

Chương III

DI TRUYỀN - MIỄN DỊCH

HUYẾT HỌC

XÉT NGHIỆM CÔNG THỨC NHIỄM SẮC THỂ TỦY XƯƠNG

I. NGUYÊN LÝ

Bình thường ở tủy xương, các tế bào sinh máu vẫn liên tục tăng sinh và trưởng thành do vậy quá trình phân chia tế bào xảy ra một cách tự nhiên. Dựa vào tính chất này có thể làm tiêu bản tế bào nhiễm sắc thể tủy xương trực tiếp hoặc sau nuôi cấy trong môi trường nhân tạo bằng cách ức chế phân bào ở giai đoạn kỳ giữa và phá vỡ tế bào, sau đó làm tiêu bản và phân tích các bất thường nhiễm sắc thể.

II. CHỈ ĐỊNH

Người bệnh mang bệnh lý huyết học cần khảo sát các rối loạn về nhiễm sắc thể.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Phương tiện - hoá chất

- Máy ly tâm, hệ thống kính và phần mềm phân tích kết quả.
- Ống falcon 50ml vô trùng.
- Chai nuôi cấy vô trùng.
- Lam kính.
- Ống falcon 15ml.
- Ống tan huyết.
- Pipet pasteur.
- Typ Effpendoff.
- Heparin 5.000UI/ml.
- Môi trường nuôi cấy: 90ml RPMI 1640 + L-Glutamin + 10ml huyết thanh bào thai bê + 100µl kháng sinh + 50µl dung dịch NaOH.
- Dung dịch colcemid 0,010/00 (10µl/ml).
- Dung dịch nhuộm trương: KCl 0,075M (PH=7,4). (8ml/1 mẫu).
- Dung dịch đếm bạch cầu.
- Dung dịch cố định:

- + Dung dịch Cornoy: 3 Metanol: 1 acid acetic
- + Dung dịch Cornoy: 2 Metanol: 1 acid acetic
- Dung dịch cố định pha 10ml/ 1 mẫu
- Dung dịch NaHCO_3 7,5% (dùng để chỉnh pH)
- Kháng sinh: Streptomycin + Penicilin (100 μl / 100ml môi trường).

2. Bệnh phẩm

Dịch tủy được chống đông bằng heparin 5.000 UI/ml.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Lấy 2ml dịch tủy vào bơm tiêm đã tráng heparin 5.000 UI/ml.
- Cho tủy vào ống nghiệm vô trùng có chứa 3ml môi trường nuôi cấy, trộn đều và đếm tế bào tủy trong hỗn dịch.
- Ly tâm 1.000 vòng /5 phút lấy cặn phía dưới để tách bỏ độc chất và các phần mỡ lơ lửng phía trên.
- Mỗi chai nuôi cấy ghi tên người bệnh, số thứ tự của khoa, ngày cấy, ngày thu hoạch.
- Trong mỗi lọ cấy cho:
 - + 10ml môi trường nuôi cấy.
 - + Lượng hỗn dịch tủy chứa từ $1-4 \times 10^6$ tế bào/ml. Lắc nhẹ lọ cấy và để ủ ấm 37°C trong 24 giờ.
- Sau 24 giờ cho vào mỗi lọ 50 μl dung dịch colcemid (10 μl /ml) lại để ủ ấm tiếp 20 phút.
- Sau khi ủ 20 phút chuyển toàn bộ hỗn dịch ở lọ cấy vào ống falcon 15ml, ly tâm ở máy ly tâm roto văng 1000 vòng /phút x 8 phút.
- Sau khi ly tâm hút bỏ phần dịch trong ở trên, để lại cặn tế bào (chỉ hút đến cách mặt trên cặn tế bào khoảng 5mm).
- Cho thêm vào ống ly tâm 9ml dung dịch nhuộm trương đã để ấm 37°C trước, trộn nhẹ một vài lần rồi ủ ở bể ấm 37°C trong 18 phút.
- Sau khi ủ 18 phút cho thêm vào mỗi ống 1ml dung dịch Carnoy, trộn nhẹ để 1 phút.
- Lấy ống ra ly tâm lấy cặn như trên. Sau khi hút bỏ dung dịch trong phía trên cho thêm vào mỗi ống 10ml dung dịch Carnoy, trộn đều để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

- Ly tâm và hút bỏ phần trên rồi thêm 10ml dung dịch Carnoy, trộn đều để ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.
- Lặp lại bước rửa trên.
- Các lam kính sạch rửa sạch ngâm qua nước cất, ngâm lại vào cồn 100⁰, 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 20-30⁰ trên giấy thấm.
- Ly tâm hút bỏ dung dịch trong phía trên, tái huyền dịch và lấy hỗn dịch cặn này nhỏ lên lam kính. Chú ý khi nhỏ tiêu bản để đầu pipet cao hơn mặt phiến kính từ 10-20cm.
- Để tiêu bản khô tự nhiên và tiến hành nhuộm Giemsa hoặc các kỹ thuật nhuộm khác.

Lưu ý: Trong trường hợp còn huyền dịch thì lưu vào ống effendoff để kiểm tra hoặc nhỏ lại lam kính khi cần.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Các biến loạn số lượng và cấu trúc được đánh giá:

- Thừa nhiễm sắc thể (Trisomie): có từ 2 cụm phân bào trở lên thừa cùng 1 nhiễm sắc thể.
- Thiếu nhiễm sắc thể (Monosomie): có từ 3 cụm phân bào trở lên thiếu cùng 1 nhiễm sắc thể.
- Biến loạn cấu trúc: có từ 3 cụm trở lên mang cùng 1 biến loạn.

ĐẾM SỐ LƯỢNG TẾ BÀO GỐC TẠO MÁU TRÊN MÁY CYTOMICS FC-500

I. NGUYÊN LÝ

Tế bào gốc đầu dòng tạo máu có kích thước tương tự lympho, độ phức tạp nhân và bào tương thấp, có biểu hiện CD34+, bắt màu nhạt với CD45. Đồng thời đây cũng là các tế bào có số lượng rất ít trong dịch hút tủy xương. Đếm tế bào gốc tạo máu CD34 được thực hiện trên máy Cytomics FC-500, với chương trình CPX-Stem và sinh phẩm Stem kit của Beckman Coulter, dựa trên nguyên lý đếm sự kiện hiếm theo hướng dẫn của ISHAGE, có sử dụng hạt huỳnh quang tham chiếu.

II. CHỈ ĐỊNH

- Kiểm tra số lượng tế bào gốc trong máu ngoại vi sau dùng thuốc huy động tế bào gốc.
- Kiểm tra số lượng tế bào gốc trong túi tách chiết tế bào gốc từ máu ngoại vi, tủy xương, hoặc máu cuống rốn.
- Kiểm tra số lượng và tỷ lệ tế bào gốc sống trong mẫu lưu trữ sau rã đông.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Phương tiện - hoá chất

- Máy Flow cytometry Cytomics FC-500 của Beckman Coulter.
- Máy vortex.
- Pipetman và typ dùng được cho 20ul, 100ul, 1000ul.
- Typ nhựa 120x70mm tráng silicon.
- Kít Stem kit gồm: 1 lọ CD34-PE/CD45-FITC, 1 lọ Control-PE/CD45-FITC, 1 lọ 7AAD, 1 lọ stem count, 2 lọ dung dịch ly giải hồng cầu đậm đặc 10X.
- Hóa chất: dung dịch PBS (Phosphat Buffer Salin) (tự pha), dung dịch Flow Sheath (mua của hãng).
- Găng tay, giấy thấm...

2. Bệnh phẩm

- Mẫu dùng là máu toàn phần hoặc dịch hút tủy xương được lấy vào ống chứa chất chống đông EDTA. Mẫu cũng có thể là hoặc dịch lấy từ túi tế bào sau gạn tách, chống đông ACD.

– Mẫu dùng cho xét nghiệm phải sớm trong vòng 6 tiếng, bảo quản ở nhiệt độ phòng.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Chuẩn bị mẫu

- Đếm số lượng bạch cầu có trong mẫu bệnh phẩm.
- Pha loãng bệnh phẩm bằng dung dịch PBS để đạt nồng độ bạch cầu 15 G/l.
 $A = \text{Số lượng bạch cầu} / 10$ (A: số lần pha loãng bệnh phẩm, **dilute factor**).
- Pha dung dịch Lysing 1X: tùy theo số lượng mẫu, tính thể tích dung dịch lysing 1X cần thiết, 1 mẫu cần 6ml lysing 1X. Pha lysing 1X bằng cách:
 Thể tích lysing 10X + 9 thể tích nước cất

2. Ủ mẫu với kháng thể

Chuẩn bị 3 typ, đánh số từ #1, #2 và Control.

– Lần lượt cho các kháng thể CD34/CD45, CD45/control và 7AAD vào các ống theo bảng sau:

	CD34/CD45	CD45/control	7AAD
# 1	20 μ l		20 μ l
# 2	20 μ l		20 μ l
Control		20 μ l	20 μ l

- Nhỏ vào mỗi ống 100 μ l bệnh phẩm đã pha loãng, vortex đều.
- Ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng.
- Thêm 2ml dung dịch Lysing 1X vào mỗi ống, ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng.
- Lắc đều lọ Stem count (tránh tạo bọt khi lắc).
- Thêm 100 μ l hạt Stem count vào cả 3 ống ngay trước khi đếm.
- Dem đọc kết quả bằng chương trình đếm tế bào gốc thương mại đi theo máy (Stem Assay panel).

3. Thao tác trên máy Cytomics FC500

- Kiểm tra bình dung dịch chạy máy, dung dịch rửa máy, dung dịch chất nước thải. Bổ sung dung dịch hoặc đổ bỏ nước thải nếu cần thiết.
- Kiểm tra bật nguồn điện qua ổ cắm, bật điện bộ nguồn laser, bật máy tính và máy Cytomics FC500.
- Vào chương trình CXP, chọn tên người làm thí nghiệm, nhập mã đăng nhập. Đợi máy ổn định (khoảng 20 phút).

- Hiện thị các cửa sổ điều kiện.
- Chọn: Panel → Common → Stem → Assay → kéo chương trình xuống của sổ phía dưới.
- Nhập thông tin bệnh phẩm:
 - + Carousel: nhập mã số 1 hoặc 2 tùy theo mẫu được để vào khay 1 hay khay 2.
 - + Position: là vị trí đặt các typ #1, #2 và Control trên Carousel.
 - + ID1: họ tên người bệnh.
 - + ID2: test 1 ứng với #1, test 2 ứng với #2, control ứng với Control.
 - + Factor: nhập số hạt ghi trên lọ Stem count XXX cells/uL.
- Nhập bảng Report:
 - + ID1: copy từ ID 1 ở trên.
 - + Last name: Nhập tên người bệnh.
 - + Date: nhập tháng /ngày/năm.
 - + Physician: nhập tên bác sĩ chỉ định.
 - + Sample: nhập loại bệnh phẩm có thể chọn Whole Blood (máu toàn phần), Apheresis(dịch gạn tách), Cord (máu cuống rốn), Bone Marrow(dịch tủy xương).
 - + WBC: nhập số lượng bạch cầu ($\times 10^9$).
 - + Dilution factor: nhập tỷ lệ pha loãng đã tính khi pha loãng ban đầu.
 - + Save → đóng lại phần nhập report.
- Phân tích mẫu:
 - + Nhấn biểu tượng tam giác (Play) trên bảng điều khiển để phân tích mẫu.
 - + Quan sát các đồ thị, các ô hiển thị tốc độ phân tích để kịp thời xử lý khi có diễn biến bất thường.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Xuất kết quả
- Mở bảng Report → tìm đến mục report → nhập ID1 hoặc Last name → tìm đến người bệnh cần chọn. Slect → kích đúp vào dòng thông tin → Print.
- Rửa máy và tắt máy theo quy trình quy định.
- Nếu kết quả mẫu #1 và #2 không lệch nhau quá 15% → thao tác tốt.
- Nếu kết quả mẫu #1 và #2 lệch quá 15% → thao tác không tốt, nếu lệch quá phải chạy lại.
- Chú ý quan sát kết quả chạy, nếu đồ thị biểu hiện hạt tham chiếu theo thời gian không ổn định → rửa máy, tắt máy, kiểm tra đầy đủ dịch, nước thải rồi chạy lại.

ĐỊNH LƯỢNG VIRUT CYTOMEGALO (CMV) BẰNG KỸ THUẬT REAL - TIME PCR

I. NGUYÊN LÝ

Sử dụng kỹ thuật PCR (Polymer Chain Reaction) để nhân bản một đoạn gen đặc trưng của virus CMV (Cytomegalovirus) 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 AND-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 dùng để phát hiện/định lượng CMV trong các mẫu máu người bị nghi ngờ nhiễm CMV.

Chỉ định để chẩn đoán nguyên nhân gây bệnh (với người bệnh sau ghép cơ quan).

Chỉ định để sàng lọc nguy cơ mang mầm bệnh trên người cho cơ quan trong ghép tạng.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Phương tiện - hóa chất

- Kit tách ADN của hãng Qiagen gồm: buffer AL, Wash I, Wash II, proteinase K, cột lọc.
- Kit định lượng CMV của Nam Khoa gồm: 3 standar 103, 104, 105, CMV mix, HBG mix, IC control, chứng trắng.
- Máy ly tâm eppendoff.
- Máy ủ nhiệt.
- Máy vortex.
- Box vô trùng.
- Đầu côn 1ml, 200µl, 20µl vô trùng, free-nuclease.
- Ống eppendoff 1,5ml, 0,2ml vô trùng, free-nuclease.
- Pipetman 1ml, 200µl, 20µl.

2. Bệnh phẩm

2ml máu toàn phần đựng trong ống chống đông EDTA.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Tách ADN

- Quan sát, đối chiếu cẩn thận tên trên ống máu và giấy xét nghiệm.
- Dùng pipet hút 200μl máu vào một eppendofit vô trùng.
- Bổ sung 20μl proteinase K, trộn nhẹ nhàng bằng hút đầy.
- Thêm 200μl dung dịch AL, vortex 10 giây.
- Ủ 56°C trong 10 phút.
- Thêm 200μl cồn 96°, lắc ngược nhẹ nhàng, không được vortex.
- Chuyển hết dịch trong eppendofit sang cột lọc.
- Ly tâm cột ở 10.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Đổ bỏ hoàn toàn dịch ly tâm ở typ 2ml dưới cột lọc.
- Thêm 500μl dung dịch rửa AW1 vào cột lọc.
- Ly tâm cột ở 10.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Đổ bỏ hoàn toàn dịch ly tâm ở typ 2ml dưới cột lọc.
- Thêm 500μl dung dịch rửa AW2 vào cột lọc.
- Ly tâm cột ở 10.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Đổ bỏ hoàn toàn dịch ly tâm ở typ 2ml dưới cột lọc.
- Đặt cột lọc lên trên ống 2ml mới.
- Ly tâm cột lọc ở 14.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Đặt cột lên ống eppendofit mới đã ghi tên người bệnh.
- Nhỏ 100μl nước vô trùng vào chính giữa cột lọc.
- Ly tâm cột ở 14.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Thu dịch ADN trong ống eppendofit.
- Bảo quản -20° nếu chưa sử dụng ngay.

2. Thực hiện phản ứng Real-time PCR

- Đưa các thành phần của kit định lượng ra nhiệt độ phòng 10 phút để rã đông hoàn toàn.

- Trộn kỹ bằng vortex các ống standar 103,104,105, IC control.
- Trộn nhẹ nhàng bằng lắc ngược các ống CMV-mix, HBG mix.
- Lấy 7 ống eppendoft 0,2ml đánh số thứ tự S1, S2, S3, Nev-HBG, Ne-CMV, BN-HBG, BN- CMV.
- Nhỏ 5µl standar các nồng độ 103, 104, 105 tương ứng vào các ống S1, S2, S3.
- Nhỏ 5µl IC control vào các ống Nev-HBG, Ne-CMV, BN-HBG, BN- CMV.
- Nhỏ 5µl chứng trắng vào các ống Nev-HBG, Ne-CMV.
- Nhỏ 5µl AND của người bệnh cần xét nghiệm vào các ống BN-HBG, BN- CMV.
- Nhỏ 20µl HBG-mix vào các ống Nev-HBG, BN-HBG.
- Nhỏ 20µl CMV-mix vào các ống S1, S2, S3, Ne-CMV, BN- CMV.
- Trộn nhẹ nhàng tất cả các ống trên bằng tay.
- Spin down 10 giây.
- Đặt các ống vào máy Real-time PCR CFX 96 và cài đặt sơ đồ giếng theo đúng thứ tự đặt trên máy.
- Chọn chương trình nhiệt CMV protocol.
- Chọn nơi lưu kết quả trong CMV result.
- Bấm start để máy chạy.

Chương trình chạy sẽ kết thúc sau 1giờ 40 phút.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Kết quả của phản ứng Real-time PCR sẽ hiển thị lên màn hình khi kết thúc chương trình chạy:

- Nếu mẫu âm tính, thì trả kết quả là âm tính kèm với hình ảnh chạy và ghi chú ở dưới là “Ngưỡng phát hiện 10^2 copies /ml máu”.
- Nếu mẫu dương tính thì lấy số lượng virus trong ô kết quả ở màn hình máy tính nhân với 50 (độ pha loãng) và trả kết quả bằng hình ảnh chạy kèm theo số lượng virus tính được sau khi đã nhân với độ pha loãng.

PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN INTRON18/BCL1 BẰNG KỸ THUẬT PCR - RFLP

I. NGUYÊN LÝ

Sử dụng kỹ thuật PCR để nhân bản đoạn gen vùng intron 18 sau đó kết hợp với kỹ thuật RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) để phân tích đoạn gen này sau khi cắt với enzym Bcl I. Phát hiện người mang gen đột biến hay không mang đột biến intron18 /Bcl I thông qua việc quan sát sự hoạt động hay không hoạt động của enzym này trên từng mẫu bệnh phẩm.

II. CHỈ ĐỊNH

- Chỉ định để chẩn đoán di truyền cho người bệnh hemophilia A.
- Chỉ định để sàng lọc người mang gen bệnh hemophilia A.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Phương tiện - hoá chất

- Kit tách ADN của hãng Qiagen gồm: buffer AL, AW1, AW2, proteinase K, cột lọc.
- PCR supermix, cặp mồi 18F và 18R, enzym BclI, buffer 3, dH2O, agarose, Ethidium Bromid, đệm TBE 10X của Invitrogen.
- Máy ly tâm eppendof.
- Bể ổn nhiệt 56°C.
- Máy ủ nhiệt.
- Máy vortex.
- Box vô trùng.
- Đầu côn 1ml, 200µl, 20µl vô trùng, free-nuclease.
- Ống eppendof 1,5ml, 0,2ml vô trùng, free-nuclease.

- Pipetman 1ml, 200 μ l, 20 μ l.

2. Bệnh phẩm

2ml máu toàn phần đựng trong ống chống đông EDTA.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Tách ADN

- Quan sát, đối chiếu cẩn thận tên trên ống máu và giấy xét nghiệm.
- Dùng pipet hút 200 μ l máu vào một eppendofit vô trùng.
- Bổ sung 20 μ l proteinase K, trộn nhẹ nhàng bằng hút đầy.
- Thêm 200 μ l dung dịch AL, vortex 10 giây.
- Ủ 56°C trong 10 phút.
- Thêm 200 μ l cồn 96°, lắc ngược nhẹ nhàng, không được vortex.
- Chuyển hết dịch trong eppendofit sang cột lọc.
- Ly tâm cột ở 10.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Đổ bỏ hoàn toàn dịch ly tâm ở typ 2ml dưới cột lọc.
- Thêm 500 μ l dung dịch rửa AW1 vào cột lọc.
- Ly tâm cột ở 10.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Đổ bỏ hoàn toàn dịch ly tâm ở typ 2ml dưới cột lọc.
- Thêm 500 μ l dung dịch rửa AW2 vào cột lọc.
- Ly tâm cột ở 10.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Đổ bỏ hoàn toàn dịch ly tâm ở typ 2ml dưới cột lọc.
- Đặt cột lọc lên trên ống 2ml mới.
- Ly tâm cột lọc ở 14.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Đặt cột lên ống eppendofit mới đã ghi tên người bệnh.
- Nhỏ 100 μ l nước vô trùng vào chính giữa cột lọc.
- Ly tâm cột ở 14.000 vòng/phút trong 1 phút.
- Thu dịch ADN trong ống eppendofit.
- Bảo quản -20° nếu chưa sử dụng ngay.

2. Thực hiện phản ứng PCR - RFLP

2.1. Phản ứng PCR

- Đưa các thành phần của phản ứng PCR gồm PCR supermix và cặp mồi 18F, 18R ra nhiệt độ phòng 10 phút để rã đông hoàn toàn.
- Trộn nhẹ nhàng bằng lắc ngược các ống PCR supermix và cặp mồi 18F, 18R.

- Lấy 3 ống eppendofit 0,2ml ký hiệu Nev (đối chứng âm), Pos (đối chứng dương), BN (người bệnh).
- Lấy lần lượt các thành phần sau vào mỗi ống eppendofit đã ghi ký hiệu:
 - + PCR super mix: 22,5µl
 - + 18F: 1µl
 - + 18R: 1µl
 - + dH₂O: 2,5µl
- Nhỏ 3µl positive control vào ống ký hiệu Pos.
- Nhỏ 3µl negative control vào ống ký hiệu Nev.
- Nhỏ 3µl AND người bệnh cần xét nghiệm vào ống ký hiệu BN.
- Trộn nhẹ nhàng tất cả các ống trên bằng tay.
- Spin down 10 giây.
- Đặt các ống vào máy PCR C1000.
- Chọn chương trình nhiệt Hemo.
- Bấm start để máy chạy.
- Chương trình chạy sẽ kết thúc sau 2 giờ 40 phút.

2.2. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR

Sau khi kết thúc chương trình PCR phải điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2% để trước khi cắt với enzym.

2.2.1. Quy trình đổ gel

- Cân 1 gam agarose chỉ vào bình Pyrex.
- Thêm 100ml đệm TBE 1X vào bình, lắc đều.
- Đun mỗi lần 1 phút trong lò vi sóng đến khi agarose tan hoàn toàn.
- Để ấm đến 600 rồi đổ vào khay đã cắm lược.
- Để RT 30 phút để thạch đông rồi mới rút lược ra.

2.2.2. Điện di

- Lấy 5µl sản phẩm PCR + 1µl loading dye 10X + 4µl dH₂O.
- Trộn đều và nhỏ vào các giếng theo thứ tự.
- Nhỏ 3µl marker AND 100bp vào giếng kế tiếp.

- Đặt bản gel vào máy điện di.
- Đổ đệm TBE 1X ngập bản gel và chạy ở 100 vòng trong 20 phút.
- Nhuộm bản gel với dung dịch ethidium bromid trong 5 phút.
- Quan sát bản gel dưới đèn UV, nếu thấy các mẫu bệnh phẩm có băng AND 142 bp thì tiếp tục thực hiện phản ứng RFLP, nếu không có thì lặp lại xét nghiệm PCR.

2.3. Phản ứng RFLP

- Lấy lần lượt các thành phần sau vào ống eppendofit 0,2ml đã ghi tên người bệnh:

+ Buffer 3: 3 μ l

+ SP PCR: 25 μ l

+ Bcl I: 2 μ l

- Trộn đều bằng pipet, spin down.

- Ủ 56°, 16giờ.

Điện di sản phẩm cắt này trên gel agarose 2%.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Nếu mẫu người bệnh là nam giới sau phản ứng PCR-RFLP có 2 băng AND 99 bp và 43 bp thì kết luận âm tính.
- Nếu mẫu người bệnh là nam giới sau phản ứng PCR-RFLP có 1 băng AND 142 bp thì kết luận dương tính.
- Nếu mẫu người bệnh là nữ giới sau phản ứng PCR-RFLP có 2 băng AND 99 bp và 43 bp thì kết luận âm tính đồng hợp tử.
- Nếu mẫu người bệnh là nữ giới sau phản ứng PCR-RFLP có 3 băng AND là 142bp, 99 bp và 43 bp thì kết luận dương tính dị hợp tử.

PHÁT HIỆN ĐẢO ĐOẠN INTRON 22 CỦA GEN YẾU TỐ VIII BỆNH HEMOPHILIA A BẰNG KỸ THUẬT LONGRANGE - PCR

I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật longrange PCR (LR-PCR) dựa vào việc trộn hai loại enzym AND polymerase chịu nhiệt, thường là Taq polymerase có hoạt lực cao tổng hợp đầu 5'-3' và một enzym khác hoạt động tổng hợp đầu 3'-5' (thường là Pwo). Sự kết hợp này cho phép primer có kích thước lớn được duỗi ra hơn là chỉ sử dụng một mình Taq. Do đó nó cho phép khuếch đại một đoạn gen lớn và tạo ra sản phẩm PCR có kích thước lớn hơn nhiều so với sản phẩm PCR thông thường, sản phẩm LR-PCR thường có kích thước từ 10-12kb.

II. CHỈ ĐỊNH

- Người bệnh được chẩn đoán là hemophilia A thể nặng và thể trung bình.
- Người phụ nữ có liên quan (chị, em gái, mẹ, dì) đến những người bệnh trên.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

Kỹ thuật viên phòng sinh học phân tử.

2. Phương tiện - hoá chất

2.1. Hoá chất, sinh phẩm

- Primer

P	5' GCCCTGCCTGTCCATTACACTGATGACATTATGCTGAC3' (38-mer)
Q	5' GGCCCTACAACCATTCTGCCTTTCACCTTCAGTGCAATA 3'(3- mer)
A	5' CACAAGGGGGAAGAGTGTGAGGGTGTGGGATAAGAA 3' (36-mer)
B	5' CCCCAAACCTATAACCAGCACCTTGAACCTCCCCTCTCATA 3' (40-mer)

Giữ stock 100pmoles/μl trong -20°C

Working primer: 10 pmoles/ μ l trong 2-8°C.

Kit LongRange PCR (Quiagen, Cat No: 206402 gồm 10X Longrange PCR buffer và Enzyme mix (5U/ μ l)).

- $MgCl_2$ (25mM)
- dNTPs (2.5mM)
- 7-dease-dGTP (Roche; Cat No: 10 988 537 001)
- DNA markers (λ DNA marker/ Hind III(Gibco))
- 5X TBE buffer (bổ sung tên Cat No)
- Ethidium bromid (10mg/ml(Sigma))
- Nước cất không DNA hoặc RNA.
- 6X loading dye
- DMSO (Sigma)
- Máy PCR C1000, Bio- Rad
- Hệ thống điện di CC9918
- Hệ thống điện di Maxfill 3001251
- Hệ thống đọc gel HU 25
- Pipetman (p10, p20, p100)
- Máy ly tâm
- Lò vi sóng
- Hốt vô trùng
- Ống chống đông EDTA 2ml
- Typ ependoff 1,5ml; 0,5ml

3. Bệnh phẩm

- Mẫu AND của người bệnh đã được đo OD.
- Mẫu chứng có 4 ống: 2 chứng dương (1 mẫu người bệnh, 1 mẫu người phụ nữ mang gen bệnh), 1 chứng âm, 1 mẫu nước cất.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Pha 2 master mix PCR trong hốt ở tại phòng tiến PCR theo worksheet

1.1. Master mix1 (MM1)

dATP (10mM)	1,25 μ l
dCTP (10mM)	1,25 μ l
dTTP (10mM)	1,25 μ l
dGTP (10mM)	0,625 μ l
7-dease-dGTP (10mM)	0,625 μ l
Oligo-P (10pmoles/)	0,5 μ l
Oligo-Q (10pmoles/)	0,5 μ l
Oligo-A (10pmoles/)	0,2 μ l
Oligo-B (10pmoles/)	0,2 μ l
10X buffer	2,0 μ l
DMSO	0,4 μ l

1.2, Master mix 2 (MM2)

Longrange PCR enzym mix (5UI/ μ l)	0,5 μ l
10X longrange PCR buffer	0,5 μ l
Nước cất	4,0 μ l

2. Mix mẫu phản ứng

- Cho 8,8 μ l MM1 vào ống 0,2ml PCR.
- Thêm nước, 10-20ng AND mẫu và chứng (cho đủ tổng số 20 μ l).
- Mang mẫu và MM2 tới phòng chạy PCR (đặt MM2 trên đá).
- 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”.

+ Thêm 5 μ l MM2 vào mỗi ống và trộn đều bằng pipet. Ấn “Resum”.

+ Điện di kiểm tra sản phẩm (hoặc cất vào tủ lạnh tới khi điện di).

3. Điện di kiểm tra sản phẩm

- Đổ gel 1,5g agarose trong 300ml 0,5XTBE buffer. Thêm 12 μ l ethidium bromid (10mg/ml) vào 300ml agarose.
- Thêm 1/6 thể tích của 6X loading dye vào mỗi giếng của khay Terasaki (dùng để trộn mẫu điện di).
- Lấy 10 μ l sản phẩm cho vào mỗi giếng có sẵn loading dye trộn kỹ, nhỏ vào giếng gel.
- Nhỏ 5 μ l marker vào giếng đầu tiên của bản gel.
- Chạy điện di 90volt/1 giờ, kiểm tra bằng, 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.
- Chụp ảnh gel, in ảnh và dán vào worksheet.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Sản phẩm được đọc trên bản gel có 3 kích thước là 10kb, 11kb, 12kb.

Cụ thể:

- Mẫu không có đảo đoạn sẽ có 02band: 10kb, 12kb.
- Mẫu có đột biến đảo đoạn nếu đồng hợp tử có 02 band: 10, 11 nếu dị hợp tử có 03 band 10,11,12kb.

XÉT NGHIỆM ĐỊNH TYP HLA BẰNG KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ

I. NGUYÊN LÝ

Kỹ thuật SSP dựa trên ứng dụng kỹ thuật PCR. Với việc tổng hợp nên các đoạn ADN đặc trưng từ 1 đoạn ADN khuôn bằng các cặp mồi đặc hiệu. Thông qua phần mềm phân tích để xác định nhóm HLA cho từng cá thể.

II. CHỈ ĐỊNH

- Người bệnh chờ ghép tủy xương, ghép tạng đồng loại.
- Người hiến tạng, hiến tủy xương.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên đã được đào tạo thực hiện kỹ thuật.

2. Phương tiện - hoá chất

- Máy ly tâm lạnh cho eppendoff.
- Máy PCR.
- Máy điện di gel agarrose.
- Máy votex.
- Hệ thống soi gel bằng đèn cực tím.
- Hệ thống chụp ảnh gel sau điện di.
- Pipetman các loại: 1000µl, 200µl, 20µl.
- Pipet nhựa dùng 1 lần.
- Ống ependoff 1,5ml.
- Đầu côn có phin lọc loại 1000µl, 200µl, 20µl.
- Đầu côn không có phin lọc loại 200µl.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Kiểm tra hồ sơ

Đối chiếu mẫu xét nghiệm với giấy chỉ định xét nghiệm.

2. Thực hiện kỹ thuật

- Lấy ống D-mix, phiến xét nghiệm, mẫu ADN ra khỏi tủ bảo quản, để tan đông ở nhiệt độ phòng.
- Lấy ống enzym Taq ra khỏi tủ âm và giữ trên đá cho đến khi sử dụng.
- Dùng pipet chuyển 120 μ l ADN và 7 μ l taq vào ống D-mix.
- Dùng máy votex để trộn đều hỗn hợp trên, sau đó ly tâm nhẹ để kéo toàn bộ hóa chất bám trên nắp ống xuống đáy.
- Chia vào từng giếng của phiến 10 μ l hỗn hợp trên.
- Dùng miếng giấy dán, dán kín toàn bộ phiến.
- Đặt phiến vào máy PCR.
- Chọn chương trình chạy PCR cho xét nghiệm HLA.
- Lấy phiến ra khỏi máy PCR sau khi chương trình chạy kết thúc.
- Điện di toàn bộ sản phẩm sau PCR trên thạch agarrose 2%.
- Điện di 10 phút ở hiệu điện thế 100V.
- Sau khi điện di, nhuộm bản gel với ethidium boromid.
- Rửa lại bản gel và xem kết quả điện di trên máy soi gel.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Chụp lại ảnh và phân tích kết quả bằng phần mềm onelambda.
- Đánh dấu vị trí của những băng đặc hiệu.
- Nhập lại những vị trí đó vào phần mềm phân tích kết quả.
- Sau khi phần mềm phân tích kết quả xong, in kết quả đã phân tích.

XÁC ĐỊNH GEN BỆNH MÁU BẰNG KỸ THUẬT RT - PCR

I. NGUYÊN LÝ

Dựa trên nguyên tắc nhân bản đoạn gen bằng các cặp mồi đặc hiệu.

II. CHỈ ĐỊNH

Áp dụng cho người bệnh có nghi ngờ bị bệnh máu hoặc những người bệnh có điều trị hóa chất.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Người thực hiện

Bác sĩ, cử nhân, kỹ thuật viên xét nghiệm đã được đào tạo để thực hiện kỹ thuật.

2. Phương tiện - hoá chất

- Máy ly tâm lạnh cho eppendoff.
- Máy votex.
- Máy PCR.
- Máy điện di gel agarrose.
- Hệ thống soi gel bằng đèn cực tím.
- Hệ thống chụp ảnh gel sau điện di.
- Pipetman các loại: 1000µl, 200µl, 20µl.
- Ống eppendoff 0,2ml.
- Đầu côn có phin lọc loại 1000µl, 200µl, 20µl.
- Đầu côn không có phin lọc loại 200µl.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Các thành phần của phản ứng RT-PCR được lấy ra trước 5 phút để tan đông hoàn toàn.
- ARN được tách từ tủy bằng kit của Qiagen.
- Lấy các thành phần cho phản ứng theo bảng sau:

Tên hóa chất	Số lượng (μ l)
Reaction mix	25
Taq platilum	1
Môi xuôi	1
Môi ngược	1
Nước	19
ARN	3

- Sau khi lấy đầy đủ các thành phần như trên vào ống eppendoff 0,2ml, trộn đều hỗn hợp trên bằng máy votex.
- Đưa ống eppendoff vào máy ly tâm để spin down.
- Đặt ống eppendoff vào máy PCR.
- Chạy PCR theo chương trình đã cài sẵn trên máy PCR.
- Sau khi PCR lấy ống eppendoff ra và chuẩn bị cho phản ứng PCR.

PCR

Lấy thành phần của phản ứng PCR ra trước 5 phút và để tan đông hoàn toàn.

Lấy các thành phần theo bảng sau:

Tên hóa chất	Số lượng (μ l)
Super mix	40
Môi xuôi	1
Môi ngược	1
Nước	5
Sản phẩm RT-PCR	3

- Sau khi trộn toàn bộ các thành phần trên bằng máy votex, đem ống eppendoff ly tâm để spin down.
- Đặt ống eppendoff vào máy PCR.

- Chạy PCR theo chương trình đã cài sẵn trên máy.
- Sau khi PCR lấy ống eppendoff đem điện di bằng thạch agarrose.
- Sau khi điện di kiểm tra kết quả bằng máy soi gel.
- Chụp ảnh và phân tích kết quả.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Kết quả là dương tính nếu sau khi điện di sản phẩm PCR có xuất hiện băng đặc hiệu.
- Kết quả là âm tính nếu sau khi điện di sản phẩm PCR không xuất hiện băng đặc hiệu.

KHÁNG THỂ KHÁNG NHÂN ANA (ANTINUCLEAR ANTIBODIES) BẰNG KỸ THUẬT ELISA

I. NGUYÊN LÝ

Các kháng nguyên tinh sạch được gắn sẵn vào giếng bao gồm: ds DNA, histones, SS-A/Ro, SS-B/La, Sm, SmRNP, Scl-70, Jo-1, centromere, và các kháng nguyên tách từ nhân HEP-2. Do đó các kháng thể của các kháng nguyên này nếu hiện diện trong huyết thanh sẽ gắn đặc hiệu vào các kháng thể trên giếng. Thực hiện bước rửa để loại bỏ các kháng thể không gắn đặc hiệu. Sau khi nhỏ dung dịch cộng hợp có chứa kháng thể kháng globulin miễn dịch người gắn với enzym horseradish peroxidase vào giếng, kháng thể này sẽ gắn với phức hợp trong giếng hình thành nên phức hợp sandwich: cộng hợp - kháng thể - kháng nguyên. Sau khi rửa, các cộng hợp không gắn với phức hợp sẽ bị loại bỏ, chỉ còn lại phức hợp sandwich trong giếng. Do vậy, khi nhỏ dung dịch cơ chất TMB substrate, enzym sẽ xúc tác tạo phản ứng tạo màu xanh da trời. Cuối cùng, dung dịch sẽ chuyển sang màu vàng khi nhỏ thêm dung dịch Stop solution. Kết quả được định lượng bằng máy đọc OD ở bước sóng 450nm.

II. CHUẨN BỊ

1. Phương tiện - hoá chất

1.1. Thành phần kit

– Quy trình sử dụng kit của BIORAD: REF 96AN-576AN-4250000, Autoimmune EIA ANA screening test.

– Thành phần kit bao gồm:

+ MPLT (ANA screening test microplate): plate 96 giếng, các kháng nhân của nhân tế bào được gắn sẵn vào các giếng và các giếng được bảo quản trong túi dán kín.

+ WSH-CONC (DNA wash concentrate 16.7X): thành phần dung dịch bao gồm đệm phosphate và Tween 20. Dung dịch sau khi pha loãng sẽ có pH 7.3.

+ SAMP-DIL (Sample diluent): thành phần dung dịch bao gồm đệm phosphat, sodium acid, pH 7.3.

+ CONJ (Conjugate): dung dịch đệm chứa goat anti-human IgG horseradish peroxidase.

+ CONTROL + (ANA screening test positive control): chứng dương chứa kháng thể ANA trong huyết thanh người.

+ C/O-CONTROL (ANA screening test cutoff control): chứng chuẩn chứa kháng thể ANA trong huyết thanh người.

+ CONTROL - (ANA screening test negative control): chứng âm chứa kháng thể ANA trong huyết thanh người.

+ SUBS (Substrate): Tetramethylbenzidin (TMB) được pha loãng trong đệm hydrogen peroxide.

+ STOP (Stop solution): chứa 1,5 % sulfuric acid và 1.5% hydrochloric acid.

1.2. Chuẩn bị hóa chất và vật liệu

Trước khi tiến hành thí nghiệm các hóa chất cần dùng được mang ra nhiệt độ phòng để ổn định nhiệt độ.

– Pha dung dịch rửa:

+ Dung dịch rửa (DNA Wash solution) được pha loãng với tỷ lệ 6ml dung dịch rửa + 100 ml nước cất.

+ Dung dịch sau khi pha loãng có thể bảo quản 14 ngày tại nhiệt độ 2-8°C

– Chuẩn bị mẫu:

Ly tâm mẫu tách huyết thanh, đánh số thứ tự các mẫu.

– Pha loãng đối chứng và mẫu:

Chứng dương, chứng âm, chứng chuẩn và mẫu xét nghiệm được pha loãng với dung dịch pha loãng (sample Diluent) theo tỷ lệ 1:40.

10ul mẫu: 400ul dung dịch pha loãng.

– Chuẩn bị giếng:

+ Chuẩn bị số lượng giếng phù hợp với số lượng các mẫu xét nghiệm.

+ Gắn các giếng vào giá, đánh dấu theo thứ tự các mẫu.

– Chuẩn bị vật liệu:

+ Pipet và typ 10ul, 100ul, 1000ul.

+ Máy đọc OD.

+ Nắp đậy màu đen.

+ Giấy thấm.

III. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Pha loãng mẫu và chuẩn bị giếng

– Chuẩn bị các ống mới để pha loãng.

+ Pha loãng chứng âm, chứng dương, chứng chuẩn:

10ul chứng: 400ul sample Diluent, trộn kỹ.

- + Pha loãng mẫu

10ul mẫu: 400ul sample Diluent, trộn kỹ.

- Chuẩn bị và gắn giếng phản ứng vào khung theo số lượng vừa đủ.

2. Nhỏ mẫu

- Nhỏ 100ul chủng các loại và mẫu đã pha loãng vào các giếng tương ứng, ủ 30 phút, nhiệt độ phòng.

- Rửa giếng.

+ Thủ công: nhỏ 300ul dung dịch rửa vào mỗi giếng, chờ 30 giây, đổ bỏ dịch, vẩy khô và đập giếng trên giấy thấm để loại bỏ hết dịch. Thực hiện bước rửa 3 lần.

- + Máy: rửa theo chương trình tự động.

3. Nhỏ Conjugate

- Nhỏ 100ul Conjugate vào tất cả các giếng, ủ 30 phút, nhiệt độ phòng.

- Rửa giếng.

+ Thủ công: nhỏ 300ul dung dịch rửa vào mỗi giếng, chờ 30 giây, đổ bỏ dịch, vẩy khô và đập giếng trên giấy thấm để loại bỏ hết dịch. Thực hiện bước rửa 3 lần.

- + Máy: rửa theo chương trình tự động.

4. Nhỏ Substrate

Nhỏ 100ul TMB substrate solution vào tất cả các giếng, ủ 30 phút, nhiệt độ phòng, không ánh sáng.

Chú ý: không được để quá thời gian ủ.

5. Nhỏ Stop solution

Nhỏ 100 ul Stop solution vào mỗi giếng.

IV. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đọc kết quả

- Đọc OD ở bước sóng 450nm trong vòng 30 phút sau khi nhỏ Stop solution.

– Đầu tiên đọc giếng blanking control (chỉ có Diluent sample) rồi đến các giếng chuẩn và giếng chứa mẫu.

- Yêu cầu:

- + Giếng chứng dương và chứng chuẩn phải có màu vàng.

+ Giếng chứng âm và giếng blank có màu hơi vàng hoặc không có màu.

2. Phân tích kết quả

Kết quả đo mật độ quang được nhập vào phần mềm phân tích kết quả và tính theo công thức sau:

$$\text{ANA của mẫu} = (\text{OD mẫu} / \text{OD chứng chuẩn})$$

ANA	Kết quả
< 1.0	Âm tính
≥ 1.0	Dương tính

V. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Làm không đúng, không đủ các bước của quy trình → làm lại.
- Để thời gian ủ các bước quá lâu hoặc không đủ thời gian → làm lại.
- Rửa giếng không kỹ → làm lại.

KHÁNG THỂ KHÁNG dsDNA (Anti double stranded DNA) BẰNG PHƯƠNG PHÁP ELISA

I. NGUYÊN LÝ

dsDNA tinh sạch được gắn sẵn vào giếng. Do đó các kháng thể của dsDNA nếu hiện diện trong huyết thanh sẽ gắn đặc hiệu vào các dsDNA trên giếng. Thực hiện bước rửa để loại bỏ các kháng thể không gắn đặc hiệu. Sau khi nhỏ dung dịch cộng hợp có chứa kháng thể kháng globulin miễn dịch người gắn với enzym horseradish peroxidase vào giếng, kháng thể này sẽ gắn với phức hợp trong giếng hình thành nên phức hợp sandwich: cộng hợp - kháng dsDNA - dsDNA. Sau khi rửa, các cộng hợp không gắn với phức hợp sẽ bị loại bỏ, chỉ còn lại phức hợp sandwich trong giếng. Do vậy, khi nhỏ dung dịch cơ chất TMB substrate, enzym sẽ xúc tác tạo phản ứng tạo màu xanh da trời. Cuối cùng, dung dịch sẽ chuyển sang màu vàng khi nhỏ thêm dung dịch Stop solution. Kết quả được định lượng bằng máy đọc OD ở bước sóng 450nm.

II. CHỈ ĐỊNH

- Các trường hợp nghi ngờ lupus ban đỏ.
- Nghi có bệnh tự miễn.
- Có kết quả ANA dương tính.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Phương tiện - hoá chất

1.1. Thành phần kit

- Quy trình sử dụng kit của BIORAD: REF 96DS-576DS, Autoimmune EIA Anti-dsDNA test.
- Thành phần kit bao gồm:
 - + MPLT (anti-dsDNA microplate): kháng nhân dsDNA được gắn sẵn vào các giếng và các giếng được bảo quản trong túi dán kín.
 - + WSH-CONC (DNA wash concentrate 16.7X): thành phần dung dịch bao gồm đệm phosphat và Tween 20. Dung dịch sau khi pha loãng sẽ có pH 7.3.

+ SAMP-DIL (DNA sample diluent): thành phần dung dịch bao gồm đệm phosphat, sodium azid, pH 7.3.

+ CONJ (Conjugate): dung dịch đệm chứa Goat anti-human IgG horseradish peroxidase.

+ CONTROL + (Anti-dsDNA positive control): chứng dương chứa kháng thể kháng dsDNA trong huyết thanh người.

+ CAL (Anti-dsDNA calibrator): chứng chuẩn chứa kháng thể kháng dsDNA trong huyết thanh người.

+ CONTROL (Anti-dsDNA negative control): chứng âm chứa kháng thể kháng dsDNA trong huyết thanh người.

+ SUBS (Substrate): Tetramethylbenzidin (TMB) được pha loãng trong đệm hydrogen peroxid.

+ STOP (Stop solution): chứa 1,5 % sulfuric acid và 1,5% hydrochloric acid.

1.2. Chuẩn bị hóa chất và vật liệu

Trước khi tiến hành thí nghiệm các hóa chất cần dùng được mang ra nhiệt độ phòng để ổn định nhiệt độ.

– Pha dung dịch rửa:

+ Dung dịch rửa (DNA Wash solution) được pha loãng với tỷ lệ:

+ 6ml dung dịch rửa + 100ml nước cất.

+ Dung dịch sau khi pha loãng có thể bảo quản 14 ngày tại nhiệt độ 2-8°C.

– Chuẩn bị mẫu:

Ly tâm mẫu tách huyết thanh, đánh số thứ tự các mẫu.

– Pha loãng đối chứng và mẫu:

Chứng dương, chứng âm, chứng chuẩn và mẫu xét nghiệm được pha loãng với dung dịch pha loãng DNA (sample Diluent) theo tỷ lệ 1: 100.

10ul mẫu: 1.000ul dung dịch pha loãng.

– Chuẩn bị giếng:

+ Chuẩn bị số lượng giếng phù hợp với số lượng các mẫu xét nghiệm.

+ Gắn các giếng vào giá, đánh dấu theo thứ tự các mẫu.

– Chuẩn bị vật liệu:

+ Pipet và typ 10ul, 100ul, 1.000ul

+ Máy đọc OD

- + Nắp đậy màu đen.
- + Giấy thấm.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Pha loãng mẫu và chuẩn bị giếng

- Chuẩn bị các ống mới để pha loãng.
- + Pha loãng chứng âm, chứng dương, chứng chuẩn:
10ul chứng: 1000ul sample Diluent, trộn kỹ.
- + Pha loãng mẫu
10ul mẫu: 1000ul sample Diluent, trộn kỹ.
- Chuẩn bị và gắn giếng phản ứng vào khung theo số lượng vừa đủ.

2. Nhỏ mẫu

- Nhỏ 100ul chứng các loại và mẫu đã pha loãng vào các giếng tương ứng
- Ủ 30 phút, nhiệt độ phòng.
- Rửa giếng
+ Thủ công: nhỏ 300ul dung dịch rửa vào mỗi giếng, chờ 30 giây, đổ bỏ dịch, vẩy khô và đập giếng trên giấy thấm để loại bỏ hết dịch. Thực hiện bước rửa 3 lần.
- + Máy: rửa theo chương trình tự động.

3. Nhỏ Conjugate

- Nhỏ 100ul Conjugate vào tất cả các giếng.
- Ủ 30 phút, nhiệt độ phòng.
- Rửa giếng.
+ Thủ công: nhỏ 300ul dung dịch rửa vào mỗi giếng, chờ 30 giây, đổ bỏ dịch, vẩy khô và đập giếng trên giấy thấm để loại bỏ hết dịch. Thực hiện bước rửa 3 lần.
- + Máy: rửa theo chương trình tự động.

4. Nhỏ Substrate

- Nhỏ 100ul TMB substrate solution vào tất cả các giếng.
- Ủ 30 phút, nhiệt độ phòng, không ánh sáng.

Chú ý: Không được để quá thời gian ủ.

5. Nhỏ Stop solution

Nhỏ 100ul Stop solution vào mỗi giếng.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

1. Đọc kết quả

- Đọc OD ở bước sóng 450nm trong vòng 30 phút sau khi nhỏ Stop solution.
- Đầu tiên đọc giếng blanking control (chỉ có Diluent sample) rồi đến các giếng chuẩn và giếng chứa mẫu.
- Yêu cầu
 - + Giếng chứng dương và chứng chuẩn phải có màu vàng.
 - + Giếng chứng âm và giếng blank có màu hơi vàng hoặc không có màu.

2. Phân tích kết quả

Kết quả đo mật độ quang được nhập vào phần mềm phân tích kết quả và tính theo đơn vị International Units (IUs).

$IU \text{ của mẫu} = (OD \text{ mẫu} / OD \text{ chứng chuẩn}) \times IU$

Ius	Kết quả
< 25	Âm tính
25 - 30	Nghi ngờ dương tính
30 - 60	Dương tính thấp
60 - 200	Dương tính
> 200	Dương tính mạnh

VI. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

- Làm không đúng, không đủ các bước của quy trình → làm lại.
- Để thời gian ủ các bước quá lâu hoặc không đủ thời gian → làm lại.
- Rửa giếng không kỹ → làm lại.

XÉT NGHIỆM HLA - B27 BẰNG KỸ THUẬT FLOWCYTOMETRY

I. NGUYÊN LÝ

Dùng phức hợp hai kháng thể đơn dòng: anti CD3-PE và anti HLA-B27 FITC để phát hiện sự có mặt của kháng nguyên HLA-B27 trên bề mặt bạch cầu lympho người.

II. CHỈ ĐỊNH

- Người bệnh có triệu chứng đau sưng khớp, đặc biệt các khớp gốc chi, cột sống, thắt lưng và bác sĩ nghĩ đến khả năng viêm cột sống dính khớp.
- Các người bệnh có viêm màng bồ đào không do nhiễm khuẩn.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Phương tiện - hoá chất

- Các pipetman dùng được cho định mức 20uL, 100uL và 1000uL.
- Typ nhựa 120x70mm dùng cho máy flow cytometry.
- Máy Flowcytometry (Cytomics FC-500).
- Hóa chất:
- Các kháng thể đơn dòng anti HLA-B27-FITC, anti CD3-PE.
- Dung dịch ly giải hồng cầu (Optimize C).
- Các dung dịch cho máy Flow cytometry: dung dịch chạy máy flow (ISO FlowSheat), dung dịch rửa máy flow (IsoClenz).
- Găng tay.

2. Bệnh phẩm

- Mẫu dùng: 2ml máu toàn phần lấy vào ống chứa chất chống đông EDTA.
- Mẫu dùng cho xét nghiệm có thể bảo quản 7 ngày ở nhiệt độ 2°C đến 8°C.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Vortex đều ống máu mẫu.

- Ủ mẫu với kháng thể.
 - + Ghi tên người bệnh lên typ flow 12x70mm.
 - + Cho vào ống 20uL anti CD3-PE và 20uL anti HLA-B27-FITC.
 - + Lấy 100uL máu đã vortex nhỏ vào typ, vortex đều, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.
 - + Thêm 1ml dung dịch lysing, vortex đều, ủ 10 phút ở nhiệt độ phòng.
- Đọc kết quả
 - + Bật máy Flow cytometry, vào chương trình phân tích HLA-B27 (theo quy trình hướng dẫn riêng trên từng máy).
 - + Vortex lại trước khi đem mẫu đọc kết quả bằng chương trình phân tích HLA-B27 trên máy flow cytometry.
 - + Khoanh vùng lympho dựa trên thông số SS và FS trên.
 - + Nếu phát hiện có CD3+ chứng tỏ kháng thể hoạt động tốt.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

Xác định trên quần thể CD3+: nếu HLA-B27 dương tính → kết luận người bệnh dương tính với kháng nguyên HLA-B27, nếu HLA-B27 âm tính → kết luận người bệnh âm tính với kháng nguyên HLA-B27.

Rửa và tắt máy flow cytometry theo quy trình quy định riêng cho từng máy.

PHÂN TÍCH MYELOPEROXIDASE (MPO) NỘI BÀO

I. NGUYÊN LÝ

Myeloperoxidase (MPO) là một kháng nguyên đóng vai trò dấu ấn cho AML. Có thể phát hiện chính xác MPO bằng flow cytometry. Kết hợp sử dụng phân loại miễn dịch kháng nguyên nội và ngoại bào phải dùng chất xử lý màng tế bào. Sự xuất hiện MPO đặc hiệu cho AML. Tuy nhiên, không phải tất cả các trường hợp AML, bao gồm FAB M0 AML, đều là cMPO⁺, trong khi hoạt tính miễn dịch của MPO có thể thấy ở một số trường hợp ALLs.

II. CHỈ ĐỊNH

Lơ xê mi cấp nghi dòng tủy.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Phương tiện - hóa chất

- MPO - FITC Monoclonal Antibody (Myeloperoxidase)
 - + IO Test - Immunotech (ASR).
 - + Bảo quản 2 - 8°C. Không để đóng đá.
 - + Tránh ánh sáng.
 - + Ổn định đến ngày hết hạn.
- CD45 - ECD Monoclonal Antibody
 - + IO Test - Immunotech (ASR).
 - + Bảo quản 2-8°C, không để đóng đá.
 - + Tránh ánh sáng.
 - + Ổn định đến ngày hết hạn.
- CD34 - PE Monoclonal Antibody
 - + IO Test - Immunotech (ASR)
 - + Bảo quản 2-8°C, không để đóng đá.
 - + Tránh ánh sáng.
 - + Ổn định đến ngày hết hạn...

- IntraPrepPerp Permeabilization Reagent Kit
- + Immunotech.
- + Bảo quản nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.
- + Ổn định đến ngày hết hạn.
- + Gồm có các hóa chất sau:

- Reagent 1: Fixation

Cảnh báo: chứa 5,5% formaldehyd. Formaldehyd là chất độc, gây dị ứng và có thể là tác nhân gây ung thư. Tránh dây vào mắt, da và quần áo.

- Reagent 2: Permeabilization

Cảnh báo: chứa 0,1% sodium acid. Sodium acid là chất độc hại khi hít phải, khi tiếp xúc da và khi nuốt phải. Tránh tiếp xúc với mắt, da và quần áo.

- IsoFlow Sheath Fluid(Coulter)
- + Bảo quản nhiệt độ phòng.
- + Không dùng khi quá hạn sử dụng.
- Máy ly tâm
- Máy lắc (Vortex)
- Các ống nhựa dùng 1 lần 12x75mm
- Pipet và pipet typ

2. Bệnh phẩm

Huyền dịch tế bào máu, tủy xương, hoặc tổ chức khác được xử lý theo Quy trình chuẩn bị mẫu và phân tích Leukemia/Lymphoma.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Quy trình nhuộm phối hợp các kháng nguyên nội và ngoại bào gồm MPO, CD34 và CD45 được dùng cho phân tích MPO.
- Mỗi người bệnh (hoặc chứng) dùng 1 ống.
- Thêm 10uL CD 34 PE monoclonal antibody (chỉ khi người bệnh có CD34+) và 10 uL CD45 ECD vào ống.
- Pipet 50uL mẫu người bệnh đã xử lý vào ống tương ứng.
- Vortex từng ống.
- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng (18-25°) trong tối.
- Thêm 100uL IntraPrep Reagent 1 vào mỗi ống.
- Vortex từng ống.

- Ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng (18-25°) trong tối.
- Thêm 4mL IsoFlow vào từng ống.
- Ly tâm trong 5 phút ở 3.000 vòng /phút.
- Hút bỏ dịch nổi.
- Thêm 100uL IntraPrep Reagent 2 vào mỗi ống each tube.
- Trộn nhẹ 1-2 giây (không vortex).
- Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Trộn nhẹ 1-2 giây (không vortex).
- Thêm 20uL MPO-FITC Monoclonal Antibody vào từng ống.
- Vortex từng ống.
- Ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng (18-25°) trong tối.
- Thêm 4mL IsoFlow vào mỗi ống.
- Ly tâm 5 phút ở 3.000 vòng /phút.
- Hút bỏ dịch nổi.
- Tái huyền dịch tế bào trong 500ul IsoFlow.
- Phân tích mẫu đã chuẩn bị bằng máy flow cytometer trong vòng 2 hours. Nếu chưa phân tích được ngay, bảo quản mẫu ở 2-8°C và phân tích trong vòng 24 giờ.
- Trên máy Cytomics FC500, phân tích bằng chương trình CXP và MPO/34/45 Protocol.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

MPO có ở các tế bào trưởng thành dòng tủy, là thành phần chính của bạch cầu hạt trung tính, nhưng không có ở các tế bào trưởng thành dòng lympho. Do vậy bạch cầu hạt được dùng làm nội chứng dương cho MPO còn lympho trưởng thành được dùng làm nội chứng âm.

Đính tất cả các đồ hình do máy in ra vào tờ tóm tắt kết quả, và chuyển cho bác sĩ phân tích, kèm theo các lam dàn hoặc lam cytospin để phân tích. Bác sĩ sẽ xem lại tất cả các đồ hình, diễn giải và ghi DƯƠNG, ÂM hoặc KHÔNG RÕ RÀNG vào cột kết quả của tờ tóm tắt. Bác sĩ cũng có thể chọn cách đọc kết quả YẾU hoặc MẠNH kèm theo để phản ánh mức độ mật độ huỳnh quang bác sĩ cũng sẽ phỏng đoán đưa ra một lời lý giải hoặc đưa ra các gợi ý cần thiết vào tờ báo cáo.

XÉT NGHIỆM CD55-CD59 HỒNG CẦU

I. NGUYÊN LÝ

Trên bề mặt hồng cầu có các dấu ấn CD55, CD59. Bình thường 100% hồng cầu có đầy đủ CD55, CD59. Các CD này có tác dụng ngăn cản bổ thể tấn công gây tan hồng cầu. Khi thiếu hụt hoặc mất CD55-CD59, hồng cầu trở nên mẫn cảm với bổ thể và dễ dàng bị phá hủy khi gặp điều kiện thuận lợi. Phân tích CD55-CD59 hồng cầu là tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán Đái huyết sắc tố kịch phát ban đêm. Dùng kháng thể đơn dòng kháng CD55-FITC và kháng thể đơn dòng kháng CD59-PE có thể phát hiện được mức độ có mặt, thiếu hụt hoặc mất CD55, CD59 trên bề mặt hồng cầu.

II. CHỈ ĐỊNH

- Người bệnh có giảm đa dòng tế bào máu, có biểu hiện tắc mạch, biểu hiện tan máu nội mạch.
- Có biểu hiện suy tủy xương.
- Có tan máu nội mạch chưa rõ nguyên nhân.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Phương tiện - hoá chất

- Pipet và typ 10ul, 20ul, 100ul và 100ul.
- Typ thủy tinh 120x70mm.
- Ống nhựa 120x70mm dùng cho máy flow cytometry.
- Máy Flowcytometry.
- Hóa chất: dung dịch PBS, dung dịch chạy và rửa máy flow.
- Kháng thể đơn dòng anti CD55-FITC, anti CD59-PE.

2. Bệnh phẩm

- Mẫu dùng là máu toàn phần, được lấy vào ống chứa chất chống đông EDTA 2,5ml.

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

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Chuẩn bị mẫu:
 - + Pha loãng mẫu theo tỷ lệ 1/100 bằng dung dịch PBS.
 - + Hút 1ml PBS vào typ thủy tinh.
 - + Vortex ống máu, lấy 10ul máu hòa loãng vào 1ml PBS.
- Ủ mẫu với kháng thể:
 - + Ghi tên người bệnh lên ống nhựa 120x70mm.
 - + Cho vào ống 20ul anti CD55-FITC và 20ul anti CD59-PE.
 - + Thêm vào ống trên 100ul máu đã pha loãng, vortex đều.
 - + Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng.
 - + Thêm 1ml PBS, vortex đều.
 - + Chuyển sang phân tích trên máy flow cytometry dùng chương trình phân tích CD55, CD59.
- Thao tác với máy Flowcytometry:
 - + Bật máy tính, chọn chương trình CXP... → chọn tên người làm thí nghiệm (ví dụ: Hòa) → Nhập Pass phía dưới: password, đợi máy ổn định khoảng 20 phút.
 - + Chọn: Panel → tìm đến PNH hong cau → kéo chương trình xuống cửa sổ phía dưới.
 - + Nhập thông tin:
 - Carousel: 1 hoặc 2 tùy theo để mẫu vào khay nạp mẫu 1 hay 2.
 - Possition: là vị trí đặt typ trên Carousel.
 - ID1: PNH HC.
 - ID2: họ tên người bệnh.
 - + Bấm nút Play để chạy.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Dựa trên 3 vùng tế bào để phân tích:

+ Nếu >95% tế bào hồng cầu nằm ở vùng III → không thiếu hụt CD55, CD59.

+ Nếu có >5% tế bào hồng cầu nằm ở vùng II hoặc vùng I → có thiếu hụt CD55 hoặc CD59 hoặc cả 2. Lúc này cần ghi cụ thể tỷ lệ % hồng cầu loại I, loại II và loại III.

– Rửa và tắt máy theo quy trình riêng

+ Đặt theo thứ tự các vị trí từ 1 đến 4 trên carousel các ống: 1 ống Bleach + 3 ống nước cất.

+ Vào phần Common → Clean → Kéo chương trình Clean xuống → Nhập số của carousel → Play.

+ Khi máy rửa xong, nhắc 4 ống ra, đặt 2 ống đen vào vị trí 1, 2. Bơm nước đầy vào phần dưới của 2 ống, đậy nắp lại.

+ Trên màn hình, bấm vào biểu tượng “zzz” sau đó bấm tiếp vào biểu tượng hình 2 ống đen. Khi ở phía dưới màn hình hiện “Press idol mode...” thì tắt máy.

+ Tắt hết chương trình → FC OFF → Tắt máy tính.

KHÁNG THỂ KHÁNG CARDIOLIPIN (ANTI-CARDIOLIPIN) BẰNG KỸ THUẬT ELISA

I. NGUYÊN LÝ

Kháng nguyên được gắn sẵn trong giếng sẽ kết hợp với kháng thể đặc hiệu IgG/IgM (nếu có) trong huyết thanh người bệnh tạo nên phức hợp kháng nguyên -kháng thể khi ủ. Sau khi rửa sạch, phức hợp này sẽ được gắn tiếp với kháng thể kháng globulin miễn dịch người (anti IgG/IgM) đã kết hợp sẵn enzym peroxidase. Sau khi rửa, lượng enzym gắn với phức hợp này được giữ lại trong giếng. Khi cho cơ chất TMB/H₂O₂, enzym sẽ xúc tác phản ứng tạo màu xanh lá cây, sau khi cho acid, màu xanh sẽ chuyển sang màu vàng. Đo OD ở bước sóng 450/620nm để đọc kết quả.

II. CHỈ ĐỊNH

- Nghi ngờ hội chứng anti - phospholipid.
- Bệnh hệ thống.
- Có biểu hiện tắc mạch.
- Hay tái phát sảy thai, thai chết lưu.
- Xét nghiệm APTT kéo dài.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Phương tiện - hoá chất

- Trang thiết bị: máy rửa ELISA, máy đọc phiên ELISA, máy ly tâm.
- Hóa chất: kit ELISA anti-cardiolipin, nước cất.
- Vật tư tiêu hao: giấy thấm, găng tay, mũ, khẩu trang.

2. Bệnh phẩm

- Lấy 2ml máu không chống đông ghi rõ thông tin người bệnh: tên, tuổi, số giường, khoa phòng, khớp với thông tin trên phiếu chỉ định.
- Ly tâm ống máu 3.000 vòng/2 phút để huyết thanh người bệnh tách hoàn toàn, huyết thanh không được để vỡ hồng cầu.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

- Để hóa chất ra nhiệt độ phòng 30 phút trước khi làm xét nghiệm.

- Pha dung dịch rửa với nước cất tỉ lệ 1:50.
- Pha loãng dung dịch Sample Buffer 5x với nước cất tỉ lệ 1:5.
- Pha loãng HTBN với buffer đã pha loãng trên theo tỷ lệ 1:101.
- Tính toán số giếng:
12 giếng chứng (6 chứng IgM, 6 chứng IgG) + số BN x 2 (1 IgM, 1 IgG)

	1(IgG)	2(IgM)	3(IgG)	4(IgM)	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CalA	CalA	Mẫu3	Mẫu3								
B	CalB	CalB	Mẫu4	Mẫu4								
C	CalC	CalC	Mẫu5	Mẫu5								
D	CalD	CalD								
E	CalE	CalE										
F	CalF	CalF										
G	Mẫu1	Mẫu1										
H	Mẫu2	Mẫu2										

- Nhỏ 100µl Calibrators A→F và 100µl huyết thanh người bệnh theo bảng trên.
- Ủ tối ở RT 30 phút.
- Rửa 300µl Wash buffer 1x mỗi giếng, rửa 3 lần, (vẩy sạch lại trên giấy thấm).
- Nhỏ 100µl Conjugates IgG/IgM, ủ tối ở RT 30 phút.
- Rửa 300µl Wash buffer 1x mỗi giếng, rửa 3 lần, (vẩy sạch lại trên giấy thấm).
- Nhỏ 100µl Substrate, ủ tối ở RT 30 phút.
- Nhỏ 100µl Stop. Để 5 phút đem đọc kết quả.
- Đo OD ở bước sóng đôi 540/620nm trong vòng 30 phút tới khi nhỏ Stop.

Nhập số liệu để tính toán ra nồng độ anti Cardiolipin (IgG/IgM) dựa trên đường chuẩn thiết lập bởi OD và nồng độ chuẩn của 6 CAL A→F (IgG/IgM).

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

	Bình thường	Nghi ngờ	Dương tính
IgG	< 12 GPL/ml	12-18 GPL/ml	>18 GPL/ml
IgM	< 12 MPL/ml	12-18 MPL/ml	>18 MPL/ml

DIỆN DI MIỄN DỊCH TRÊN MÁY CAPILLARY2

I. NGUYÊN LÝ

Trong môi trường pH kiềm, các phân tử protein tích điện âm sẽ di chuyển về cực dương dưới tác dụng của dòng điện một chiều. Các protein đơn dòng trong huyết thanh (KN) sẽ kết hợp với các kháng thể kháng globulin đơn dòng, tạo nên hình ảnh mất đỉnh đơn dòng so với hình ảnh tham chiếu. Dựa vào sự mất đỉnh này sẽ xác định được globulin đơn dòng đó thuộc typ Ig nào.

II. CHỈ ĐỊNH

- Đau tủy xương.
- Tăng gama - globulin.
- Lơ xê mi kinh dòng lympho, u lympho.
- Bệnh hệ thống.

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

1. Phương tiện - hoá chất

- Trang thiết bị: máy điện di mao quản Capillary2, máy ly tâm, pipet, que thủy tinh.
- Hóa chất: dung dịch đệm, segment hóa chất (chứa KT kháng globulin đơn dòng), nước cất.
- Vật tư tiêu hao: giấy thấm, găng tay, mũ, khẩu trang.

2. Bệnh phẩm

- Lấy 3ml máu không chống đông ghi rõ thông tin người bệnh: tên, tuổi, số giường, khoa phòng, khớp với thông tin trên phiếu chỉ định.
- Ly tâm ống máu 3000 vòng/2 phút để HTBN tách hoàn toàn.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Khởi động máy

- Bật máy tính và máy Sebia, chọn chương trình PHORESIS.

- Nhập Password: SEBIA rồi CAPILLARY STATUS WINDOW, chờ máy khởi động khoảng 20 phút Ready.
- Chọn chương trình: vào cửa sổ SELECT PROGRAM (góc trên phải) chọn IMMUNOTYPING 6→OK.
- Khi Status hiện Ready, thay hóa chất: vào “*Replace containers*”.
 - + Đổ bình nước thải.
 - + Thay bình Wash solution, bình dung dịch đệm (Buffer), nhập các thông tin yêu cầu→OK.

2. Chạy điện di

- Để bệnh phẩm ở vị trí số 1 trên Rack kèm theo segment hóa chất bên cạnh, từ từ đẩy Rack vào bên trong.
- Máy chạy 15 phút sau cho ra kết quả.
- Nhập thông tin người bệnh: họ tên, tuổi, chẩn đoán, số giường, khoa phòng.
- Kích đúp vào dòng thông tin người bệnh để xem lại kết quả, bấm vào mục SEE IT để xem toàn bộ kết quả của 1 người bệnh, rồi chọn lệnh in.

3. Rửa máy

- Thay lại bình Buffer bằng bình nước cất để rửa máy: dùng Rack 100.
- Rửa cuối ngày: rửa kim hút bệnh phẩm: để ống Bleach ở vị trí 1 của rack 100 + 1 segment trắng, đẩy rack vào, khi hiện cửa sổ lệnh thì chọn “Launch the probe cleaning (chlorinated sodium hypochlorite solution or CDT wash solution)” → OK. Đợi 15 phút.
- Rửa cuối tuần: rửa các ống mao quản: để 2 ống enzym ở vị trí 1 và 8 của Rack 100 + 1 segment trắng, từ từ đẩy Rack vào, rồi chọn “*Launch the CAPICLEAN cleaning*”. Đợi khoảng 40 phút.

4. Tắt máy

- Vào Replace containers thay bằng 3 bình nước cất.
- Trên màn hình chọn: Capillarys → Special cycles → Shutdown with distilled water into the 3 containers to rinse the system. Khi hiện câu lệnh: “This special shutdown procedure requires the replacement of the reagents with H₂O. Do you want to continue?” → OK.

– Sau khoảng 20 phút, màn hình hiện “*Ready for shutdown*” thì tắt máy điện di và máy tính.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

– Đỉnh gama globulin đơn dòng: đỉnh nhọn, chân hẹp.
– Dựa vào hình ảnh đỉnh đơn dòng mất đi ở những ô kết quả nào thì đọc kết quả Ig ở ô đó. Ví dụ, mất đỉnh ở ô IgG và Kappa thì kết luận đỉnh gama globulin đơn dòng là IgG-K.

VII. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

– Hành chính: nhầm bệnh phẩm, vỡ hồng cầu.
– Hóa chất: segment hóa chất bị khô, có bọt khí, hóa chất hết hạn.
– Người làm xét nghiệm: sai sót trong quá trình chạy điện di, nhập thông tin nhầm.

PHÂN LOẠI MIỄN DỊCH BẰNG KỸ THUẬT FLOW CYTOMETRY TRÊN MÁY CYTOMIC FC500

I. NGUYÊN LÝ

Trên bề mặt tế bào có các dấu ấn đặc trưng cho từng dòng tế bào, từng giai đoạn phát triển của tế bào. Để phát hiện các dấu ấn đặc trưng này người ta dùng kháng thể đơn dòng gắn huỳnh quang kháng đặc hiệu với các dấu ấn cần phát hiện.

Kỹ thuật flow cytometry dựa trên nguyên lý phân tích đồng thời nhiều tín hiệu huỳnh quang và quang học của từng tế bào đơn lẻ. Dựa trên kháng thể đơn dòng gắn huỳnh quang và kỹ thuật flow cytometry, chúng ta có thể phát hiện sự có mặt hoặc mất đi các dấu ấn đặc trưng trên quần thể các tế bào ung thư. Căn cứ vào các dấu ấn đặc trưng đó người ta có thể xếp thể tế bào ung thư máu, góp phần chẩn đoán và tiên lượng bệnh tốt hơn.

II. CHỈ ĐỊNH

Các người bệnh lơ xê mi kinh, lơ xê mi cấp

III. CHỐNG CHỈ ĐỊNH

Không có chống chỉ định.

IV. CHUẨN BỊ

- Máy flow cytometry, đã cài đặt chương trình xếp loại miễn dịch.
- Pipet các loại 1ml, 10-50ul, 50-200ul.
- Các ống nghiệm kích thước 12x70mm dùng cho máy flow cytometry.
- Dung dịch chạy máy (Flow sheat).
- Dung dịch rửa máy (ISO Clenz).
- Dung dịch ly giải hồng cầu (Optimice C).
- Các kháng thể kháng CD5, CD3, CD13, CD14, CD33, CD34, HLA-DR gắn chất màu huỳnh quang PE.
- CD45 gắn chất màu huỳnh quang ECD.

– CD19, CD7, CD10, CD71, MPO, CD8, CD15, CD20 gắn chất màu huỳnh quang FITC.

V. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

1. Chuẩn bị máy flow cytometry

- Kiểm tra bình chứa dung dịch chạy máy, dung dịch rửa máy, nếu cần bổ sung thêm các dịch vào bình chứa.
- Kiểm tra bình chứa nước thải, nếu đầy đổ bỏ nước thải, vặn chặt các nắp bình chứa.
- Bật máy flow cytometry.
- Chạy chuẩn hóa máy bằng ống Flow Check, nếu máy ổn định sẽ tiếp tục làm.

2. Chuẩn bị panel kháng thể

- Lấy 7 ống flow cytometry 12x70mm, đánh dấu từ 1-7.
- Cho vào ống 20ul dung dịch kháng thể các loại (mỗi ống 3 kháng thể) theo sơ đồ sau:

Ống #	PE	FITC	ECD
1	CD3	CD19	CD45
2	CD5	CD7	CD45
3	CD34	CD10	CD45
4	CD13	CD15	CD45
5	CD33	CD20	CD45
6	CD14	CD71	CD45
7	HLA-DR	CD8	CD45

3. Chuẩn bị mẫu

- Mẫu dịch hút tủy xương /máu chống đông EDTA, phải được bảo quản 4-8°C và phân tích trong vòng 24 giờ.
- Rửa tế bào:
 - + Lấy 1ml mẫu vào ống Falcon 15ml (nhớ ghi tên người bệnh lên ống Falcon).
 - + Thêm 9ml PBS, trộn đều.
 - + Ly tâm rửa 1.500 vòng /phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.
 - + Hút bỏ dịch nổi, tái huyền dịch cặn tế bào trong 10ml dung dịch PBS.
 - + Lặp lại quy trình rửa tế bào 03 lần.

- Ly giải hồng cầu:
 - + Sau lần ly tâm rửa lần 3, thêm vào cặn tế bào 5ml dung dịch ly giải hồng cầu.
 - + Trộn đều huyền dịch tế bào, để 10 phút ở nhiệt độ phòng.
- Rửa sau ly giải hồng cầu.
 - + Sau 10 phút ủ, lặp lại bước rửa tế bào như trên.
 - + Sau rửa, tái huyền dịch tế bào trong 1ml dung dịch PBS.
 - + Đếm số lượng bạch cầu trong huyền dịch, nếu cần, pha loãng huyền dịch bằng dung dịch PBS để đạt nồng độ tế bào khoảng 5-10 G/L.

4. Ủ mẫu

- Lấy 7 ống kháng thể đã chuẩn bị ở bước trên (dùng cho 1 mẫu phân tích).
- Ghi tên người bệnh lên các ống này.
- Thêm vào mỗi ống 100ul huyền dịch tế bào (5-10G/L).
- Vortex các ống trên.
- Ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng, tránh ánh sáng.

5. Rửa sau ủ kháng thể

- Thêm vào mỗi ống 3ml dung dịch PBS, vortex đều, ly tâm rửa 1500 vòng /phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Loại bỏ dịch nổi, tái huyền dịch cặn tế bào trong 3 ml dung dịch PBS, lặp lại bước rửa ly tâm trên 3 lần.
- Tái huyền dịch cặn tế bào trong 1ml PBS.

6. Phân tích trên máy flow cytometry

- Vào chương trình Phân loại miễn dịch đã lập sẵn trong máy với 3 thông số màu Log-PE, Log-FITC, Log-ECD.
- Lấy chương trình phân tích panel 7 ống như đã chuẩn bị.
- Nhập ID người bệnh, tên người bệnh, nhập tên CD cho mỗi ống.
- Chạy chương trình phân tích mẫu.

VI. NHẬN ĐỊNH KẾT QUẢ

- Dựa trên chương trình đã lập, xác định quần thể blast, xác định tính chất dương tính với từng CD. Xác định dòng tế bào ung thư.