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: Kỹ thuật viên xét nghiệm cao đẳng, trung cấp

Tây Ninh, tháng 6 năm 2017

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: Kỹ thuật viên xét nghiệm trung cấp, cao đẳng

Tây Ninh, tháng 6 năm 2017

NỘI DUNG ÔN TẬP LÝ THUYẾT VÀ THỰC HÀNH

1. Kính hiển vi quang học
2. Định lượng Cholesterol trong huyết thanh
3. Kỹ thuật nhuộm tiêu bản
4. Huyết đồ
5. Kỹ thuật định nhóm máu ABO
6. Phản ứng hòa hợp
7. Kỹ thuật xác định thời gian máu đông – Kỹ thuật Milian trên kính
8. Kỹ thuật xác định thời gian máu chảy
9. Kỹ thuật làm phản ứng chéo
10. Kỹ thuật chạy công thức máu trên máy huyết học
11. Kỹ thuật sử dụng vật kính 100x
12. Kỹ thuật làm phết nhuộm gram vi khuẩn, đọc tiêu bản sau nhuộm
13. Bảng kiểm đo thể tích hồng cầu

KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC

MỤC TIÊU

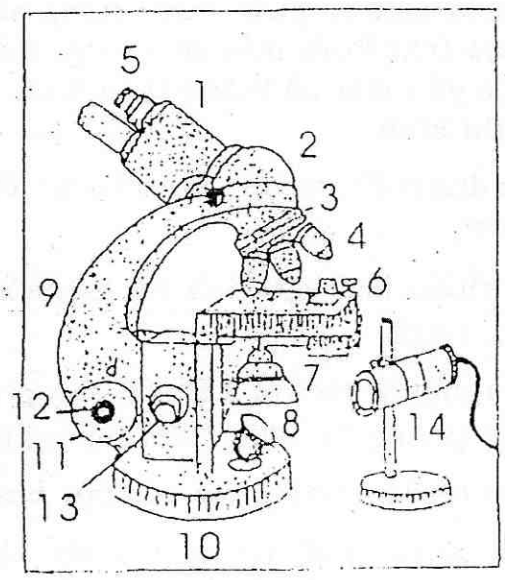
1. Mô tả đúng các bộ phận của kính hiển vi và nêu tác dụng của nó.
2. Trình bày đúng quy trình sử dụng kính hiển vi.
3. Trình bày đúng cách bảo quản kính hiển vi.
4. Thao tác đúng, theo qui trình kỹ thuật.

NỘI DUNG

Kính hiển vi quang học là một dụng cụ quang học không thể thiếu trong phòng xét nghiệm. Nó có tác dụng phóng đại ảnh của vật lên nhiều lần giúp cho việc chẩn đoán bệnh chính xác.

I. CẤU TẠO

1- Ống trục chính (ống mang thị kính)
2- Đầu kính
3- Bàn xoay
4- Vật kính
5- Thị kính
6- Màn kính
7- Tụ quang
8- Gương
9- Tay cầm (thân kính)
10- Đế kính
11- Ốc đại cấp
12- Ốc vi cấp
13- Ốc điều chỉnh tụ quang
14- Đèn soi kính hiển vi



1. Ống trục chính (Main tube)

Có hình trụ tròn, một đầu mang thị kính, một đầu nối với đầu kính. Có nhiều loại: 1 ống trục chính (mang 1 thị kính) gọi là kính 1 mắt; 2 ống trục chính (mang 2 thị kính) gọi là kính 2 mắt; 4 ống trục chính (mang 4 thị kính) gọi là kính 4 mắt (Kính thường dùng cho cả thầy và trò cùng quan sát: kính thầy)...

2. Đầu kính (Body case)

Đầu kính có hình tròn hoặc đa giác. Trong đầu kính chứa các thấu kính lăng trụ tam giác.

Tác dụng: lăng kính này có tác dụng hắt ảnh của vật từ vật kính lên thị kính không bị đảo ngược.

3. Bàn xoay (Revolingnosepiese)

Hình tròn có ba lỗ mang vật kính và một lỗ gọi là điểm mù không mang vật kính.

Tác dụng: bàn xoay có thể xoay tròn 360^0 giúp cho điều chỉnh vật kính vào giữa mâm kính dễ dàng.

4. Vật kính (Onjective)

Đây là một bộ phận quan trọng nhất của kính cần phải bảo vệ tốt để tránh mốc (vật kính mốc sẽ không nhìn thấy ảnh của vật). Đầu dưới vật kính được gắn một hệ thống thấu kính, đầu trên tiếp xúc với hệ thống lăng kính và thị kính.

Tác dụng: Phóng đại ảnh của vật lên nhiều lần giúp ta quan sát rõ hình thể của vật.

Có nhiều loại vật kính với hệ phóng đại khác nhau: 4X, 6X, 8X, 10X, 40X, 90X, 100X.

Có nghĩa là các vật kính đó phóng đại được: 4 lần, 6 lần.... 100 lần (vật kính có độ phóng đại 90X, 100X còn gọi là vật kính dầu).

**** Sự khác nhau giữa các vật kính:***

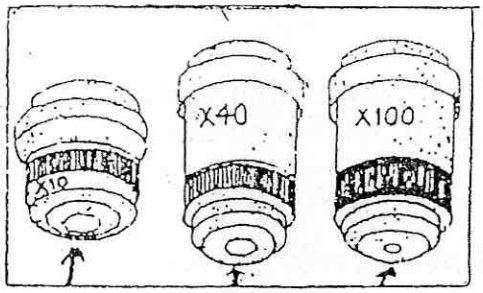
- Vật kính có độ phóng đại nhỏ thì kích thước ngắn, vật kính có độ phóng đại lớn thì kích thước dài.
- Khoảng cách giữa vật kính với mâm kính khác nhau:
  + Vật kính 10X: khoảng cách xa (khoảng 15,98mm)
  + Vật kính 40X: khoảng cách gần (khoảng 4,1mm)
  + Vật kính 100X: khoảng cách rất gần (khoảng 1,81mm)

Chính vì vậy mà khi dùng vật kính 40X, 100X không bao giờ được dùng ốc đại cấp để tránh vỡ tiêu bản, hỏng vật kính.

- Cửa sổ ánh sáng (khả năng phân ly của các loại vật kính)
  + Vật kính 10X: cửa sổ ánh sáng lớn, khả năng phân ly nhỏ (0,3) có khả năng nhìn rõ hai vật ở xa nhau.

- Vật kính 40X: cửa sổ ánh sáng nhỏ, khả năng phân ly tương đối lớn (0,65) có khả năng nhìn được hai vật tương đối gần.

+ Vật kính 100X (90X): cửa sổ ánh sáng rất nhỏ, khả năng phân ly lớn (1,3) có khả năng nhìn được hai vật rất gần nhau. Ở vật kính này khả năng phân ly lớn, ánh sáng không tập trung, khi sử dụng phải dùng ánh sáng tối đa và dầu soi để tăng độ chiết quang (nhỏ một giọt dầu cede) ta nhìn thấy vật rõ nét hơn.



5. Thị kính (Cocular)

Có hình trụ tròn được gắn ở đầu ống trục chính ở trong được cấu tạo bởi một hệ thống thấu kính.

Tác dụng: phóng đại vật, trên thị kính cũng ghi hệ số phóng đại (6X, 8X, 10X nghĩa là ảnh được phóng đại (6 lần, 8 lần, 10 lần...).

Ví dụ: nếu soi một mẫu vật có độ phóng đại của thị kính 8X và vật kính có độ phóng đại 10X thì mẫu vật được phóng đại 80 lần, nếu vật kính là 100X thì mẫu vật được phóng đại 800 lần (8 x 100).

6. Mâm kính (Stage)

Có hình tròn hay hình vuông tuỳ nơi sản xuất.

Tác dụng: nâng đỡ mẫu vật (tiêu bản). Trên mâm kính có một lỗ tròn hoặc vuông, bầu dục để cho ánh sáng đi thẳng từ gương qua tụ quang lên vật kính.

Trên mâm kính còn có một hệ thống kẹp giữ tiêu bản. Một bộ phận di chuyển tiêu bản gọi là xe đẩy (Chariot) có tác dụng đưa tiêu bản lên trên, xuống dưới, sang phải, sang trái, có bộ phận thước đo gọi là duxich.

7. Tụ quang (Sub stage)

Là một hệ thống thấu kính.

Tác dụng: tập trung, hội tụ ánh sáng lên vật định soi. Nếu để tụ quang thấp thì ánh sáng được tập trung ít, nếu đưa tụ quang lên cao thì ánh sáng được tập trung nhiều (khi soi vật kính 10X nên hạ thấp tụ quang; khi soi vật

kính 40X, 100X phải nâng tụ quang lên cao để tập trung ánh sáng. Tụ quang còn được gắn hai bộ phận là: chắn sáng và lọc sang.

- Chắn sáng: là những lá nhựa xếp theo hình đồng tâm. Muốn ánh sáng mạnh thì mở rộng chắn sáng, muốn ánh sáng nhỏ thì thu hẹp ánh sáng.
- Lọc sáng: đặt ở dưới tụ quang, hình tròn, màu xanh có tác dụng làm dịu ánh sáng khi soi kính, khi không cần thiết có thể tháo ra.

8. Gương

Hình tròn, có một mặt phẳng, một mặt lõm.

Tác dụng: phản xạ ánh sáng (hắt ánh sáng) lên vật định soi.

- Gương phẳng để lấy ánh sáng gần.
- Gương lõm lấy ánh sáng xa hơn.

9. Thân kính (tay cầm) (Arm)

Hình cong hoặc gấp khúc.

Tác dụng: nâng đỡ ống trục chính và mâm kính.

Trên thân kính mang các ốc đại cấp, vi cấp. Có tác dụng điều chỉnh khoảng cách giữa vật kính và tiêu bản.

Chú ý:

- Khi sử dụng vật kính 10X thì điều chỉnh ốc đại cấp (nâng mâm kính gần sát vật kính rồi vặn ốc đại cấp để hạ dần mâm kính xuống, khi thấy ảnh của vật thì điều chỉnh ốc vi cấp cho ảnh rõ nét hơn).
- Khi dùng vật kính 40X, vật kính dầu chỉ điều chỉnh ốc vi cấp. Nếu sử dụng nhầm sang ốc đại cấp dễ bị vỡ tiêu bản, hỏng vật kính.

10. Đế kính- chân kính (Base foot)

Hình chữ nhật hay hình móng ngựa, chắc chắn, giữ cho kính cố định.

II. QUY TRÌNH SỬ DỤNG KÍNH

1. Tháo, lắp kính

1.1. Tháo kính: thứ tự các bước như sau:

(1) Tháo thị kính →(2) Tháo đầu kính→(3) Tháo vật kính→(4) Tháo xe đẩy→ (5) Tháo tụ quang →(6) Tháo gương.

Trình tự ngược với quy trình trên (lưu ý bộ phận không cố định phải lắp sau cùng tránh rơi vỡ).

(1) Lắp gương → (2) Lắp tụ quang → (3) Lắp vật kính → (4) Lắp xe đẩy → (5) Lắp đầu kính → (6) Lắp thị kính sau cùng.

2. Vị trí để kính

Kính phải để trên một bàn chắc chắn, bằng phẳng. Nếu dùng ánh sáng điện thì để ở một vị trí cố định trong phòng làm việc, nếu dùng ánh sáng tự nhiên để kính ở nơi gần cửa sổ.

3. Cách lấy ánh sáng khi soi kính

(1) Xoay gương về phía ánh sáng → (2) Xoay một vật kính 10X vào giữa mâm kính → (3) Mắt nhìn vào thị kính → (4) Điều chỉnh khoảng cách giữa hai thị kính (nếu là kính 2 mắt)→ (5) Điều chỉnh tụ quang, chắn sáng (tuỳ theo cường độ ánh sáng, chắn sáng mở rộng hoặc hẹp, đưa tụ quang lên cao hoặc xuống thấp) khi thấy ánh sáng tròn thuần nhất là được.

4. Soi vật kính thường (10X, 40X)

(1) Đưa tiêu bản lên mâm kính (nếu soi ở vật kính 40X phải đậy lamen trước).

(2) Kẹp giữ tiêu bản.

(3) Điều chỉnh xe đẩy để đưa tiêu bản vào giữa mâm kính.

(4) Dùng ốc đại cấp nâng mâm kính gần sát với vật kính.

(5) Mắt nhìn vào thị kính, dùng ốc đại cấp hạ dần mâm kính xuống, một tay điều chỉnh xe đẩy.

(6) Khi thấy ảnh của vật xuất hiện, điều chỉnh ốc vi cấp cho ảnh rõ nét hơn.

(7) Xoay vật kính 40X về giữa mâm kính để quan sát ảnh rõ nét hơn, đồng thời phải nâng tụ quang lên và điều chỉnh ốc vi cấp.

Chú ý: Nếu muốn quan sát vật ở vật kính 40X phải đậy lamen để khi soi không bị ảnh hưởng đến vật kính.

5. Soi vật kính dầu (100X, 90X)

(1) Sau khi đã thấy ảnh như phần (3), (4), (6).

(2) Xoay điểm mù vào giữa mâm kính.

(3) Nhỏ một giọt dầu vào tiêu bản (vị trí cần quan sát).

(4) Xoay vật kính dầu vào giữa mâm kính.

(5) Mắt nhìn vào vật kính điều chỉnh ốc đại cấp cho vật kính sát giọt dầu.

(6) Mắt nhìn vào thị kính, tay điều chỉnh ốc vi cấp để nhìn ảnh rõ nét hơn.

(7) Điều chỉnh xe đẩy theo đường rãnh cầy (chữ chi) để soi hết tiêu bản

6. Sau khi soi xong

(1) Hạ mâm kính.

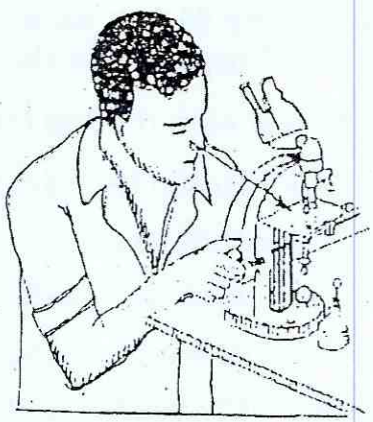
(2) Bỏ tiêu bản ra khỏi mâm kính.

(3) Xoay điểm mù về giữa mâm kính.

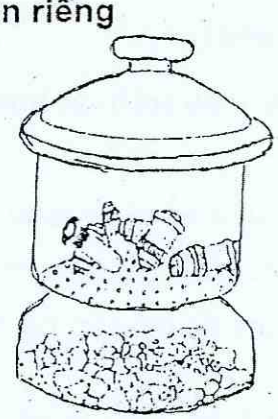
(4) Hạ thấp tụ quang.

(5) Để gương thẳng đứng .

(6) Điều chỉnh các ốc về số không.



7. Lau kính, vật kính bằng khăn riêng



Nếu soi vật kính dầu:

+ Lau bằng giấy thấm.
+ Lau bằng xylen.
+ Lau khô.

8. Chụp kính bằng vải mềm

III. BẢO QUẢN KÍNH

1. Chăm sóc hàng ngày

Thường xuyên lau chùi kính, lau kính bằng khăn mềm, mỏng.

Lau các bộ phận cơ học riêng, bộ phận quang học riêng.

Vật kính dầu sau khi sử dụng xong phải lau sạch dầu bằng giấy thấm hoặc khăn mềm, bông thấm xylen. Sau đó phải lau lại bằng khăn khô.

2. Chống mốc kính

Ở nước ta khí hậu nóng ẩm, nấm mốc dễ phát triển, nhất là thị kính, lăng kính và vật kính. Khi đã có hiện tượng mốc kính, khắc phục rất khó và kính có thể trở nên vô dụng. Để chống mốc hàng ngày phải để kính ở nơi khô ráo để bảo vệ cho các thấu kính, lăng kính.

– Để tạo ra môi trường không khí khô:

+ Lý tưởng nhất là cho kính vào phòng điều hoà nhiệt độ chạy thường xuyên.

+ Để kính vào một tủ kính có ngọn đèn 25W hoặc 40W, thắp sáng liên tục. Một tủ có từ 1- 4 kính hiển vi dùng một bóng là đủ. Đèn thắp liên tục cả khi không có kính để môi trường không khí trong tủ luôn khô.

+ Nếu phòng xét nghiệm không có điện:

. Để kính ở phòng làm việc bình thường. Tháo vật kính và thị kính cho vào bình hút ẩm, chứa chất chống ẩm là Silicagen hoặc để vào tủ kín có để $CaCl_2$ mới thay hàng ngày cũng có tác dụng hút ẩm.

. Khi sử dụng Silicagen cần kiểm tra xem còn tác dụng hút ẩm hay không:

Chất hút ẩm có màu xanh lơ là còn tác dụng hút ẩm.

Chất hút ẩm chuyển màu hồng không còn tác dụng hút ẩm.

Đem sấy nóng cho bốc hơi nước các hạt Silicagen lại chuyển màu xanh lúc đó lại sử dụng được.

– Để sử dụng và bảo quản tốt kính hiển vi ta cần chú ý những điểm sau:

Không bao giờ:

+ Lau các vật kính và thấu kính bằng cồn.

+ Lau mâm kính, thấu kính bằng xylen vì nó sẽ làm bong lớp mạ.

+ Để kính hiển vi ở ngoài môi trường không chụp mũ vải tránh bụi.

+ Chụp kính hiển vi bằng túi nilon.

+ Dùng tay lau vật kính.

+ Xếp kính hiển vi cùng với dầu soi.

LƯỢNG GIÁ:

Trả lời các câu sau:

1. Kể tên và nêu tác dụng các bộ phận của kính hiển vi (chỉ trên kính).
2. Nêu sự khác nhau giữah vật kính 10X, 40X, 100X.
3. Liệt kê những bộ phận của kính hiển vi có tác dụng phóng đại ảnh của vật.
4. Trình bày thứ tự các bước tháo kính, lắp kính.
5. Nêu các bước thao tác khi lấy ánh sáng để soi kính.
6. Nêu các bước thao tác khi soi vật kính 10X, vật kính 40X.
7. Nêu các bước thao tác khi soi vật kính dầu.

8. Nêu các việc làm sau khi soi xong kính

9. Trình bày cách bảo quản kính hiển vi.

Phân biệt đúng - sai các câu sau:

10. Ống trục chính có hình vuông.

11. Đầu kính có hình đa giác hoặc hình tròn.

12. Không dùng tay lau vật kính.

13. Gương phẳng để lấy ánh sáng xa.

14. Không xếp kính với dầu soi.

BÀI 2:

ĐỊNH LƯỢNG GLUCOSE TRONG HUYẾT THANH

Mục tiêu

Nắm được tầm quan trọng của việc xét nghiệm Glucose

Biết nguyên tắc và cách thực hiện xét nghiệm Glucose theo phương pháp O. TOLUIDIN

Biết nguyên tắc và cách thực hiện xét nghiệm Glucose theo phương pháp ENZYMATIC

Nội dung

- Glucose có nguồn gốc từ thức ăn hoặc được tân tạo từ các acid amin và các sản phẩm thoái hóa của Lipid do gan đảm nhiệm tổng hợp.
- Mục đích của việc xét nghiệm Glucose giúp ta chẩn đoán và theo dõi bệnh tiểu đường.

PHƯƠNG PHÁP O. TOLUIDIN

1- NGUYÊN TẮC

Trong môi trường acid đun nóng với sự hiện diện của Thiourea, Glucose trong huyết thanh sẽ kết hợp với O. Toluidin cho ra một phức chất màu xanh lục tỷ lệ thuận với nồng độ Glucose trong huyết thanh Màu này được đo trong quang phổ kế.

2- MẪU THỬ

2.1. Lấy máu vào buổi sáng lúc bệnh nhân chưa ăn.

2.2. Có thể lấy với chất chống NaF hoặc K.Oxalate.

2.3. Tránh đừng để mẫu thử bị tiêu huyết và nên làm sớm.

3- THUỐC THỬ

3.1. Acid Trichloracetic 30%

3.2. Ortho Toluidin

- Ortho Toluidin.....60 ml.
- Thiourea.....1,5 g.
- Acid Acetic glacial.....940 ml.

  Đựng trong chai nâu – Bền 6 tháng.

3.3. Glucose chuẩn dự trữ 1 g%

- Glucose .....1 g
- Acid Benzoic 1%.....100 ml.

  Bền 3 đến 6 tháng ở 4°C.

5- NGUYÊN NHÂN GÂY SAI SỐ

5.1. Mẫu thử bị tiêu huyết hoặc để quá lâu.

5.2. Không tôn trọng thời gian và nhiệt độ khi làm xét nghiệm.

5.3. Dụng cụ dơ.

5.4. Thuốc thử mất hiệu lực.

5.5. Mực nước trong nồi đun thấp hơn mực dung dịch trong ống.

Phương pháp ENZYMATIC

1- NGUYÊN TẮC

Glucose trong huyết thanh bị oxy hóa bởi phân hóa tố Glucose Oxydase cho ra Gluconic Acid và H_2O_2. H_2O_2 sẽ kết hợp với Phenol và 4-aminoantipyrine có sự hiện diện của Peroxidase sẽ cho ra một màu đỏ tím.

Phản ứng được tóm tắt như sau:

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Glucose oxidase}} \text{Gluconic acid} + H_2O_2 \quad ①$$

$$H_2O_2 + \text{Phenol} + \text{4-aminoantipyrin} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Red quinone} + 4H_2O \quad ②$$

2- MẪU THỬ

2.1. Huyết thanh không tiêu huyết – Mới lấy.

2.2. Có thể dùng huyết tương (lấy với kháng đông Heparin Fluoride).

2.3. Dịch não tủy.

3- THUỐC THỬ

Dạng KIT có sẵn. Bao gồm

3.1. Reagent 1 (R1)

- Phosphate Buffer pH 7,4
- Phenol

3.2. Reagent 2 (R2)

- Glucose Oxitase
- Peroxidase
- 4-aminoantipyrin

3.3. Glucose standard

Loại 100mg% - 1g/L – 5,56 mmol/L

3.4. Glucose trực dụng 100 mg%

- Glucose dự trữ 1% .....10 ml.
- Acid Benzoic 1%.....100 ml.

Giữ ở 4°C.

4- TIẾN HÀNH

4.1. Khử bã và pha loãng dung dịch chuẩn

	U	S	B
Huyết thanh	0,1 ml		
Glucose chuẩn 100mg%		0,1 ml	
Nước cất	0,8 ml	0,8 ml	0,9 ml
T.C.A 30%	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

Trộn đều – Quay ly tâm 3.000 vòng/1' trong 5 phút. Ta có 1 P.F.F.

4.2. Phản ứng màu

	U	S	B
Dung dịch sau khi quay (P.F.F.)	0,3 ml		
Dung dịch chuẩn vừa pha loãng		0,3 ml	
Dung dịch ống B vừa pha			0,3 ml
Ortho Toluidin	2,7 ml	2,7 ml	2,7 ml

Trộn đều – Đậy nắp và đem đun sôi ở BM 100°C trong 8 phút – Lấy ra làm nguội – Đo ở máy quang phổ kế với độ dài sóng 630 nm.

Có thể đo %T, Abs hoặc C.

Nếu đo %T và Abs thì áp dụng công thức tính kết quả:

$$\frac{ODU}{ODS} \times 100 = mg\%$$

3. Trị số giảm

Trong một số bệnh lý sau đây

- Xơ gan. Thiểu năng gan
- Cường tuyến tụy (ung thư tế bào β tụy tạng)
- Giảm kích thích tố làm tăng đường huyết.
- Khả năng ngưỡng thận của Glucose máu là từ 1,7 → 1,8g/L

Nếu lượng Glucose máu > 400mg%, phải pha loãng huyết thanh và làm lại.

Câu hỏi lượng giá

- Phương pháp O. TOLUIDIN dùng để định lượng Glucose dựa trên nguyên tắc gì?
- Phương pháp ENZYMATIC dùng để định lượng Glucose dựa trên nguyên tắc gì?
- Trị số Glucose trong máu tăng trong trường hợp nào?
- Trị số Glucose trong máu giảm trong trường hợp nào

4- TIẾN HÀNH

	U	S
Working Reagent (R1 pha trong R2)	1.000 µl	1.000 µl
Huyết thanh	10 µl	
Glucose standard		10 µl

Trộn đều – Đọc kết quả ở máy quang phổ kế sau 30 phút (nếu để ở t° 20°C – 25°C) và sau 10 phút (nếu để ở 37°C) – Dùng ống B = ED để chỉnh máy. Màu bền trong vòng 60 phút (λ = 500nm hoặc 490nm)

Có thể đo %T – Abs – C. Nếu đo %T hay Abs:

Ta dùng công thức tính kết quả:

$$\frac{A(U)}{A(S)} \times n = mg\% \text{ (hoặc g/L hoặc mmol/L}$$

* GHI CHÚ

- Nếu tính ra mg% thì n sẽ là 100
- Nếu tính ra g/L thì n sẽ là 1
- Nếu tính ra mmol/L thì n sẽ là 5,56

5- BIỆN LUẬN KẾT QUẢ

1. Trị số bình thường

Phương pháp O.Toluidin : 70 – 110 mg%

Phương pháp Enzymatic : 75 – 115 mg%

hay (4,2 – 6,4 mmol/L)

2- Trị số gia tăng

Trong một số bệnh lý sau đây:

- Tiểu đường tụy
- Rối loạn nội tiết trong các trường hợp:
  - Cường tuyến giáp
  - U tủy thượng thận
  - Cường tiền não thùy.

BÀI 5:

ĐỊNH LƯỢNG CHOLESTEROL TRONG HUYẾT THANH

Mục tiêu

Nắm được tầm quan trọng của việc xét nghiệm Cholesterol

Biết nguyên tắc, cách thực hiện và nguyên nhân gây sai số Cholesterol theo phương phá RAPPOPORT EICHHORN

Biết nguyên tắc, cách thực hiện và nguyên nhân gây sai số trong xét nghiệm Cholesterol th phương pháp ENZYMATIC END POINT

Nội dung

+ Cholesterol có nguồn gốc từ thức ăn và được tổng hợp ở gan.
+ Lưu thông trong máu dưới hai dạng: tự do và ester hoá
+ Quá trình chuyển hóa Cholesterol dẫn đến sự tạo thành một số chất quan trọng n các acid mật, muối mật, vitamin D và các kích thích tố nhóm Steroid.
+ Mục đích xét nghiệm Cholesterol giúp ta theo dõi và chẩn đoán một số bệnh về tim mạch, gan và thận.

Phương pháp RAPPOPORT EICHHORN

(dựa trên phản ứng Liebermann Burchard)

1. NGUYÊN TẮC

Dùng acid Sulfosalicylic để phá hủy Protein và các cầu nối Lipoprotein trong huyết thanh, phóng thích ra Cholesterol sẽ kết hợp với H_2SO_4 đđ để cho ra hợp chất Cholestadier Sulfonic Acid có màu xanh lục.

2. THUỐC THỬ

2.1 H_2SO_4 đđ

2.2 Anhydric Acetic nguyên chất

2.3 Acid Sulfosalicylic 12% (pha trong CH_3COOH đđ).

2.4 Cholesterol standard 200 mg% (pha trong CH_3COOH đđ).

3. KỸ THUẬT TIẾN HÀNH

	U	S	B
Huyết thanh	0,1 ml		
Cholesterol chuẩn 200 mg%		0,1 ml	
Nước cất			0,1 ml
Acid Sulfosalicylic 12%	0,6 ml	0,6 ml	0,6 ml
Anhydric	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Trộn đều nhẹ nhàng và để cho dung dịch nguội ở t° PTN khoảng 10 phút:			
H_2SO_4 đđ	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

- Lắc thật mạnh cho đến khi dung dịch trong. Để yên 10 phút cho màu phát triển.
- Đọc A(U) và A(S) ở độ dài sóng 600nm - Ống B chỉnh máy.

Tính kết quả : $\frac{A(U)}{A(S)} \times 200 = mg\%$

4. NGUYÊN NHÂN GÂY SAI SỐ

4.1 Huyết thanh tiêu huyết, cũ hoặc lấy ra sau khi ăn.

4.2 Thuốc thử Anhydric Acetic ngậm nước.

4.3 Không lắc kỹ khi cho H_2SO_4 đđ vào.

4.4 Dụng cụ dơ và bị ướt.

Phương pháp ENZYMATIC END POINT

1. NGUYÊN TẮC

$$\text{Cholesterol ester} + H_2O \xrightarrow{\text{Cho. esterase}} \text{Cholesterol} + \text{Acid béo} \quad ①$$

$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{Cho. oxidase}} \text{Cholestene-3-one} + H_2O_2 \quad ②$$

$$2H_2O_2 + \text{Phenol} + \text{4-aminoantipyrin} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{quinoneimin} + 4H_2O \quad ③$$

2.THUỐC THỬ

Dạng KIT pha sẵn bao gồm

2.1 Reagent (bền 6 tuần ở 2°C - 8°C, 2 tuần ở 15°C - 25°C

4- Aminoatipyrin

Phenol

Peroxidase

Cholesterol esterase

Cholesterol oxidase

2.2 Standard 200 mg%

3. KỸ THUẬT

	U	S
Huyết thanh	10 µl	
Standard Cholesterol 200 mg%		10 µl
Reagent	1.000 µl	1.000 µl

Trộn đều - Để 5 phút ở 37°C (hay 10 phút ở 25°C)

Đọc A(U) và A(S) ở độ dài sóng 500 nm với ống B = ED chỉnh máy

Tính kết quả : $\frac{A(U)}{A(S)} \times 200 = mg\%$

★ CHÚ Ý

Nếu kết quả Cholesterol > 700 mg% (hoặc >19,3 mmol/L) – phải pha loãng huyết thanh với NaCl 0,85% và làm lại – Kết quả nhân với độ pha loãng.

4- BIỆN LUẬN KẾT QUẢ

1. Trị số bình thường

Phương pháp Rapporport Eichhorn 150 – 250 mg%

Phương pháp Enzymatic end point 140 – 250 mg% (3,6 → 6,9 mmol/L)

2. Trị số tăng

Thường gặp trong các trường hợp :

- Vàng da tắc mật (có thể > 400 mg%).
- Thận hư nhiễm mỡ (có thể > 500 mg%).
- Rối loạn hormon bẩm sinh (có thể > 600 mg%).

- Xơ mỡ động mạch.
- Viêm gan do ngộ độc (chưa có tổn thương tế bào gan).
- Việm thận có Urea huyết cao.
- Tiểu đường – Suy tụy mãn.

3. Trị số giảm

Thường gặp trong các trường hợp :

- Tổn thương gan trầm trọng do ngộ độc hoá chất (<1g/L).
- Xơ gan (có thể <100 mg%)
- Suy dinh dưỡng - nhịn đói
- Viêm đại tràng.
- Thiếu máu, viêm phổi, thương hàn, bạch hầu.
- Dùng thuốc có Corticoid

4. Thay đổi sinh lý

- Tăng theo tuổi, theo chế độ ăn nhiều mỡ động vật.
- Ở những người béo phì. Hội chứng STRESS.
- Giảm khi có thai và sau khi sinh.
- Giảm ở người ăn chay.

Câu hỏi lượng giá

ới

- ❖ Phương pháp RAPPOPORT EICHHORN dùng để định lượng Cholesterol dựa trên nguyên tắc gì?
- ❖ Nguyên tắc và cách thực hiện xét nghiệm Cholesterol theo phương pháp ENZYMATIC END POINT
- ❖ Trị số Cholesterol trong máu tăng hay giảm có liên quan đến bệnh lý gì?
- ❖ Nguồn gốc, chỉ số bình thường và ý nghĩa của Cholesterol trong chẩn đoán lâm sàng?

Bài 7

KỸ THUẬT NHUỘM TIÊU BẢN

MỤC TIÊU

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

1. NHUỘM WRIGHT

1.1. Nguyên tắc

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

1.2. Dụng cụ và thuốc thử

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

1.3. Tiến trình kỹ thuật

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

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

1.4. Nguyên nhân sai lầm

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

2. NHUỘM GIEMSA

2.1. Nguyên tắc (theo phương pháp Romanoski)

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

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

2.2. Dụng cụ và thuốc thử

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

2.3. Tiến trình kỹ thuật

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

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

TỰ LƯỢNG GIÁ

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

BẢNG KIỂM

Kỹ thuật nhuộm Wright

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

Bài 18

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 nhược sắc hay bình sắc.
- Kích thước có đồng đều hay không.
- Hình dạng hồng cầu có bình thường không, có hồng cầu hình bia, hồng cầu hình liềm, hồng cầu hình giọt nước, có sự hiện diện của hồng cầu non hay không?
- Tỷ lệ phần trăm hồng cầu lưới bình thường, tăng hay giảm?

4.2. Khảo sát bạch cầu

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

4.3. Khảo sát tiểu cầu

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

TỰ LƯỢNG GIÁ

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

BẢNG KIỂM

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

Bài 38

KỸ THUẬT ĐỊNH NHÓM MÁU ABO

MỤC TIÊU

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

1. ĐẠI CƯƠNG

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

2. DỤNG CỤ - THUỐC THỬ

2.1. Dụng cụ

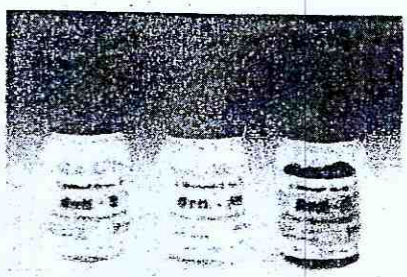
- Lam kính phân ô hoặc phiến đá 12 x 12cm
- Viết chì sáp, bút lông.
- Que thủy tinh.
- Ống nghiệm thủy tinh 10 x 75mm.
- Máy ly tâm.
- Pipette Pasteur
- Gòn không thấm.
- Bình cách thủy 37°C

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

3.1.2.2. Kỹ thuật trong ống

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

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

3.1.3. Đọc kết quả

3.1.3.1. Trên kính

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

3.1.3.2. Trong ống

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

3.1.4. Nhận định kết quả

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

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

3.2.1. Nguyên tắc

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

3.2.2. Tiến trình kỹ thuật

3.2.2.1. Kỹ thuật trên kính

- Hút huyết thanh hay huyết tương bệnh nhân cho vào ống nghiệm sạch.
- Diệt bổ thể ở 63^{0}C trong 3 phút để tránh phản ứng tiêu huyết xảy ra.
- Trên tấm lam kính hay phiến đá ghi mã số hoặc tên bệnh nhân.
- Dùng bút chì sáp chia đều 3 ô và đánh dấu HCM A, HCM B, HCM O.
- Nhỏ vào mỗi ô 2 giọt huyết thanh hay huyết tương bệnh nhân.
- Nhỏ tiếp vào mỗi ô 1 giọt hồng cầu mẫu A,B,O 5% tương ứng.
- Dùng que trộn đều máu và huyết thanh.
- Lắc nghiêng tròn tấm lam kính hay phiến đá.
- Đọc kết quả ngưng kết sau 3 phút.

3.2.2.2. Kỹ thuật trong ống

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

3.2.3. Đọc kết quả

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

3.2.4. Nhận định kết quả

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

3.3. Phương pháp định nhóm máu ABO trong cột gelcard

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

3.3.1. Nguyên tắc

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

3.3.2. Dụng cụ và thuốc thử

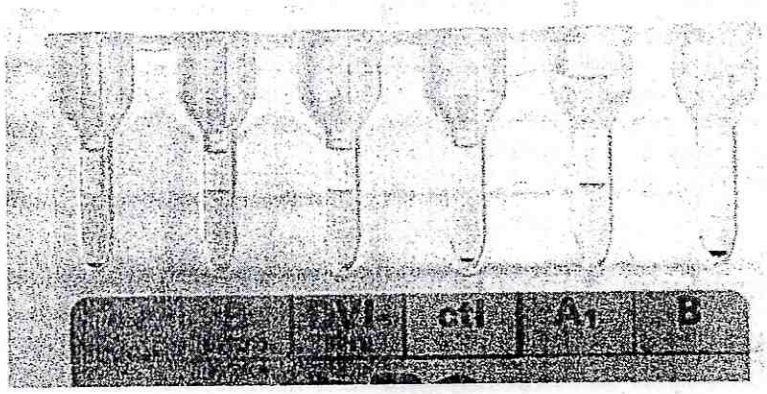
- Máy ly tâm chuyên dụng
- Máy ủ
- Máy đọc kết quả
- Giá đựng gelcard

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

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

3.3.3. Tiến trình kỹ thuật

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



Hình 38.1. Định nhóm máu bằng phương pháp gelcard.

4. BIỆN LUẬN

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

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

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

4.3. Huyết thanh kháng bảo quản tốt nhất ở 4^0C. Không nên để thuốc thử đông đặc và tan nhiều lần. Trước khi sử dụng thuốc thử phải được đưa về nhiệt độ phòng thí nghiệm.

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

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

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

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

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

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

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

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

Đặc điểm của kháng thể lạnh tự sinh là có thể làm ngưng kết hồng cầu của chính bản thân bất luận thuộc nhóm nào. Nhiệt độ hoạt động mạnh (2^0C – 10^0C) và hoạt động yếu hơn ở nhiệt độ phòng thí nghiệm nhưng không hoạt động ở 37^0C. Nếu chỉ phân loại trực tiếp sẽ lầm lẫn với trường hợp nhóm máu AB. Để giải quyết khó khăn này ta đưa nhiệt độ phản ứng về 37^0C. Tất cả các chất tham gia phản ứng đều phải ủ ở 37^0C trong 60 phút sau đó lấy ra và đọc kết quả.

5. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

5.1. Sai lầm do huyết thanh

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

5.2. Sai lầm do hồng cầu

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

5.3. Sai lầm về thủ tục giấy tờ

- Do nhầm tên, viết nhầm.

Bài 41

PHẢN ỨNG HÒA HỢP
(Phát máu an toàn)

MỤC TIÊU

1. *Thực hiện thành thạo phản ứng phù hợp.*
2. *Chuẩn bị đầy đủ dụng cụ thuốc thử.*
3. *Trình bày được nguyên tắc của chứng phản ứng hoà hợp và giải thích được ý nghĩa của từng giai đoạn trong chứng phản ứng hòa hợp.*

1. NGUYÊN TẮC

Mục đích của phản ứng hòa hợp là để kiểm tra sự hòa hợp nhóm máu giữa người cho và người nhận máu, để bảo đảm an toàn truyền máu có nghĩa là kháng thể trong huyết thanh bệnh nhân không làm ngưng kết kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu của người cho và ngược lại kháng thể trong huyết thanh của người cho cũng không làm ngưng kết kháng nguyên trên bề mặt hồng cầu của bệnh nhân, phát hiện kháng thể bất thường ngoài hệ ABO.

2. DỤNG CỤ - THUỐC THỬ

2.1. Dụng cụ

- Bình cách thủy 37°C
- Máy ly tâm
- Ống nghiệm 10 x 75mm
- Pipette Pasteur
- Bút chì sáp

2.2. Thuốc thử

- Huyết thanh Coombs, NaCl 0,9%.
- Huyết thanh mẫu chống A, chống B, chống AB.
- Hồng cầu mẫu A, hồng cầu mẫu B.

2.3. **Mẫu thử:** máu đông còn mới không bị tiêu huyết hay nhiễm trùng.

3. TIẾN TRÌNH KỸ THUẬT

3.1. Định nhóm máu của bệnh nhân và người cho bằng hai phương pháp huyết thanh mẫu và hồng cầu mẫu.

3.2. Điều chế huyền dịch hồng cầu 5% của bệnh nhân và người cho.

3.3. Chuẩn bị 2 ống M, m như sau:

	Ống chính (Major)	Ống phụ (Minor)
Huyết thanh bệnh nhân	2 giọt	
Huyền dịch hồng cầu bệnh nhân 5%		2 giọt
Huyết thanh người cho		2 giọt
Huyền dịch hồng cầu người cho 5%	2 giọt	

3.3.1. Giai đoạn 1

Đặt 02 ống M, m ở nhiệt độ phòng thí nghiệm từ 15 đến 30 phút. Quay ly tâm 1000 vòng /phút trong 1 phút rồi đọc kết quả ngưng kết.

- Nếu M có ngưng kết: trả lời ngay chứng nghiệm không phù hợp. Máu không truyền được.
- Nếu M không ngưng kết thì làm tiếp sang giai đoạn 2.

3.3.2. Giai đoạn 2

Đặt 2 ống M, m vào bình cách thủy 37°C từ 30 đến 50 phút, lấy ra, đem quay ly tâm 1000 vòng /1 phút và đọc kết quả ngưng kết: Nếu M không ngưng kết thì tiến hành sang giai đoạn 3.

3.3.3. Giai đoạn 3

- Rửa hai lần 2 ống M, m bằng NaCl 0,85%.
- Gạt bỏ phần nước trong ở trên chỉ để lại cặn hồng cầu.
- Cho vào mỗi ống 2 giọt huyết thanh Coombs.
- Lắc đều, quay ly tâm 1000 vòng /1 phút trong 1 phút và đọc kết quả.

4. KẾT QUẢ

- Nếu cả ống M, m không có hiện tượng ngưng kết thì máu người cho và người nhận phù hợp.
- Trường hợp cả ống M và m đều ngưng kết hay ống M ngưng kết khi truyền khối hồng cầu, ống m ngưng kết khi truyền huyết tương đều không truyền được.

5. BIỆN LUẬN

- Trường hợp truyền máu toàn phần phải làm đầy đủ cả ống chính (ống M) và ống phụ (ống m).
- Truyền khối hồng cầu chỉ cần làm ống chính (ống M).
- Truyền huyết tương hay khối tiểu cầu chỉ cần làm chéo ống phụ (ống m).
- Giai đoạn 1: sử dụng nhiệt độ phòng thí nghiệm và môi trường nước muối để phát hiện kháng thể tự nhiên. Những kháng thể này thuộc hệ thống ABO, Lewis...
- Giai đoạn 2: sử dụng môi trường albumin, nhiệt độ 37^{0}C nhằm phát hiện các kháng thể miễn dịch, bản chất của chúng thường là những IgG hoạt động tốt ở nhiệt độ nóng và môi trường albumin. Những kháng thể này thuộc hệ thống Rhesus, Kidd, Kell, Duffy...
- Giai đoạn 3: sử dụng huyết thanh Coombs, huyết thanh Coombs sẽ làm cầu nối giữa các hồng cầu đã bị cảm ứng và giúp phát hiện các kháng thể miễn dịch thuộc hệ thống Rhesus, Kidd, Kell, Duffy...

6. NGUYÊN NHÂN SAI LẦM

- Mẫu máu lấy không đúng quy cách.
- Lam kính, ống nghiệm bẩn gây ngưng kết giả.
- Ly tâm không đúng tốc độ và thời gian.
- Nhiệt độ của bình cách thủy không đúng.
- Mẫu máu bị tiêu huyết hay nhiễm trùng.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày mục đích của phản ứng hòa hợp.
2. Trình bày ý nghĩa của 3 giai đoạn trong phản ứng hòa hợp
3. Trình bày quy trình kỹ thuật của phản ứng hòa hợp.

Ngành Xét nghiệm - Nội dung 1

KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH THỜI GIAN MÁU ĐÔNG - KỸ THUẬT MILIAN TRÊN KÍNH

TT	NỘI DUNG	HS	0	1	2
1	Sát khuẩn đầu ngón tay áp út bằng ête hoặc cồn	1			
2	Dùng kim chích cho máu chảy ra 2 lam mỗi lam 1 giọt có đường kính khoảng 1cm	1			
3	Bấm đồng hồ ngay khi máu chảy ra, đặt ngay lam vào hộp petri	1			
4	Sau 3 phút bắt đầu nghiêng nhẹ lam thứ nhất 1 góc 45° xem giọt máu đã đông chưa và từ đó cứ 30" nghiêng 1 lần cho đến khi đông hẳn	3			
5	Tiếp tục xem lam kính thứ 2 cũng với kỹ thuật trên cho đến khi đông hẳn	3			
6	Bấm đồng hồ dừng lại				
7	Đọc kết quả	4			

Ngành Xét nghiệm - Nội dung 2

KỸ THUẬT XÁC ĐỊNH THỜI GIAN MÁU CHẢY

TT	NỘI DUNG	HS	0	1	2
1	Sát trùng dái tai băng cồn 90°	1			
2	Dùng lancet đâm 1 nhát vào giữa dái tai thật nhanh, gọn	2			
3	Bấm đồng hồ theo dõi	1			
4	Dùng giấy thấm cứ 30 giây thấm giọt máu 1 lần, nên áp nhẹ giấy thấm ở dưới dái tai	2			
5	Đọc kết quả	4			

Ngành Xét nghiệm - Nội dung 3

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	
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 gần 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			

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			

Ngành Xét nghiệm - Nội dung 7

BẢNG KIỂM ĐO THỂ TÍCH HỒNG CẦU (HEMATOCRIT)

Stt	Nội dung	HS	0	1	2
1	Cho máu chống đông vào khoảng 2/3 ống mao quản	1			
2	Bịt đầu ống mao quản bằng chất plastic hay đất sét	2			
3	Đem ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/1phút trong 5 phút	1			
4	Lấy ra so với bảng đọc kết quả	1			
5	Thực hiện thao tác trên máy	4			
6	Đọc kết quả	4			