nghĩa lâm sàng. Đại cương quá trình chuyển hóa của glucose như sau (hình 7.1).



Hình 7.1: Chuyển hóa Glucose (G). Gly = Glycogen, ĐM: Động mạch
TMC: Tĩnh mạch chủ, TMTG: Tĩnh mạch trên gan

1. GLUCOSE-HUYẾT

1.1. Trị số bình thường và thay đổi sinh học

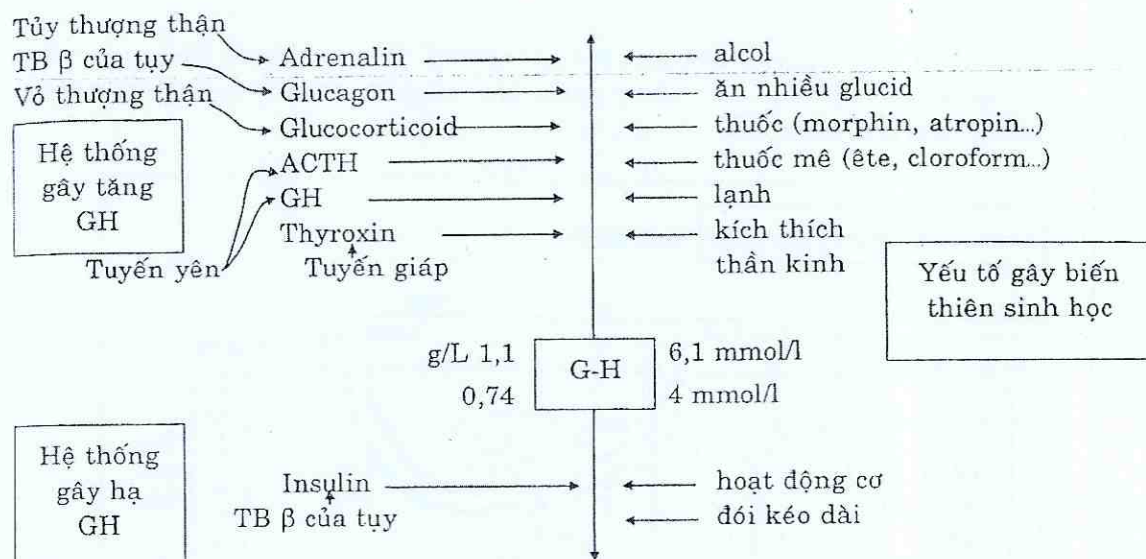
Với phương pháp thông dụng hiện nay ở ta dùng O.toluidin thì trị số bình thường của G-H là 0,7 - 1,1g/L (4-6,1 mmol/L).

Hạ đường huyết: thấp hơn 0,7g/L (4mmol/L)

Tăng đường huyết: cao hơn 1,25g/L (7 mmol/L)

Cơ thể có những hệ thống điều hòa đường huyết: hệ thống gây tăng đường huyết hệ thống gây hạ đường huyết. Hoạt động phối hợp nhịp nhàng giữa 2 hệ thống này khiến đường huyết được duy trì ở nồng độ tương đối ổn định. Mặt khác có những yếu tố gây biến thiên sinh học (hình 7.2).

G-H còn thay đổi theo tuổi (trẻ sơ sinh đẻ non và trẻ sơ sinh có G-H thấp hơn khoảng ½, trẻ em 2-3 ngày có G-H thấp hơn bình thường 10-30%, người 50-60 tuổi có G-H hơn cao hơn), theo trạng thái sinh lý (người có mang G-H thấp hơn khoảng 10%), theo việc dùng thuốc (thuốc chống động kinh gây hạ, thuốc lợi niệu thiazid gây tăng G-H...).



Hình 7.2: Những yếu tố ảnh hưởng đối với G-H (glucose-huyết)

1.2. Hạ đường huyết

Nói chung hạ đường huyết do tăng hoạt động của hệ thống gây hạ G-H hoặc do giảm hoạt động của hệ thống gây tăng G-H. Nếu G-H hạ dưới 0,45g/L (2,5 mmol/L) thì cần xử lý kịp thời.

- Bệnh của tụy tạng:* quá sản đơn thuần, cường insulin, insulinoma (u tế bào đảo), viêm tụy, thiếu glucagon.
- Bệnh nội tiết:* giảm năng giáp, giảm năng yên, giảm adrenalin, giảm năng vỏ thượng thận (Addison), thiếu kém ACTH và somatotropin.
- Tổn thương hệ thống thần kinh trung ương:* viêm não, viêm màng não, chảy máu màng não, di chứng chấn thương sọ não.
- Bệnh gan:* viêm gan cấp nhiễm khuẩn, nhiễm độc, teo gan vùng cấp, xơ gan, vàng da nặng, ung thư nguyên phát hoặc di căn.
- Hạ đường huyết nặng:* chiếm khoảng 70% hạ đường huyết tự nhiên, không có những tổn thương thực thể, nhưng có sự ức chế hệ thống gây tăng đường huyết hoặc sự tăng hoạt động của hệ thống gây hạ đường huyết. Gặp ở:
 - Người bị cắt dạ dày (do đáp ứng của tụy tạng nguyên vẹn đối với sự tràn ngập glucose vào máu).
 - Đói ăn, đói glucid hoặc chán ăn tâm thần.
 - Hoạt động cơ bắp mạnh và kéo dài
 - Mất glucid trong tiểu đường thận (hiếm) hoặc trong quá trình sinh sữa.
 - Những người cường thần kinh phế vị, dễ xúc động (hạ đường huyết 2-3 giờ sau ăn, nôn, nhức đầu, đau thượng vị).
- Hạ đường huyết phát sinh do:* điều trị bằng insulin nhầm liều, tai biến do dùng sulfamid gây hạ đường huyết ở bệnh nhân tiểu đường và bệnh nhân không bị tiểu đường (TD: xơ cứng thành mạch, bệnh Parkinson), nhiễm độc rượu cấp, nghiện thuốc lá.
- Hạ đường huyết ở trẻ em:*

- Hạ đường huyết sinh lý rõ rệt ở trẻ em sơ sinh (0,32-0,4 g/L hay 1,75-2,225 mmol/L ở giờ 3-4 tăng lên 0,48 g/L hay 2,65 mmol ở giờ 48, rồi 0,5 g/L hay 2,75 mmol/L ở trẻ bú).
- Trẻ đẻ non, con của người mẹ bị tiểu đường.
- Loạn nguyên hồng cầu trẻ mới sinh.
- Chưa trưởng thành của hệ thống thần kinh nhạy cảm với sự hạ đường huyết chịu trách nhiệm về sự đáp ứng adrenalin và yên thượng thận.
- Hạ đường huyết cảm ứng bởi leucin (một acid gây hạ G-H ở một số trẻ em có bệnh di truyền nhạy cảm với leucin) khi trẻ ăn sữa bò, trứng, thịt giàu leucin.
- Cơ hạ đường huyết liên quan đến nôn mửa tăng aceton-máu, với bệnh tiêu chảy mỡ, nhiễm mỡ phì đại...

h) *Bệnh enzym*: do thiếu enzym:

- Thiếu glucose 6-phosphatase: bệnh tích glycogen typ I của Cori (bệnh Von-Gierke) gan, thận
- Thiếu amylo-1,6-glucosidase, bệnh tích glycogen gan-cơ typ III của Cori.
- Thiếu phosphorylase: bệnh tích glycogen typ IV của Cori.
- Thiếu galacto-1-phosphouridyl-transferase (bệnh galactose-huyết di truyền).
- Thiếu Fructose kinase và Fructose-1,6-diphosphat kinase (bệnh không dung nạp fructose).

i) *Bệnh khác*: Carcinoma thượng thận, carcinoma dạ dày, sarcoma xơ, tổn thương vùng dưới đồi, suy dinh dưỡng...

1.3. Tăng đường huyết

Nói chung là do tăng hoạt động của hệ thống gây tăng đường huyết hoặc suy giảm tụy nội tiết. Mọi trị số trên 1,8 g/L hay 10 mmol/L sau bữa ăn 2 giờ đều có thể nghi là tiểu đường.

- Tăng đường huyết chủ yếu gặp trong bệnh tiểu đường do tụy (tụy giảm tiết insulin); mới đầu G-M chỉ dưới 2 g/L, sau tăng tới 3, 4, 5 g/L, có khi trên 5 g/L.
- U glucagon.
- Giảm insulin.
- Tăng đường huyết thứ phát: bệnh to đầu cực và khổng lồ (cường yên), bệnh Cushing (cường vỏ thượng thận), u tủy thượng thận, viêm tụy, nhiễm sắc tố sắt ở tụy, carcinoma tụy, suy thận, một số bệnh gan, chấn thương hoặc sau phẫu thuật...
- Một số trường hợp khác: tiêm adrenalin, tâm chấn (stress: xúc động, bồng, choáng, gây mê); bệnh não Wernicke (thiếu Vitamin B₁); tiêm ACTH, sốt kéo dài.

2. ĐƯỜNG NIỆU

Thường danh từ này được dùng để chỉ glucose trong NT. Nhưng ngoài glucose có thể có loại đường khác trong NT (lactose, pentose).

2.1. Glucose niệu (G-NT)

Glucose lọt ra NT khi nồng độ G-H vượt quá ngưỡng thận. Ngưỡng thận tăng theo tuổi và theo tình trạng mắc bệnh tiểu đường tụy, có thể dao động từ 1,6 g/L đến 3 g/L.

Cũng có khi glucose ra NT khi chức năng tái hấp thu của ống thận giảm: tiểu đường thận, hội chứng Toni-Debré-Fanconi...

a) *G-NT kèm theo tăng G-H*

- Gặp trong tiểu đường tụy, G-NT đạt tới 80 g/L, khi nồng độ G-NT đạt 40 g/L thì có tiểu nhiều

Phân biệt hai dạng tiểu đường:

- Tiểu đường béo hoặc tiểu đường của người lớn tuổi: lượng NT 24h thường là 2-4L/24h; có protein-niệu nhẹ, hiếm khi có tiểu thể ceton.
 - Tiểu đường gầy hoặc phụ thuộc insulin ở người trẻ tuổi: nặng, thể tích NT 24h: 5-15L, glucose có thể đạt 500-1000 g/24h, Nitơ-niệu tăng, tai biến nhiễm acid-ceton.
 - Còn gặp trong cường giáp, cường yên, cường vô thượng thận, một số bệnh gan.
- b) *G-NT không kèm theo tăng G-H:*
- Tiểu đường thận: G-H bình thường, glucose NT thường xuyên và thường không quá 20 g/L
 - Glucose niệu do ăn quá nhiều đường.
 - Sau cắt dạ dày, nối dạ dày ruột; do tăng hấp thu qua đường tiêu hóa.
 - G-NT thần kinh: Liệt toàn thân, bệnh Tabes, động kinh, hysteria...
 - Những trạng thái ngột thở (hen, nhiễm độc CO).
 - Bệnh nhiễm trùng: bạch cầu, thương hàn, bệnh tinh hồng nhiệt, sốt rét.
 - Nhiễm độc morphin, atropin, arsenic, phospho, nitrobenzen...
 - Do thuốc: steroid vô thượng thận, sinh dục, thuốc lợi tiểu thiazid...
 - G-NT nhẹ: ở người có thai (sự có thai làm tăng bệnh tiểu đường do đó cho phép phát hiện tiểu đường tiềm tàng), do tăng dòng máu tới thận và giảm tạm thời ngưỡng thận, nên có G-NT (không quá 10 g/L) và không có tăng G-H, khi dễ có thể mất hoặc thay bằng lactose NT.

2.2. Đường khác glucose

- Lactose-NT; cuối kỳ thai, trong thời kỳ cho bú (không quá 7-8g/L); một số đẻ non, sơ sinh, trẻ bú: do không có hoạt tính lactase ở ruột.
- Levulose hay fructose: do thiếu fructokinase hoặc aldolase (fructose-huyết di truyền trầm trọng).
- Galactose-NT: thiếu galactose transferase (bệnh galactose-huyết bẩm sinh).
- Pentose-NT: do ăn (arabinose) hoặc vô căn (bệnh di truyền: xylose-niệu).
- Còn gặp maltose, saccarose trong NT.

3. LACTAT-HUYẾT VÀ LACTAT-DNT

3.1. Lactat-H

Trị số bt: 60-200 mg/L (0,66-2,42 mmol/L) máu TM, 30-100 mg/L (0,3-1,1 mmol/L) máu ĐM; ở trẻ nhỏ: những số liệu cao hơn rõ, Lactat-H sinh lý biểu thị thăng bằng giữa mức sản xuất (hồng cầu, cơ, não, tủy thượng thận) và mức tiêu thụ (bồi não, tim, gan, cơ vân). Tăng lactat-H sinh lý khi các mô thiếu oxy: hoạt động cơ kéo dài...

Thay đổi bệnh lý: Nhồi máu phổi, viêm phổi, bại liệt thể hô hấp, dùng thuốc gây mê, hôn mê nhiễm acid tiểu đường, tích glycogen do gan thiếu enzym chuyển galactose thành glucose, choáng, dùng biguanid, sau uống rượu. Lactat-H có thể vượt quá 500mg/L. Khi truyền dịch glucose có thể có tăng lactat-H nhẹ mà không nhiễm acid.

3.2. Lactat-DNT

Trị số bt: 60-200 mg/L, thường tăng trong: tiểu đường, viêm màng não mủ (tăng tới 900mg/L, kèm theo nhiễm acid và hạ pH), viêm màng não lao (500 mg/L), thường không thay đổi khi bị viêm màng não lympho-bào.

4. MỘT SỐ BỆNH THẬN

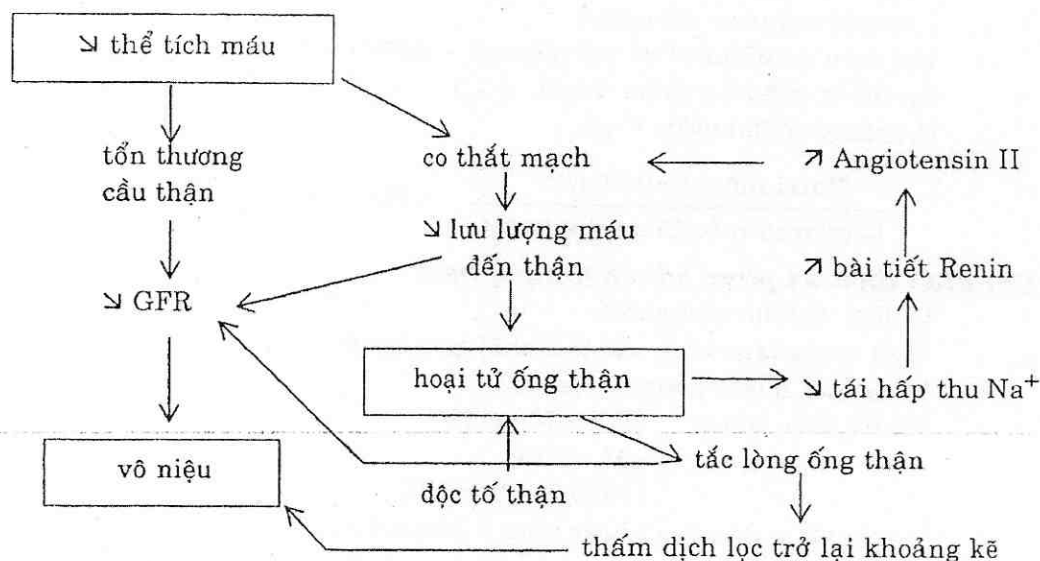
4.1. Suy thận cấp

4.1.1. Đại cương

- Suy thận cấp là sự giảm đột ngột và trầm trọng chức năng thận, xảy ra nhanh chóng nhưng có thể phục hồi hoàn toàn.
- Triệu chứng nổi bật là vô niệu, urê huyết rất cao.
- Chiếm khoảng 5% bệnh nhân nằm viện ở khoa thận
 - 60% liên quan đến phẫu thuật hoặc chấn thương.
 - 40% liên quan đến thuốc, độc chất.
 - 1-2% liên quan đến thai nghén.

Nguyên nhân phổ biến nhất đưa đến suy thận cấp là thiếu máu thận.

4.1.2. Sinh lý bệnh học



Hình 13.6: Cơ chế gây suy thận cấp

4.1.3. Diễn tiến của một suy thận cấp (viêm, hoại tử ống thận)

Bệnh thường diễn tiến qua 3 giai đoạn:

- Giai đoạn đầu (khoảng 1 tuần lễ)
 - Tiểu ít (vô niệu: 100ml/24h, thiểu niệu: 400ml/24h); tiểu máu.
 - Protein niệu (+)
 - Urê và creatinin-huyết bắt đầu tăng (urê huyết = 16mmol/l; creatinin clearance = 0,166ml/s)
- Giai đoạn suy thận duy trì (khoảng 10 ngày)
 - Nước tiểu: đỏ đục; protein (+); Na-niệu > 40 mEq/l
 - Creatinin-niệu/huyết < 20
 - Urê và creatinin-huyết tăng 10 → 20 và 0,5 → 1mg% mỗi ngày.
 - K⁺-huyết tăng 0,3 → 0,5mEq/ngày → 6-6,5mEq/l
 - Na⁺-huyết bình thường hay giảm do pha loãng bởi nước
 - Tăng phosphat-huyết : 6-8mg%.
 - Giảm calci-huyết : 6-9mg%.

- Tăng magiê-huyết: 2-3mg%.
- Tăng acid uric-huyết : 9-12mg%.
- Nhiễm toan chuyển hóa: ion H^+ ứ đọng 1mEq/Kg/ngày;
bicarbonat giảm 1-2mEq/l ngày

• Giai đoạn bình phục:

- Urê và creatinin-huyết bắt đầu giảm.
- Nước tiểu: tăng lượng.
- Chức năng thận cải thiện nhanh, chức năng cô đặc không trở lại bình thường.

Chẩn đoán phân biệt suy thận cấp trước thận (suy thận chức năng)

- Nước tiểu: cặn niệu bình thường, d: cao > 1,020, V= 500ml/ngày.
- Lượng Natri-niệu <20mEq/l.
- Urê niệu > 166mmol và urê niệu/urê - huyết > 10.
- Áp thẩm -niệu/Áp thẩm -huyết > 1,5.
- Creatinin niệu/huyết > 40.

$$\frac{\text{Natri niệu/ Natri huyết}}{\text{Creatinin niệu/Creatinin huyết}} \times 100 \text{ nhỏ hơn } 1$$

Chỉ định điều trị phục hồi chức năng thận

- Ứ dịch (thí dụ: phù phổi).
- Tình trạng lâm sàng xấu theo thời gian bệnh.
- Tăng Kali huyết nặng: > 7mmol/l
- Nhiễm toan nặng : $[H^+] > 70\text{nmol/l}$
 $pH < 7,15$
 $[HCO_3^-] < 12\text{mmol/l}$
- Urê huyết > 35mmol/l hoặc tăng > 16mmol mỗi 24h

4.2. Suy thận mạn

Bệnh xảy ra từ từ, chậm chạp, khi có hơn 50% nephron bị tổn thương mới xuất hiện triệu chứng đầu tiên của suy thận.

Suy thận mạn là hậu quả của nhiều chứng bệnh khác nhau (viêm cầu thận, viêm thận kẽ, hội chứng thận hư, sỏi thận...), bệnh tiến triển từng đợt, chức năng thận giảm dần, tình trạng nhiễm độc cơ thể ngày càng tăng, tiên lượng xấu vì thận không hồi phục được.

Đánh giá mức độ suy thận có thể dựa vào hệ số thanh thải của creatinin, bình thường hệ số này là 2ml/s. Khi độ lọc của cầu thận giảm thì hệ số này sẽ giảm theo.

- Hệ số thanh thải của creatinin $\geq 0,83\text{ml/s}$: triệu chứng nổi bật là thiếu máu và cao huyết áp.
- Hệ số này từ 0,33 đến 0,083ml/s: có nhiều thay đổi trong xét nghiệm hóa sinh. Lượng nước, muối, protid cung cấp cho bệnh nhân qua khẩu phần ăn hàng ngày cần được kiểm soát chặt chẽ.
- Hệ số này từ 0,083 đến 0,016ml/s: 95% nephron bị tổn thương, chỉ còn 5% nephron hoạt động, phương pháp lọc màng bụng, thận nhân tạo ... được chỉ định.

Một số thay đổi xét nghiệm hóa sinh trong suy thận mạn:

- Nước tiểu: phần lớn các nephron bị tổn thương nên một số ít nephron còn lại phải hoạt động bù trừ, gây nên tình trạng lợi niệu thẩm thấu, nước tiểu có tỉ trọng thấp 1,010, tình trạng này làm cho bệnh nhân tiểu đêm, tiểu nhiều lần,

khả năng cô đặc nước tiểu của thận không còn nữa. Trong nước tiểu có sự hiện diện của protein.

- Nghiệm pháp thăm dò chức năng thận rối loạn.
- Albumin, protein toàn phần trong máu giảm.
- Acid uric - huyết tăng (khoảng $500\mu\text{mol/L}$).
- Urê và creatinin - huyết tăng: thông thường ở giai đoạn báo động của suy thận urê máu tăng trên 10mmol , tăng theo mức độ thận suy urê máu có thể tăng trên 50mmol . Creatinin máu có thể tăng từ $2,5$ đến trên $10\text{mg}/100\text{ml}$.

Khi urê máu cao, urê có nhiều trong mồ hôi đọng lại thành phần trên da, urê trong nước bọt biến thành amoniac trong miệng làm cho bệnh nhân có mùi nước tiểu trong hơi thở.

- Phosphat, calci-huyết: nồng độ phosphat máu bắt đầu tăng khi độ lọc của cầu thận giảm khoảng 25% so với bình thường. Phosphat máu tăng làm giảm nồng độ calci ion hóa trong máu, do đó kích thích tuyến cận giáp làm tăng hormon tuyến cận giáp, hormon này tác dụng trên ống thận làm giảm hấp thu phosphat và trên hệ xương làm xương mất dần calci.
- Natri-huyết giảm: một số bệnh nhân suy thận bài tiết rất nhiều muối trong nước tiểu, người ta gọi trường hợp đó là viêm thận mất muối (gặp trong các bệnh tổn thương ống thận như viêm mô kê thận, thận đa nang...). Natri-huyết còn giảm do nôn ói, tiêu chảy, khẩu phần ăn hạn chế...
- Kali-huyết tăng: thường ở giai đoạn đầu của suy thận. Kali - huyết ít thay đổi, nếu có là do sai lầm trong điều trị (khẩu phần ăn, thuốc...) hoặc tán huyết có thể làm cho kali-huyết tăng đột ngột.

Kali-huyết tăng vào giai đoạn cuối, giai đoạn có nhiều rối loạn về nước, điện giải, rối loạn acid-base, tương ứng với hệ số thanh thải của creatinin vào khoảng $0,33\text{ml/s}$.

- Ion H^+ và nhiễm toan chuyển hóa: tình trạng nhiễm toan trong suy thận mạn do không giữ được cân bằng ion H^+ , các sản phẩm acid ứ lại trong cơ thể. Bình thường thận bài tiết mỗi ngày khoảng $40-60\text{mEq H}^+$ do sự chuyển hóa của các chất protein có nhóm sulfat, phosphat. Thận suy chỉ bài tiết $2/3$ khối lượng trên, trong một số trường hợp ion HCO_3^- cũng bị mất ra ngoài theo đường tiểu trên những bệnh nhân suy thận.

Khi nhiễm acid chuyển hóa, cơ thể bù trừ bằng cách tăng hô hấp để thải khí carbonic và thận thải ion H^+ trong nước tiểu dưới dạng phosphat acid (NaH_2PO_4) và amoniac (NH_4Cl) nhưng không đủ. Tình trạng toan hóa máu này được gọi là nhiễm acid chuyển hóa.

4.3. Viêm cầu thận cấp sau nhiễm liên cầu khuẩn ở trẻ em

Đây là hiện tượng viêm lan tỏa, cấp tính xảy ra ở cầu thận, thời điểm từ lúc nhiễm chuỗi cầu trùng cho đến lúc các triệu chứng của viêm cầu thận xuất hiện thay đổi từ 1 đến 4 tuần, trung bình là 2 tuần.

Trên lâm sàng triệu chứng nổi bật là: phù mắt, cao huyết áp, tiểu ít và tiểu máu, đau vùng hố thận...

Cận lâm sàng cho ta kết quả xét nghiệm sau:

- Nước tiểu: giúp chẩn đoán nhanh và chính xác nhất.
 - + Tiểu máu có thể đại thể hoặc vi thể.

2. CÁC XÉT NGHIỆM (XN) THƯỜNG DÙNG TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH GAN MẬT

2.1. Bilirubin-Huyết, sắc tố mật và urobilinogen trong nước tiểu

Xem bài sắc tố mật-muối mật.

2.2. XN về bộ enzym gan

Do gan là một cơ quan đóng vai trò quan trọng trong nhiều quá trình chuyển hóa của cơ thể nên có một hệ enzym rất phong phú. Có nhiều xét nghiệm enzym trong chẩn đoán và theo dõi bệnh lý gan mật.

Có hai loại enzym: enzym ngoại bào (hoạt động ở ngoài tế bào gan, thí dụ cholin esterase) và enzym nội bào (hoạt động trong tế bào gan, như hầu hết các enzym gan còn lại, thí dụ GOT, GPT, LDH, GIDH...)/

Do tính chất hoạt động nội bào của phần lớn các enzym gan, nên so với lượng enzym trong huyết thanh thì lượng enzym nội bào của gan rất lớn, bằng thí dụ sau đây so hoạt tính của GPT, GOT nội bào tại các mô với huyết thanh, nếu lấy mức ở huyết thanh là 1.

Mô	GPT	GOT
- gan	2750	7100
- tim	444	7800
- cơ xương	300	4950
- thận	1188	4550
- tụy	125	1400
- lách	75	700
- phổi	44	500
- hồng cầu	4	8
- Huyết thanh bình thường	1	1

Do đó thay đổi bệnh lý của enzym thường rất lớn, gấp nhiều lần hơn giới hạn trên, nhất là khi có hội chứng hủy tế bào gan, GPT-HT thường tăng trên 10 lần, có thể hơn 100 lần.

Enzym nội bào lại có thể được phân bố khác nhau ở những khu vực, bào quan khác nhau của tế bào, thí dụ ở bào dịch hay ở trong thể ty:

	Bào dịch	Thể ty	✓
LDH	+	+	
GPT	+	0	
GOT	+	+	(70%)
MDH	+	+	
GIDH	0	+	

Điều này giúp cho sự nhận định rối loạn bệnh lý, thí dụ:

- Việc xác định hoạt tính cholinesterase-HT giúp nhận định về khả năng tổng hợp của gan (cholinesterase giảm khi gan bị tổn thương do nhiễm độc các loại phospho hữu cơ, như thuốc rầy, thuốc trừ sâu...).
- Việc xác định các enzym GPT, GOT, GIDH, MDH... giúp nhận định về mức độ hủy hoại tế bào gan (GPT-HT tăng khi màng tế bào bị vỡ, còn nếu cả GOT và đặc biệt GIDH cũng tăng lên thì màng tế bào và cả màng thể ty đều bị vỡ, mức độ hủy hoại tế bào trầm trọng hơn).

- Khi có sự ứ mật thì tăng ALP, GGT, 5'NT,...

Trong thực tế lâm sàng các enzym đặc biệt có ý nghĩa trong tầm soát, đánh giá có tổn thương gan mật thường được dùng là:

- GPT, GOT: phát hiện có tổn thương hủy tế bào.
- ALP: có ứ mật.
- GGT: có ứ mật, đồng thời có rối loạn đáp ứng mọi tổn thương gan mật.

Khi khảo sát cả 6 enzym: GPT, GOT, cholinesterase, GGT, ALP, GIDH thì có thể đến 100% giúp xác định có bệnh lý gan mật.

2.3. XN về các protein, dẫn xuất nitơ

- Albumin-huyết: giúp đánh giá mức độ tổng hợp của tế bào gan.
- Điện di protein-HT, nhận định gián đồ điện di, các thành phần globulin...cho phép đánh giá chức năng tổng hợp, tình trạng viêm của gan... (viêm cấp: α_1, α_2 -globulin tăng; viêm mạn: γ -globulin tăng, đặc biệt trong xơ gan: albumin giảm, γ -globulin tăng, hình ảnh bloc β - γ ...).
- Xác định các protein đông máu (Fibrinogen: yếu tố I; Prothrombin: II; Proaccelerin: V; Proconvertin: VII; Stuart-Prower: X...) khảo sát qua Thời gian Quick (TQ, hay tỷ lệ prothrombin, hay PT: Prothrombin time): khảo sát con đường đông máu ngoại sinh, yếu tố II, V, VII, X.
 - + Trong suy gan, ứ mật: tỷ lệ prothrombin giảm (bình thường > 80%) hay PT kéo dài (bình thường # 11-14").
 - + Sự tổng hợp các yếu tố II, VII, IX, X phụ thuộc vào vitamin K, trong khi tổng hợp yếu tố V không phụ thuộc vitamin K: trong hội chứng tắc mật điển hình kéo dài, do giảm sự hấp thụ vitamin K, nên có thể gây PT kéo dài, và sẽ trở về bình thường khi cho vitamin K chích tĩnh mạch (thử nghiệm Koller dương tính); còn trong suy gan thì thử nghiệm Koller âm tính; và nếu định lượng yếu tố V thì chỉ giảm trong suy gan.
- Các dẫn xuất Nitơ:
 - + Urê-huyết: giảm trong suy gan nặng.
 - + Ammoniac (NH_3 -huyết) tăng trong suy gan nặng, có giá trị trong theo dõi tình trạng "bệnh não gan, encephalopathy" trong diễn tiến của suy gan nặng, xơ gan giai đoạn cuối. NH_3 -huyết tăng là một trong những nguyên nhân gây nhiễm độc não, các yếu tố góp phần đưa NH_3 -huyết tăng nhanh là xuất huyết tiêu hóa, chế độ ăn chất đạm quá cao, táo bón, nhiễm trùng, có mạch nối chủ-cửa...

2.4. XN các chỉ tố huyết thanh học của virus viêm gan

Các XN này nhằm xác định có sự nhiễm siêu vi (HAV = Hepatitis A virus; HBV = Hepatitis B virus, HCV = Hepatitis C virus; HDV = Hepatitis D virus; HEV = Hepatitis E virus). Ứng với các kháng nguyên HAV, HCV, HDV có các kháng thể (antibody = Ab): HAV-Ab (anti-HAV), HCV-Ab (anti-HCV), HDV-Ab (anti-HDV).

Ứng với các kháng nguyên (antigen = Ag) của VGSV B (HBV) thì có các kháng thể tương ứng:

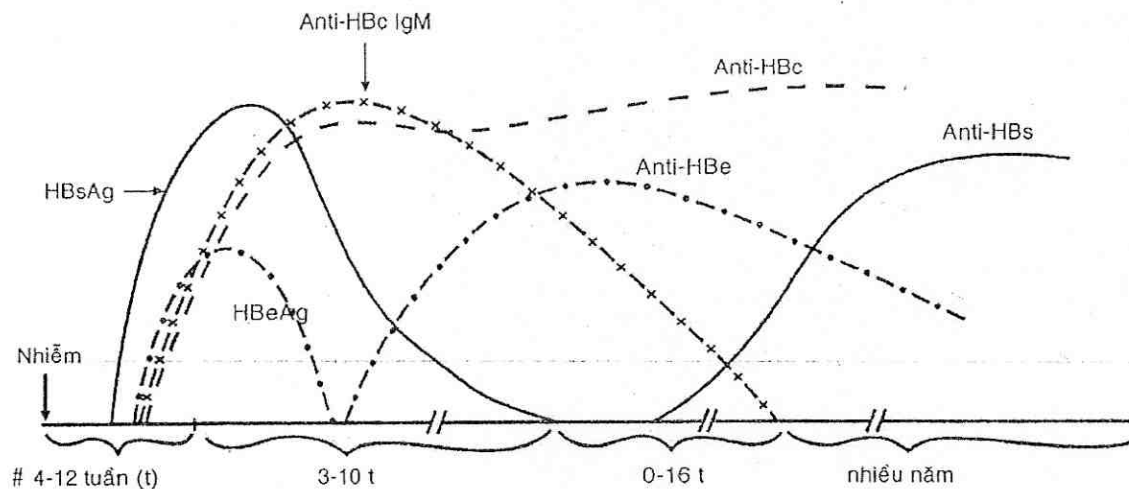
Kháng nguyên (KN)	Kháng thể
HBcAg (KN lõi c, core, của HBV)	HBc-Ab (anti-HBc)
HBeAg (KN hòa tan e của HBV)	HBe-Ab (anti-Hbe)
HBsAg (KN bề mặt s, surface, của HBV, hay KN australia)	HBs-Ab (anti-HBs)

Còn dùng các chữ IgA, IgG, IgM kèm theo các kháng thể để chỉ bản chất loại immunoglobulin của các kháng thể đó: anti-HBc IgG, anti-HBc IgM ...

Các kháng nguyên và kháng thể kể trên đều có thể được phát hiện bằng các kỹ thuật XN miễn dịch ELISA hoặc miễn dịch huỳnh quang, hóa phát quang... Chúng còn được gọi là các chỉ tố huyết thanh học (serological markers). Khi siêu vi xâm nhập vào cơ thể thì các chỉ tố kháng nguyên xuất hiện tăng dần rồi giảm dần trong huyết thanh, sau một thời gian thì các chỉ tố kháng thể xuất hiện tăng dần.

Kháng nguyên siêu vi vào cơ thể, xuất hiện ở huyết thanh tăng dần, giảm dần; rồi biến mất, khi đó trong huyết thanh xuất hiện kháng thể: đó là sự đảo huyết thanh (seroconversion).

Hình 12.2 sau đây là biểu đồ diễn tiến của các chỉ tố huyết thanh học trong VGSV cấp, thể thông thường diễn tiến tốt:



Hình 12.2: Biểu đồ biểu diễn của các chỉ tố huyết thanh trong VGSV cấp, thể thông thường diễn tiến tốt

- HBsAg (+) chứng tỏ có nhiễm virus, và là đối tượng gây lây nhiễm qua đường máu, tuy nhiên có thể là giai đoạn nhiễm bệnh lâm sàng -viêm gan cấp- có biểu hiện lâm sàng và có men gan tăng cao hoặc là thể người mang nguồn nhiễm kinh niên, người mang HBsAg (Chronic carrier).
- Anti-HBs (+) chứng tỏ đã có đáp ứng miễn dịch, trong giai đoạn hồi phục, khi HBsAg đã về âm tính.
- HBeAg (+) chứng tỏ virus đang ở giai đoạn phát triển, hoạt động và sinh sản, đây là giai đoạn lây nhiễm cao. Khi HBeAg âm tính, sẽ chuyển tạo kháng thể Anti-HBe dương tính. Sự chuyển đổi huyết thanh có nghĩa là tình trạng tăng sinh của HBV đã qua, nhiễm trùng có chiều hướng lui dần.
- Anti-HBc (+) (KT toàn phần kháng HBcAg, IgG và IgM) từ khi khởi phát bệnh và hiện diện kéo dài, đây là một dấu ấn rất tốt chứng tỏ đã có sự nhiễm, tiếp xúc với virus; đặc biệt khi Anti-HBc IgM (+) là một chỉ tố rất rõ xác định đang bị VGSV cấp.
- Ở người chưa nhiễm VGSV B đã có chích ngừa, sẽ có HBsAg (-); Anti-HBc (-); Anti-HBs (+).
- Ở người đã có nhiễm virus B trước nay và đã tạo được miễn dịch tự nhiên, sẽ có HBsAg (-); Anti-HBc (+); Anti-HBs (+).

HUYẾT ĐỒ

MỤC TIÊU

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

1. NGUYÊN TẮC

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

Các thông số cần thiết gồm:

- Số lượng hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu
- Hematocrit
- Lượng huyết sắc tố
- Tốc độ máu lắng
- Tỷ lệ phần trăm hồng cầu lưới
- Công thức bạch cầu, đặc điểm hình thái tế bào hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu, độ tập trung tiểu cầu.
- Các chỉ số hồng cầu: MCV, MCH, MCHC.

2. DỤNG CỤ - THUỐC THỬ

2.1. Dụng cụ

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

2.2. Thuốc thử

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

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

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

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

4.1. Khảo sát hồng cầu

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

4.2. Khảo sát bạch cầu

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

THỜI GIAN PROTHROMBIN (Thời gian Quick)

MỤC TIÊU

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

1. NGUYÊN TẮC

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

2. DỤNG CỤ VÀ THUỐC THỬ

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

2.1. Thuốc thử

- Neoplastin
- Nước cất

2.2. Mẫu thử

- 2ml máu chứng của người bình thường và 2ml máu bệnh nhân chống đông bằng natri citrat 3,8% theo tỷ lệ 1/10.
 - Ly tâm 2.000v/phút trong 10 phút. Tách huyết tương làm thí nghiệm.
- Xét nghiệm phải được thực hiện trong vòng 4 giờ sau khi lấy máu.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

3.1. Kỹ thuật cổ điển

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

3.2. Trên máy đông máu bán tự động

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

4. KẾT QUẢ

Tùy theo loại thuốc thử sử dụng.

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

Cách tính INR (International Normalized Ratio):

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PT}_{\text{bệnh}}}{\text{PT}_{\text{chứng}}} \right)^{\text{ISI}}$$

5. BIỆN LUẬN

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

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

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

6. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

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

TỰ LƯỢNG GIÁ

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

KỸ THUẬT ĐỊNH NHÓM MÁU ABO

MỤC TIÊU

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

1. ĐẠI CƯƠNG

Nhóm máu hệ ABO được xác định nhờ sự có mặt của kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu và kháng thể trong huyết thanh. Hai thành phần này khi gặp nhau sẽ gây phản ứng ngưng kết đặc hiệu.

2. DỤNG CỤ - THUỐC THỬ

2.1. Dụng cụ

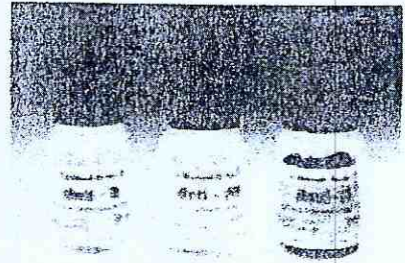
- Lam kính phân ô hoặc phiến đá 12 x 12cm
- Viết chì sáp, bút lông.
- Que thủy tinh.
- Ống nghiệm thủy tinh 10 x 75mm.
- Máy ly tâm.
- Pipette Pasteur
- Gòn không thấm.
- Bình cách thủy 37°C

2.2. Thuốc thử

2.2.1. Huyết thanh mẫu

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

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



2.2.2. Hồng cầu mẫu: gồm các loại sau:

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

2.2.3. Mẫu thử

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

3. PHƯƠNG PHÁP

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

3.1.1. Nguyên tắc

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

3.1.2. Tiến trình kỹ thuật

3.1.2.1. Kỹ thuật trên kính

- Trên tấm lam hoặc phiến đá ghi mã số hoặc tên bệnh nhân bằng bút chì sấp. Sau đó chia 3 ô bằng nhau và đánh dấu A, B, AB.
- Cho vào mỗi ô 2 giọt huyết thanh mẫu tương ứng, đầu ống hút thuốc thử cách lame kính từ 1,5 – 2,5 cm.
- Cho tiếp vào mỗi ô 1 giọt máu bệnh nhân.
- Dùng que thủy tinh trộn đều máu và huyết thanh mẫu ở mỗi ô. Mỗi que chỉ được trộn một loại thuốc thử để tránh lẫn thuốc thử từ ô này sang ô khác.
- Lắc nghiêng tròn tấm lam trong 1 đến 3 phút.
- Đọc kết quả sau 3 phút.

3.1.2.2. Kỹ thuật trong ống

- Cho vào một ống nghiệm khô sạch 2 giọt máu bệnh nhân, rửa hồng cầu 3 lần với nước muối 0,9%. Sau đó pha thành huyền dịch hồng cầu 5%.
- Lấy 3 ống nghiệm ghi mã số hoặc tên bệnh nhân và đánh dấu A, B, AB.
- Cho vào mỗi ống nghiệm 2 giọt huyết thanh kháng tương ứng.
- Dùng ống hút nhỏ vào mỗi ống 1 giọt huyền dịch hồng cầu bệnh nhân 5%.
- Lắc đều các ống nghiệm.

- Ly tâm khoảng 3800 vòng/phút trong 15 – 20 giây.
- Đọc kết quả bằng mắt thường hay kính hiển vi.

3.1.3. Đọc kết quả

3.1.3.1. Trên kính

- Ngưng kết: thấy những cụm hồng cầu đứng tách rời nhau rõ rệt trên nền dung dịch trong.
- Không ngưng kết: hỗn dịch vẫn đồng đều.

3.1.3.2. Trong ống

- Ngưng kết: khi lắc khối hồng cầu ngưng kết sẽ tách khỏi đáy ống nghiệm và có thể tách thành nhiều khối nhỏ, dung dịch có màu thuốc thử.
- Không ngưng kết: sau khi lắc hồng cầu trở lại dạng hỗn dịch đỏ và đục.

3.1.4. Nhận định kết quả

Anti.A	Anti.B	Anti.AB	Kết quả nhóm máu
+	-	+	A
-	+	+	B
+	+	+	AB
-	-	-	O

3.2. Phân loại máu hệ ABO gián tiếp (Kỹ thuật Simonin)

3.2.1. Nguyên tắc

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

3.2.2. Tiến trình kỹ thuật

3.2.2.1. Kỹ thuật trên kính

- Hút huyết thanh hay huyết tương bệnh nhân cho vào ống nghiệm sạch.
- Diệt bổ thể ở 63°C trong 3 phút để tránh phản ứng tiêu huyết xảy ra.
- Trên tấm lam kính hay phiến đá ghi mã số hoặc tên bệnh nhân.
- Dùng bút chì sập chia đều 3 ô và đánh dấu HCM A, HCM B, HCM O.
- Nhỏ vào mỗi ô 2 giọt huyết thanh hay huyết tương bệnh nhân.
- Nhỏ tiếp vào mỗi ô 1 giọt hồng cầu mẫu A, B, O 5% tương ứng.
- Dùng que trộn đều máu và huyết thanh.
- Lắc nghiêng tròn tấm lam kính hay phiến đá.
- Đọc kết quả ngưng kết sau 3 phút.

3.2.2.2. Kỹ thuật trong ống

- Lấy 3 ống nghiệm khô sạch, dùng bút chì sếp ghi mã số hoặc tên bệnh nhân và đánh dấu HCM A, HCM B, HCM O.
- Nhỏ vào mỗi ống 2 giọt huyết thanh hay huyết tương bệnh nhân đã diệt bổ thể.
- Nhỏ tiếp vào mỗi ống 1 giọt hồng cầu mẫu A, B, O 5% tương ứng.
- Lắc nhẹ và quay ly tâm khoảng 3800 vòng/phút trong 15 - 20 giây.
- Lắc mạnh 3 ống để đọc kết quả.

3.2.3. Đọc kết quả

- Ngưng kết: tùy vào lượng kháng thể mà ngưng kết mạnh hay yếu, có thể quan sát bằng mắt thường hoặc nhỏ một giọt dung dịch lên lam kính và quan sát ở vật kính X10.
- Không ngưng kết: sau khi lắc hồng cầu trở lại dạng hỗn dịch đỏ.

3.2.4. Nhận định kết quả

Phân loại trực tiếp			Phân loại gián tiếp			Kết quả nhóm máu
Anti.A	Anti.B	Anti.AB	HC.A	HC.B	HC.O	
+	-	+	-	+	-	A
-	+	+	+	-	-	B
+	+	+	-	-	-	AB
-	-	-	+	+	-	O

3.3. Phương pháp định nhóm máu ABO trong cột gelcard

Đây là kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, cho kết quả ngưng kết rõ ràng, thời gian ủ ngắn, kỹ thuật chuẩn, dễ dàng lưu giữ kết quả và sử dụng.

3.3.1. Nguyên tắc

Trong một cột gel có buồng phản ứng, có chứa huyết thanh chuẩn để định nhóm, có các viên bi thủy tinh làm màng ngăn đám ngưng kết. Nếu có phản ứng giữa kháng nguyên và kháng thể sẽ tạo thành các đám ngưng kết và hồng cầu tự do không còn lọt qua kẽ các viên bi để đi xuống đáy cột gel (dương tính), nếu không có phản ứng các hồng cầu sẽ lọt qua được và đi xuống đáy cột gel (phản ứng âm tính).

3.3.2. Dụng cụ và thuốc thử

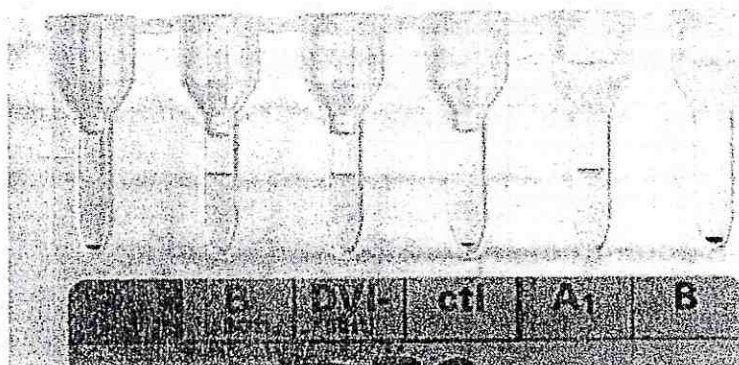
- Máy ly tâm chuyên dụng
- Máy ủ
- Máy đọc kết quả
- Giá đựng gelcard

- Pipettman
- Gelcard: có sẵn các kháng huyết thanh chuẩn (Anti A, B, AB)
- Dung dịch để pha hồng cầu

Chuẩn bị: pha hồng cầu bệnh nhân thành huyền dịch 0,8% trong dung dịch pha hồng cầu.

3.3.3. Tiến trình kỹ thuật

- Ghi họ tên bệnh nhân cần định nhóm máu vào gelcard
- Nhỏ 50 dịch treo hồng cầu vào các giếng có ghi kháng thể A, B, AB.
- Ly tâm 900 vòng /phút/10 phút.
- Sau khi ly tâm đưa gel vào máy đọc kết quả để đọc.
- Kết quả có thể đọc bằng mắt thường dễ dàng.
- Nhận định kết quả:
 - + Phản ứng dương: hồng cầu ngưng kết nằm trên cột gel.
 - + Phản ứng âm: hồng cầu lắng toàn bộ xuống đáy cột gel.



Hình 38.1. Định nhóm máu bằng phương pháp gelcard.

4. BIỆN LUẬN

4.1. Kết quả nhóm máu có giá trị khi kết quả phân loại trực tiếp và gián tiếp có kết quả phù hợp.

4.2. Những kết quả khó đọc nên đọc trên kính hiển vi

- Có nhiều đám hồng cầu lớn trên nền sáng rõ: ngưng kết.
- Có nhiều đám hồng cầu nhỏ và nhiều HC riêng lẻ: ngưng kết yếu.
- Tất cả các hồng cầu đều đứng riêng lẻ: không ngưng kết.

4.3. Huyết thanh kháng bảo quản tốt nhất ở 4°C. Không nên để thuốc thử đông đặc và tan nhiều lần. Trước khi sử dụng thuốc thử phải được đưa về nhiệt độ phòng thí nghiệm.

4.4. Trường hợp máu cuống rốn (trẻ sơ sinh)

Kháng thể tự nhiên kháng A và kháng B chưa phát triển đầy đủ để có thể phát hiện được. Do đó, việc xác định nhóm máu chủ yếu dựa vào kết quả phân loại trực tiếp.

4.5. Trường hợp ở những bệnh nhân bị suy giảm hoặc thiếu hụt miễn dịch

Các kháng thể tự nhiên cũng có thể rất yếu hoặc không phát hiện được. Do đó việc gọi tên nhóm máu phải dựa vào kết quả phân loại trực tiếp.

4.6. Trường hợp có kháng thể bất thường trong huyết thanh mẫu máu

Ví dụ người nhóm A_2 hoặc A_2B có thể có kháng thể bất thường kháng A_1 . Kháng A_1 này phản ứng với hồng cầu A_1 ở phần phân loại gián tiếp, nên trong trường hợp này phân trực tiếp cho nhóm A, phần gián tiếp cho nhóm O. Để xác định trường hợp này cần thêm huyết thanh mẫu kháng A_1 , kháng H. Kết quả phân loại như sau:

Phân loại trực tiếp			Phân loại gián tiếp			Kết quả nhóm máu
Anti.A	Anti.B	Anti.AB	HC. A_1	HC.B	HC.O	
+	-	+	+	+	-	A_2

4.7. Trường hợp mẫu máu có kháng thể lạnh tự sinh

Đặc điểm của kháng thể lạnh tự sinh là có thể làm ngưng kết hồng cầu của chính bản thân bất luận thuộc nhóm nào. Nhiệt độ hoạt động mạnh ($2^{\circ}\text{C} - 10^{\circ}\text{C}$) và hoạt động yếu hơn ở nhiệt độ phòng thí nghiệm nhưng không hoạt động ở 37°C . Nếu chỉ phân loại trực tiếp sẽ lầm lẫn với trường hợp nhóm máu AB. Để giải quyết khó khăn này ta đưa nhiệt độ phản ứng về 37°C . Tất cả các chất tham gia phản ứng đều phải ủ ở 37°C trong 60 phút sau đó lấy ra và đọc kết quả.

5. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

5.1. Sai lầm do huyết thanh

Do huyết thanh mẫu có chuẩn độ kháng thể yếu, mất hoạt tính hay nhiễm trùng.

5.2. Sai lầm do hồng cầu

- Hồng cầu bị biến chất.
- Do máu bị nhiễm trùng hoặc bạch cầu quá nhiều.

5.3. Sai lầm về thủ tục giấy tờ

- Do nhầm tên, viết nhầm.

4

CÁC PHƯƠNG PHÁP NHUỘM

NHUỘM GRAM

Phương pháp HUCKER biến chế

Mục tiêu:

1. Nêu được nguyên tắc của kỹ thuật nhuộm Gram.
2. Thao tác thành thạo kỹ thuật thực hiện phiên phết từ các loại mẫu thử khác nhau
3. Nêu các nguyên nhân gây nhầm lẫn tính cách bắt màu Gram.
4. Thực hiện 1 tiêu bản nhuộm Gram đúng và đẹp.

Nhuộm Gram là một trong những phương pháp nhuộm quan trọng nhất để phân loại vi khuẩn cho phép phân biệt đại cương thành 2 nhóm vi khuẩn tùy theo phản ứng nhuộm: nhóm Gram dương và nhóm Gram âm.

1. NGUYÊN TẮC

Khi nhuộm vi khuẩn với thuốc màu Crystal Violet và một chất gắn màu Iodine nếu ta tẩy màu bằng cồn 95%, có một số vi khuẩn vẫn giữ chặt màu tím của Crystal Violet, đó là nhóm Gram (+). Một số khác bị tẩy mất màu tím vì màng tế bào thiếu chất chuyên biệt dùng kết hợp với Crystal Violet (Peptidoglycan), đó là nhóm Gram (-).

Khi nhuộm lại với dung dịch Safranin 0,5%, nhóm Gram (+) vẫn giữ màu tím còn nhóm Gram (-) sẽ bắt màu đỏ.

2. DỤNG CỤ VÀ THUỐC NHUỘM

2.1. Dụng cụ

- Khuôn cấy khuẩn
- Đèn cồn
- Kính đựng vật (lame) sạch
- Bút chì mờ
- Chai nhỏ giọt đựng nước muối 0.85%.
- Đồng hồ phút.

VI SINH THỰC HÀNH

2.2. Thuốc nhuộm

- Dung dịch Crystal Violet
- Dung dịch Iodine
- Cồn 95%
- Dung dịch Safranin 0,5% hay dung dịch Carbol Fuchsin pha loãng 1/10.

3. KỸ THUẬT

3.1. Mẫu thử làm phiến phết

§ Từ bệnh phẩm

- Nếu bệnh phẩm là mủ hay các chất ngoại tiết tương đương: làm 1 phết mỏng với khayên cấy đã khử trùng, trải đều trên tấm kính trong 1 diện tích 1,5x2,5cm.
- Nếu bệnh phẩm được lấy bằng que quần gòn: dùng que gòn làm phiến phết thẳng, hoặc làm huyền trục với 1 giọt nước muối vô trùng nếu bệnh phẩm đã khô.
- Nếu bệnh phẩm là đàm hay phân: chọn phần có mủ hay máu.
- Nếu bệnh phẩm lỏng như nước tiểu, nước tiểu sống: làm phiến phết từ cặn lắng ly tâm với ống hút có đường kính nhỏ.

§ Từ lứa cấy

- Nếu là lứa cấy lỏng: tùy theo độ đục của lứa cấy, ta lấy 1 giọt hay lấy đầy 2, 3 khayên cấy khuẩn để làm phiến phết.
- * *Lưu ý*: Phải khử khuẩn khayên cấy mỗi lần lấy mẫu thử.
- Nếu là lứa cấy trên môi trường đặc: dùng khayên cấy khuẩn chấm trên 1 khóm vi khuẩn riêng rẽ, làm huyền trục trong 1 giọt nước muối trên kính, xong trải mỏng thành phiến phết. Nên phân tán đều, không dày, để có thể quan sát được từng tế bào vi khuẩn.

3.2. Kỹ thuật làm phiến phết

- Cầm que cấy thật thẳng đứng, đầu khayên đặt trên ngọn lửa đèn cồn và đốt đỏ đầu que cấy.
- Để nguội, dùng khayên lấy bệnh phẩm.
- Đặt khayên bệnh phẩm vào giữa tấm kính, cho áp sát vào mặt kính, phết đều trên kính theo đường xoắn ốc thành làn mỏng hình bầu dục với diện tích 1,5 x 2,5cm.
- Đốt đỏ đầu que cấy khử khuẩn.

3.3. Lưu định phiến phết

Phiến phết được để khô tự nhiên trong không khí, hoặc hơi nhẹ trên ngọn đèn. Sau đó, lưu định phiến phết bằng cách đưa nhanh tấm kính qua lại trên ngọn lửa độ 4-5 lần, để mặt có phiến phết ở phía trên. Không được hơi nóng quá vì sẽ làm các tế bào co lại.

3. 4. Kỹ thuật nhuộm

- Phủ dung dịch Crystal Violet lên phiến phết, để 1 phút. Rửa nước và nghiêng kính cho ráo.
- Phủ dung dịch Iodine lên phiến phết, để 1 phút. Có thể phủ Iodine thành 2 lần mỗi lần 30". Giữa 2 lần không rửa nước. Xong rửa nước và nghiêng kính cho ráo.
- Phủ cồn 95% lên phiến phết, để 30 giây. Rửa nước và nghiêng kính cho ráo.
- Nhuộm lại với dung dịch Safranin trong 30 giây. Rửa nước, để khô và khảo sát với vật kính dầu.

4. KẾT QUẢ

Theo phương pháp nhuộm Gram, vi khuẩn được phân biệt thành 2 nhóm :

- *Vi khuẩn Gram (+)* : giữ màu tím của Crystal Violet.
- *Vi khuẩn Gram (-)* : giữ màu đỏ của Safranin.

5. BIỆN LUẬN

5.1. Gram (+) có thể nhầm thành Gram (-)

- Do sự tự hủy, tăng tính acid của môi trường, nhiệt độ cấy không thích hợp, sự hiện diện của một số độc chất. Do đó, muốn được chính xác phải nhuộm Gram với lứa cấy từ 18 - 24 giờ.
- Khi dung dịch Iodine đã hỏng. Vì thế phải giữ dung dịch Iodine trong chai nâu, tránh ánh sáng và loại bỏ khi dung dịch từ màu nâu sậm đổi sang màu vàng nhạt hay không màu.
- Tẩy màu quá lâu.

5.2. Gram (-) có thể nhầm là Gram (+)

- Nếu phiến phết được lưu định khi chưa khô.
- Phiến phết quá dày, vi khuẩn phân tán không đều, tập trung quá nhiều ở chỗ và có thể giữ màu tím khi tẩy màu.
- Thời gian tẩy màu quá ít.

5.3. Giai đoạn tẩy màu rất quan trọng. Tẩy màu đúng, các loại tế bào kể cả nhân, giữ màu đỏ Safranin.

5.4. Hầu hết các loại vi khuẩn hoặc thuộc Gram (+) hoặc thuộc Gram (-) vài loại xuất hiện dưới cả 2 dạng Gram (+) và Gram (-) được gọi là "Gram thay đổi"

NHUỘM KHÁNG ACID

Phương pháp Ziehl Neelsen

Mục tiêu:

1. *Nêu được nguyên tắc của kỹ thuật nhuộm kháng acid phương pháp Ziehl Neelsen.*
2. *Thao tác thành thạo tiến trình thực hiện phiên phết và nhuộm một tiêu bản theo phương pháp Ziehl Neelsen có màu sắc đúng, đẹp.*

1. NGUYÊN TẮC

Các loại vi khuẩn thuộc dòng Mycobacterium có khá nhiều mỡ, acid béo và sáp trong tế bào. Những chất này không thấm nước, làm cho tế bào vi khuẩn không ăn màu trong các phương pháp nhuộm thông thường. Nhưng nếu dùng thuốc nhuộm kiềm, cùng với sự hơi nóng, màu sẽ ngấm dễ dàng vào tế bào vi khuẩn.

Khi đã được nhuộm, vi khuẩn lại khó bị tẩy màu bằng dung dịch acid cồn. Cùng nhuộm theo phương pháp này, các loại vi khuẩn khác sẽ bị tẩy màu 1 cách dễ dàng.

Nền phiên phết được nhuộm thêm phẩm xanh methylene tạo sự tương phản để dễ khảo sát.

2. DỤNG CỤ VÀ THUỐC NHUỘM

2.1. Dụng cụ

- Khuynh cấy trùng.
- Đèn cồn
- Kính đựng vật mới và sạch
- Bút chì mỡ
- Que gòn có cán bằng kim loại để đốt
- Cồn để đốt
- Đồng hồ phút.

2.2. Thuốc nhuộm

- Dung dịch Carbol fuchsin
- Dung dịch Acid- cồn 3%
- Dung dịch M.B.A.

KỸ THUẬT LÀM PHẢN ỨNG CHÉO

TT	NỘI DUNG	HS	0	1	2
1	Máu người cho và người nhận sau khi đông thì tách lấy huyết thanh, nếu không có huyết thanh thì phải quay ly tâm để có 2 lớp huyết thanh và hồng cầu	1			
2	Đánh số 2 ống nghiệm 1 và 2 có đề tên người nhận máu và địa chỉ khoa phòng	1			
3	ống 1: cho 2 giọt huyết thanh người nhận +1 giọt hồng cầu người cho (nếu hồng cầu đặc quá phải pha loãng với nước muối 9‰ thành hồng cầu 5%).	2			
4	ống 2: cho 2 giọt huyết thanh người cho +1 giọt hồng cầu người nhận (nếu hồng cầu đặc quá phải pha loãng như trên)	2			
5	Sau đó lắc nhẹ 2 ống nghiệm trên	1			
6	Đem quay ly tâm 2.000 vòng/phút	1			
7	Lấy ra ống nghiệm lắc nhẹ.	1			
8	Cho thêm nước muối 9‰ vào để pha loãng	1			
9	Đọc kết quả	1			

Ngành Xét nghiệm - Nội dung 4

KỸ THUẬT CHẠY CÔNG THỨC MÁU TRÊN MÁY HUYẾT HỌC

TT	NỘI DUNG	HS	0	1	2
1	Rút 2ml máu cho vào type EDTA lắc đều	1			
2	Bật công tắc máy chờ khởi động	1			
3	Khi thấy màn hình hiện Ready	1			
4	Lắc đều type máu lần nữa	2			
5	Đưa tuýp máu vào kim hút của máy	1			
6	Ấn nút phía trong của máy	2			
7	Chờ kim rút lên lấy tuýp máu ra	1			
8	Chờ máy phân tích và hiện lên kết quả	1			
9	Bấm Print để in kết quả	2			
10	Đọc kết quả	4			

Ngành Xét nghiệm - Nội dung 5

KỸ THUẬT SỬ DỤNG VẬT KÍNH 100X

TT	NỘI DUNG	HS	0	1	2
1	Xoay vật kính 100x vào giữa mâm kính	1			
2	Đưa tiêu bản lên mâm kính	1			
3	Kẹp giữ tiêu bản	1			
4	Điều chỉnh xe đẩy để tiêu bản vào giữa mâm kính	1			
5	Dùng ốc đại cấp nâng mâm kính gắn sát với vật kính	2			
6	Mắt nhìn vào thị kính, dùng ốc đại cấp hạ dần mâm kính xuống, một tay điều chỉnh xe đẩy	2			
7	Khi thấy ảnh của vật xuất hiện, điều chỉnh ốc vi cấp cho ảnh rõ nét hơn	1			
8	Xoay điểm mù vào giữa mâm kính	1			
9	Nhỏ 1 giọt dầu vào tiêu bản (vị trí cần quan sát)	1			
10	Xoay vật kính dầu vào giữa mâm kính	1			
11	Mắt nhìn vào vật kính điều chỉnh ốc đại cấp cho vật kính sát với giọt dầu	3			
12	Mắt nhìn vào thị kính điều chỉnh ốc vi cấp để nhìn ảnh rõ nét hơn	2			

Ngành Xét nghiệm - Nội dung 6

KỸ THUẬT LÀM PHẾT NHUỘM GRAM VI KHUẨN, ĐỌC TIÊU BẢN SAU NHUỘM

TT	NỘI DUNG	HS	0	1	2
1.	Khử khuẩn que cấy trước khi lấy mẫu	2			
2.	Hơ và cầm ống nghiệm hoặc đĩa petri đúng	4			
3.	Lấy mẫu phết vào lam đường kính 1x2cm	1			
4.	Khử khuẩn que cấy	2			
5.	Cố định phết bằng hơ nhẹ qua ngọn đèn cồn hoặc để khô tự nhiên	1			
6.	Phủ Crystal violet trong 1 phút	1			
7.	Rửa nước	1			
8.	Phủ logol trong 1 phút	1			
9.	Rửa nước	1			
10.	Rửa cồn đến khi hết màu	2			
11.	Rửa nước	1			
12.	Phủ safranin trong 1 phút	1			
13.	Để khô	1			
14.	Chỉnh kính vật kính 100x với lam có giọt dầu để thấy được hình ảnh vi khuẩn	4			
15.	Nhận định: hình dạng vi khuẩn trên phết nhuộm	2			
16.	Nhận định: màu gram của vi khuẩn	2			
17.	Vấn đáp	5			

**KIỂM ĐỊNH NHÓM MÁU ABO BẰNG PHƯƠNG PHÁP BETH – VINCENT
(PP DÙNG HUYẾT THANH MẪU)**

Stt	Nội dung	HS	0	1	2
1	Dùng huyết thanh mẫu chống A (anti A), Chống B (anti B)	1			
2	Máu có chống đông bằng EDTA để định nhóm	1			
3	Nhỏ giọt máu thứ nhất lên 1 đầu của tấm lam (hay gạch men), nhỏ 1 giọt anti A chồng lên giọt máu thứ nhất dùng que nhựa quay đều	2			
4	Nhỏ giọt máu thứ hai lên đầu lam còn lại, nhỏ 1 giọt anti B chồng lên giọt máu thứ hai dùng que nhựa quay đều	2			
5	Đọc kết quả	4			

Ngành Xét nghiệm - Nội dung 10

KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH THỜI GIAN MÁU CHẢY-KỸ THUẬT LEE WHITE TRONG ỐNG NGHIỆM

TT	NỘI DUNG	HS	0	1	2
1	Lấy máu không chống đông trong 2 ống nghiệm với thể tích chính xác bằng nhau (mỗi ống 2ml)	2			
2	Bấm đồng hồ và cả 2 ống được để vào bình chưng cách thủy 37°C (bấm đồng hồ ngay khi cho máu vào ống nghiệm)	2			
3	Đo lường thời gian đông máu (dùng 1 ống để thăm dò, đọc thời gian trên ống còn lại),	1			
4	Cứ mỗi phút nhất ống thứ nhất lên và nghiêng 45° để xem cho đến khi đông hoàn toàn (lật ngược ống nghiệm máu không chảy ra)	2			
5	Xem đến ống nghiệm thứ 2 cũng như trên và ghi thời gian máu đông.	2			
6	Đọc kết quả	4			