

Số: 117./CT-BVNTW

Hà Nội, ngày 31 tháng 12 năm 2024

CHỈ THỊ

V/v: Thực hiện Quy trình kỹ thuật xét nghiệm tại Bệnh viện Nhi Trung ương

Để thống nhất việc thực hiện một số quy trình kỹ thuật xét nghiệm thuộc Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Nhi Trung ương, Bệnh viện đã xây dựng và ban hành một số quy trình sau:

1. Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết (mã: QTXN.GP.31.2);
2. Hướng dẫn quy trình nhuộm Giemsa trên mảnh cắt mô phát hiện HP (mã: QTXN.GP.15.2);
3. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Hóa mô miễn dịch cho mỗi một dấu ấn (mã: QTXN.GP.16.2);
4. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Periodic acid Schiff (PAS) (mã: QTXN.GP.17.2);
5. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm ba màu (Trichrome) (mã: QTXN.GP.19.2);
6. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Gomori cho sợi võng (Nhuộm Bạc) (mã: QTXN.GP.20.2);
7. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Grocott (mã: QTXN.GP.21.2);
8. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm Sắt (mã: QTXN.GP.23.2);
9. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên (mã: QTXN.GP.26.2);
10. Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về xét nghiệm sinh thiết tức thì bằng cắt lạnh (mã: QTXN.GP.5.2);
11. Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu (CISH) (mã: QTXN.GP.29.2);
12. Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về chọc hút kim nhỏ (mã: QTXN.GP.1.2);
13. Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về nhuộm Giemsa trên phiến đồ (mã: QTXN.GP.2.2);
14. Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về nhuộm Diff-Quick (mã: QTXN.GP.3.2);
15. Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về khối tế bào (cell block) (mã: QTXN.GP.13.2);



16. Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về nhuộm hai màu Hematoxylin-Eosin trên mô (mã: QTXN.GP.14.2).

(xin xem file đính kèm)

Ban Giám đốc yêu cầu các đơn vị trong Bệnh viện thực hiện đúng các Quy trình kỹ thuật trên.

Chi thị này có hiệu lực kể từ ngày ký. 

Nơi nhận:

- Tất cả khoa/phòng/Trung tâm
- Lưu: V.thư; P.KHTH. (02)

GIÁM ĐỐC 
K/T GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

Cao Việt Tùng


BỆNH VIỆN
NHI
TRUNG ƯƠNG

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH XÉT NGHIỆM
MÔ BỆNH HỌC THƯỜNG QUY CỐ ĐỊNH, CHUYÊN,
ĐÚC, CẮT, NHUỘM CÁC BỆNH PHẨM SINH THIẾT
QTXN.GP.31.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Phan Thị Huyền	NV QLCL Khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc Bệnh viện	

Hà Nội – 2024

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 2 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	01/10/2023	Bản mới
2	31/12/2024	Người xem xét, phê duyệt

Phân phối:

Khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 3 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Hướng dẫn các bước thực hiện quy trình xét nghiệm mô bệnh học đối với bệnh phẩm mô. Đây là kỹ thuật được sử dụng thường quy trong chẩn đoán mô bệnh học nhằm đảm bảo hình thái cấu trúc mô và tế bào được thể hiện một cách rõ ràng, ổn định ở trạng thái gần giống nhất với mô ban đầu. Việc xử lý các mẫu mô đúng cách và đạt chất lượng cao có vai trò giúp cho việc chẩn đoán và phân loại bệnh được chính xác.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý:

Xét nghiệm mô bệnh học là xét nghiệm (XN) thực hiện trên mẫu bệnh phẩm (BP) là mô sau khi được lấy ra khỏi cơ thể.

Bệnh phẩm mô cần được cố định ngay trong dung dịch phù hợp để ngăn ngừa quá trình tự phân hủy, giúp ổn định mô, duy trì cấu trúc tế bào (trừ một số trường hợp cần mẫu tươi hoặc cần nghiên cứu về gen, enzym, nuôi cấy tế bào). Dung dịch cố định thường dùng là formalin đậm trung tính 10%.

Bệnh phẩm được phẫu tích, đánh giá đại thể và tiếp tục cố định cho đến khi đưa vào quá trình chuyển/xử lý mô gồm các bước: cố định – khử nước – làm sạch – ngấm nén (parafin). Sau đó, bệnh phẩm được đúc thành khối (block) nén, cắt thành lát mỏng dán lên tiêu bản và thực hiện các bước nhuộm Hematoxylin-Eosin để các thành phần của mô, tế bào có thể bắt màu đẹp, rõ nét nhất khi nhìn qua kính hiển vi (KHV) quang học.

1.3. Chữ viết tắt

- BP: Bệnh phẩm
- BS: Bác sĩ
- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- HE: Hematoxylin - Eosin
- KHV: Kính hiển vi
- KTY: Kỹ thuật y
- XN: Xét nghiệm
- QT: Quy trình
- NB: Người bệnh

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 4 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện: Nhân lực trực tiếp

- Bác sĩ: 01, đào tạo chuyên ngành Giải phẫu bệnh.
- Kỹ thuật y: 01, được đào tạo, theo vị trí phân công công việc cá nhân.
- Hộ lý: 01.

2.2. Hóa chất, dụng cụ, vật tư:

2.2.1. Hóa chất

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
Dung dịch formalin đậm trung tính 10%	ml	15-26°C
Dung dịch khử canxi (mô xương) - DD axit nitric HNO ₃ – formalin (đối với xương mật độ cứng) - DD axit chlohydric – formalin (mật độ xương trung bình) - DD axit trichloacetic – formalin (mật độ xương mềm, sinh thiết) - DD axit formic – formalin, DD EDTA - formalin (mật độ xương mềm, tủy xương)	ml	15-26°C, ánh sáng yếu
Mực nhuộm bệnh phẩm	ml	15-26°C
DD thay thế xylen (hoặc xylen)	ml	15-26°C
Cồn tuyệt đối	ml	15-26°C
Cồn 96 ⁰	ml	15-26°C
Cồn 70 ⁰	ml	15-26°C
DD Hematoxylin Mayer	ml	15-26°C
DD Eosin Y	ml	15-26°C
Nước cất	ml	15-26°C
DD gắn lamelle	ml	15-26°C
DD rửa tay	ml	15-26°C
DD khử khuẩn bề mặt	ml	15-26°C
Khử khuẩn Presept 2,5 gram	viên	15-26°C

2.2.2. Dụng cụ

- Dao phẫu tích.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 5 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

- Kẹp không mẫu các kích cỡ.
- Kéo, thước kẻ.
- Thớt nhựa sạch, phẳng.
- Dụng cụ lưới lọc bệnh phẩm.
- Bình thủy tinh đựng bệnh phẩm có nắp, dung tích 1000ml – 2000ml
- Các lọ thủy tinh dung tích 1000ml – 2000ml có nắp đậy và nhãn dán cho từng loại dung dịch (đối với chuyển tay).
- Cốc đong nhựa, cốc thủy tinh có chia ml dung tích 50 – 5000ml.
- Phễu nhựa, thìa nhựa.
- Que thủy tinh khuấy dung dịch.
- Pipet thủy tinh.
- Dụng cụ đựng cassette và hóa chất, giỏ đựng cassette theo máy xử lý mô.
- Khuôn inox đúc BP.
- khay đá.
- Que dàn bệnh phẩm.
- Giá gỗ, khay nhựa để tiêu bản.
- Bể nhuộm.
- Chậu inox.
- Thùng đựng rác thải các loại.

2.2.3. *Vật tư tiêu hao:*

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Khuôn nhựa (Cassette) có các kích thước lỗ khác nhau.
- Lam kính thường.
- Lamelle.
- Pipet nhựa.
- Lọ/hộp nhựa đựng bệnh phẩm có nắp, dung tích 50ml – 2000ml.
- Bông khô.
- Giấy bản dùng phẫu tích.
- Giấy nền.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 6 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

- Găng tay không bột tan.
- Khẩu trang y tế.
- Kính bảo vệ mắt.
- Quần áo bảo hộ.
- Hộp đựng rác thải sắc nhọn.
- Bút chì, bút dạ dầu.
- Giấy A4.
- Giấy in tem chống thấm nước, hóa chất.
- Giấy thấm tiêu bản.
- Giấy lau tay.
- Túi đựng rác thải các loại.

2.3. Trang thiết bị:

- Hệ thống bàn phẫu tích bệnh phẩm.
- Máy cưa xương.
- Máy xử lý mô tự động (máy chuyên).
- Máy đúc bệnh phẩm.
- Máy mài nén.
- Máy cắt vi phẫu (microtome).
- Máy nhuộm tiêu bản tự động.
- Bể cất lát dạng tròn (Bể dàn tiêu bản).
- Cân điện tử.
- Máy khuấy từ.
- Tủ ẩm.
- Tủ hút khí độc.
- Tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất.
- Tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2–8°C.
- Kính hiển vi quang học.
- Máy lọc nước RO 2 lần.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 7 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

– Loại mẫu BP: BP là mô được lấy ra khỏi cơ thể theo phương thức nội soi sinh thiết/sinh thiết mở/sinh thiết kim/phẫu thuật. BP có thể là mô tươi hoặc đã được để trong dung dịch cố định ban đầu (*Hướng dẫn cố định ban đầu bệnh phẩm mô HDCV.GP.4*).

– Tiêu chuẩn nhận mẫu BP (thể tích, số lượng, chất lượng) theo quy định trong *Cẩm nang hướng dẫn sử dụng dịch vụ xét nghiệm (ST.XN.4)*.

– Các hộp/lọ đựng bệnh phẩm được ghi số thứ tự tương ứng với số thứ tự trên phiếu chỉ định xét nghiệm.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

– Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.

– Có ghi loại dung dịch cố định và thời gian cố định BP (nếu có).

– Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

– Ghi ngày nhận mẫu vào phiếu, người bàn giao và người nhận.

– Mỗi phiếu XN được ghi số thứ tự tương ứng với số trên lọ/hộp đựng mẫu và ghi mã số GPB theo quy định.

– Đối chiếu chỉ định và mẫu BP: họ tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Tổng thời gian ước tính: 23 giờ.

– Thời gian thực hiện kỹ thuật: 22 giờ.

– Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 1 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Nhi Trung ương.

3. AN TOÀN

– Thực hiện bảo dưỡng, hiệu chuẩn trang thiết bị theo kế hoạch bảo dưỡng, hiệu chuẩn trang thiết bị hàng năm (BM1/QTQL.XN.19).

– Sử dụng hóa chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 8 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

– Áp dụng các biện pháp an toàn chung (an toàn về điện, phòng cháy chữa cháy, an toàn hóa chất, an toàn sinh học) khi xử lý mẫu và thực hiện xét nghiệm theo *Sổ tay hướng dẫn an toàn phòng xét nghiệm (ST.XN.2)*.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện:

Bước	Nội dung	Trách nhiệm
4.1.1	Cố định ban đầu BP: Bệnh phẩm đặt trong dung dịch cố định formalin trung tính 10%. Thời gian cố định, thể tích dung dịch cố định tùy thuộc thể tích toàn bộ mẫu mô (<i>Hướng dẫn cố định ban đầu bệnh phẩm mô HDCV.GP.4</i>).	NV được phân công
4.1.2	Phẫu tích BP: Mô tả đại thể mẫu bệnh phẩm và cắt lọc BP đảm bảo lấy đúng, đủ mẫu (<i>Hướng dẫn phẫu tích bệnh phẩm HDCV.GP.5</i>) Quy định chung: - Thực hiện phẫu tích lần lượt đối với bệnh phẩm của từng bệnh nhân, theo từng vị trí (nếu có) - Đọc từng ca theo thứ tự bệnh phẩm và phiếu chỉ định. Đối chiếu họ tên bệnh nhân, mã y tế (3 số cuối), mã SID, vị trí sinh thiết. - Đọc chẩn đoán lâm sàng - Đọc và ghi lại các mô tả đại thể, số mảnh (nếu cần) - Khi thực hiện phẫu tích, nếu thấy có sự không phù hợp về mẫu cần báo ngay cho BS lâm sàng và lãnh đạo khoa. Ghi vào <i>Phiếu báo cáo sự không phù hợp BMI/QTQL.XN.22</i> .	BS, KTY
4.1.3	Xử lý BP qua các bước: cố định – khử nước – làm sạch – ngâm nén. Có thể dùng máy chuyển bệnh phẩm tự động hoặc chuyển bằng tay, thời gian của từng bước tùy thuộc thể tích toàn bộ mẫu (<i>Hướng dẫn xử lý bệnh phẩm mô HDCV.GP.6</i>) Quy trình chuyển bệnh phẩm khác nhau tùy loại mẫu: + Đối với những mẫu sinh thiết nhỏ , mảnh (đường kính ~1mm) như mẫu sinh thiết kim (u, gan, thận), sinh thiết dạ dày, thời gian chuyển từ 3-4 giờ. + Đối với các mẫu mô lớn có độ dày ~3mm, thời gian chuyển từ 15-17 giờ. - Với những mẫu sinh thiết nhỏ bệnh phẩm phải được	KTY

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 9 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

	cố định trong formalin tốt. Nếu chưa được cố định cần cố định trước khi chuyển ít nhất 2 giờ.	
4.1.4	Đúc khối nền/parafin: <i>Hướng dẫn đúc khối nền BP HDCV.GP.7.</i>	KTY
4.1.5	Cắt mẫu nền BP: Sau khi đúc, khối nền sẽ được cắt theo <i>Hướng dẫn cắt mẫu nền bệnh phẩm HDCV.GP.8.</i>	KTY
4.1.6	Nhuộm HE: Tiêu bản sau khi cắt được để khô trong tủ ẩm 60°C trong 60 phút và nhuộm HE theo <i>Quy trình nhuộm Hematoxylin – Eosin trên mô (QTXN.GP.14)</i>	KTY
4.1.7	Hoàn thiện và bàn giao tiêu bản theo <i>Quy trình hoàn thiện và bàn giao tiêu bản (QTQL.GP.5):</i> - KTY đánh giá chất lượng tiêu bản trước khi bàn giao theo - Bàn giao tiêu bản và ghi chép vào các sổ (biểu mẫu).	KTY, BS

4.2. Nhận định kết quả

– KTY đánh giá chất lượng tiêu bản (mẫu chứng và mẫu bệnh) trước khi bàn giao cho BS.

– Phiên giải và báo cáo kết quả: Bác sĩ thực hiện đánh giá, phân tích hình ảnh trên tiêu bản nhuộm HE (và tiêu bản nhuộm khác, nếu có) dưới kính hiển vi. Đồng thời kết hợp với thông tin lâm sàng, cận lâm sàng khác để đưa ra kết quả chẩn đoán trong báo cáo kết quả trên phần mềm và bản giấy. Xem *Quy trình báo cáo kết quả (QTQL.GP.7)*.

+ **Đối với mẫu sinh thiết dạ dày nội soi:** Đánh giá theo Phân loại viêm dạ dày của hệ thống Sydney 1994.

+ **Đối với các mẫu khác:** Đánh giá theo các tiêu chuẩn chẩn đoán đối với từng loại tổn thương.

– Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường. Trường hợp đặc biệt khó chẩn đoán cần có sự hội chẩn của lãnh đạo khoa và/hoặc các chuyên gia, chỉ định thêm các xét nghiệm đặc biệt để hỗ trợ chẩn đoán.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

– Trả kết quả theo *Quy trình công bố và trả kết quả (QTQL.GP.8)*. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

– Lưu khối nền và tiêu bản theo *Quy trình lưu và hủy mẫu*

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 10 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

(QTQL.GP.6)theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Mẫu BP không ngâm formalin/ không ngập BP	Nhân viên khoa lâm sàng đổ dung dịch cố định không đủ/ không đổ dung dịch cố định vào BP	- Tiếp tục xử lý mẫu.Ghi nhận, nhắc nhở và theo dõi.
Nhầm lẫn mẫu của NB này với NB khác	- Nhân viên giao mẫu không kiểm tra trước khi giao mẫu - Nhân viên tiếp nhận chưa thực hiện đúng QT tiếp nhận mẫu.	- Từ chối mẫu, ghi báo cáo sự không phù hợp. - Trao đổi với bác sĩ lâm sàng để tìm đúng NB và chỉ định lại XN.
Cấp sai mã GPB trên hệ thống phần mềm	Nhân viên không thực hiện đối chiếu khi cấp mã.	- Cấp lại đúng mã GPB - Đối chiếu giữa phiếu chỉ định và trên phần mềm trước khi lưu.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Mô tả đại thể sơ sai, thiếu thông tin	BS phẫu tích chưa có đủ kinh nghiệm	Xem xét lại BP, mô tả bổ sung. Đào tạo và kiểm tra độ thành thạo BS định kỳ.
Không chụp ảnh BP và tổn thương	BS không nắm được quy trình và/hoặc chưa có đủ kinh nghiệm	Xem xét lại BP còn lưu và bổ sung những thông tin còn thiếu. Đào tạo và kiểm tra độ thành thạo BS định kỳ.
Không đánh dấu diện phẫu thuật với BP một khối và nghi ngờ ác tính	BS không nắm được quy trình và/hoặc chưa có đủ kinh nghiệm	Xem xét lại BP lưu và cách phẫu tích để định hướng diện cắt (nếu có thể). Đào tạo và kiểm tra độ thành thạo BS định kỳ.
Lấy không đúng, không đủ tổn thương và vùng liên quan	BS không nắm được quy trình và/hoặc chưa có đủ kinh nghiệm	Xem xét lại BP lưu, lấy bổ sung mảnh cắt (nếu cần). Đào tạo và kiểm tra độ thành thạo BS định kỳ.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 11 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

Lát cắt quá dày/mỏng hoặc quá lớn	BS không nắm được quy trình và/hoặc chưa có đủ kinh nghiệm	Chuyển lại BP hoặc phẫu tích thêm BP (nếu còn)
Không gói các BP nhỏ gây thất lạc BP trong quá trình chuyển	BS không nắm được quy trình và/hoặc chưa có đủ kinh nghiệm	Trao đổi với BS lâm sàng, cân nhắc lấy thêm BP nếu không đủ BP để chẩn đoán
Làm dập nát BP	BS sử dụng panh kẹp có mẫu hoặc thao tác quá thô bạo	Quan sát các block còn lại (nếu có) hoặc phẫu tích thêm BP (nếu còn).
Dính các mảnh vụn sang BP khác	BS không lau rửa dụng cụ sau khi phẫu tích xong một BP	Quan sát đối chiếu mô trên KHV và loại bỏ các mảnh BP artifact nếu phát hiện
KTY ghi chép thông tin mô tả không đúng hoặc không đầy đủ	KTY chưa nắm được quy trình và/hoặc chưa có đủ kinh nghiệm	Xem xét lại BP, mô tả bổ sung. Đào tạo và kiểm tra độ thành thạo KTV định kỳ.
Không ghi chú mã GPB, số block và thông tin cần thiết vào block	KTV chưa nắm được quy trình và/hoặc chủ quan khi làm việc	Xem xét lại BP và quá trình phẫu tích sắp xếp lại BP. Đào tạo và kiểm tra độ thành thạo KTV định kỳ.
Đậy nắp cassette không chặt	KTV chưa nắm được quy trình và/hoặc chủ quan khi làm việc	Tìm kiếm BP nếu thất lạc. Trao đổi với BS lâm sàng, cân nhắc lấy thêm BP nếu không đủ BP để chẩn đoán
Mẫu BP bị thoái hóa, hoại tử, sống.	Nồng độ dung dịch cố định thấp không đúng tỷ lệ. Thời gian cố định không đủ.	- Sử dụng đúng nồng độ dd cố định, đủ thể tích. - Đảm bảo đúng nồng độ dung và thời gian cố định
Mẫu BP bị cứng	- Nồng độ formalin bị cao, thời gian cố định quá lâu. - Trong quá trình xử lý mẫu thời gian trong xylen lâu, parafin nhiệt độ quá cao.	- Kiểm tra hóa chất trước khi cố định. - Kiểm tra quy trình xử lý về thời gian, nhiệt độ trước khi chạy mẫu.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 12 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

Mẫu BP còn nước sau QT chuyển.	Quá trình xử lý mẫu chưa đảm bảo.	- Đảm bảo hóa chất tuân thủ lịch thay thế bổ sung. - Tuân thủ quá trình xử lý mẫu đúng với mỗi loại BP.
Đúc BP không đúng chiều/ mặt không phẳng/ viền trắng quanh BP	- Khi đúc đặt sai mặt cắt của BP, không làm phẳng mặt cắt khi đúc. - Nhiệt độ của paraffin và bệnh phẩm bị chênh lệch, cát sét bị nhiễm nước	- Để tan nén, xác định đúng mặt cắt và đúc lại. - Để bệnh phẩm và nén đồng đều về nhiệt độ, lau cát sét trước khi đúc.
Cắt quá dày/mỏng/lát cắt không đều	- Thao tác của nhân viên chưa đúng. - Dao cắt cùn, xước. - Máy cắt không đảm bảo rung, bộ phận chỉnh độ dày không chính xác. - Nhiệt độ phòng không đảm bảo.	- Đào tạo nhân viên tuân thủ đúng hướng dẫn sử dụng trang thiết bị. - Thay dao mới khi có hiện tượng dao cùn, xước rách. - Thực hiện bảo trì, bảo dưỡng, hiệu chuẩn máy đúng kế hoạch. - Đảm bảo nhiệt độ phòng ổn định không quá nóng.
Dính BP khác lên lam kính	Quá trình hót BP lên lam	- Cắt mẫu nào dán mẫu đó lên lam kính. - Đảm bảo bề dán mẫu không có mẫu mô trôi nổi khác. - Vệ sinh bề dán mẫu, thay mới nước trước mỗi lần cắt và thay khi bẩn.
Nhuộm tiêu bản không đạt: Nhân, bào tương nhạt/ đậm màu.	- Không tuân thủ quy trình nhuộm. - Hóa chất không đảm bảo	- Tuân thủ đúng quy trình nhuộm/ gắn - Thay hóa chất định kỳ
Tiêu bản ám nước/ có bọt khí	- Không khử hết nước trước khi gắn - Không đủ lượng bơm/đặt	- Tuân thủ thời gian loại nước. - Thay hóa chất loại nước,

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 13 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

	lamen lên tiêu bản không đều	gắn định kì.
Thiếu mẫu	- Bong một phần mẫu - Cắt chưa đủ thành	- Để tiêu bản khô hoàn toàn, cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn. - Cắt sơ bộ đến khi bằng mặt bệnh phẩm trước khi cắt lam nhuộm.

5.2. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bản giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bản giao tiêu bản
Báo cáo sai kết quả	Nhầm lẫn trong nhập kết quả	Đối chiếu cẩn thận kết quả trước khi trả.
Sai sót trong quy trình báo cáo và công bố kết quả	Nhân viên chưa nắm vững quy trình hoặc quy trình chưa rõ ràng.	Xem lại quy trình/Đào tạo nhân viên nắm rõ quy trình trước khi trả kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm kỹ thuật, nội kiểm kết quả theo *Quy trình nội kiểm tra chất lượng (QTQL.GP.4)*.

Xem xét kết quả nội kiểm: Nếu kết quả nội kiểm không đạt cần kiểm tra lại các điều kiện cơ bản của kỹ thuật và khắc phục. Chỉ thực hiện xét nghiệm khi kết quả nội kiểm đạt yêu cầu.

- Thực hiện chương trình ngoại kiểm/so sánh liên phòng.
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo.
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Thông tư số 01/2013/TT-BYT ngày 11/01/2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế, “Hướng dẫn thực hiện quản lý chất lượng xét nghiệm tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh”.
- Bộ Y tế, tháng 12 năm 2013, Quyết định số 5199/QĐ-BYT, "Hướng

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 14 trên 14
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.31.2
	Hướng dẫn quy trình xét nghiệm mô bệnh học thường quy cố định, chuyển, đúc, cắt, nhuộm các bệnh phẩm sinh thiết	31/12/2024

dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – tế bào học".

– Hoàng Ngọc Thạch. Đặc điểm mô bệnh học và phân loại viêm dạ dày mạn tính do *Helicobacter Pylori* ở trẻ em. Khoa Giải phẫu bệnh bệnh viện Nhi Trung ương

– Tasci ES, Akbas T (2020). The Relationship between the Sydney Classification and the First-Line Treatment Efficacy in *Helicobacter*-Associated Gastritis. Medical Principles and Practice, 29,551-557

– Park YH, Kim N (2015). Review of Atrophic Gastritis and Intestinal Metaplasia as a Premalignant Lesion of Gastric Cancer. Journal of Cancer Prevention, 20, 1, 25-40

– Sipponen P, Price AB (2010). The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. Gastroenterology and Hepatology, 1, 31-34

– Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD (2019). Theory and Practice of Histological Techniques. Elsevier, 8th edition.

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH NHUỘM GIEMSA
TRÊN MẢNH CẮT MÔ PHÁT HIỆN HP
QTXN.GP.15.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Trần Thị Kim Tiến	Kỹ thuật y Khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc bệnh viện	



Hà Nội – 2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	01/10/2023	Bản mới
2	31/12/2024	Người xem xét, phê duyệt

Phân phối:

Phòng xét nghiệm của khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này giúp cho nhân viên khoa Giải phẫu bệnh thực hiện được kỹ thuật nhuộm Giemsa trên mẫu parafin. Các thành phần trong mô bao gồm cả vi khuẩn *Helicobacter pylori* sẽ bắt màu đặc trưng khi nhuộm với thuốc nhuộm Giemsa từ đó giúp bác sĩ dễ phát hiện vi khuẩn và chẩn đoán.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Các vi khuẩn *Helicobacter pylori* trong mô dạ dày khi nhuộm với thuốc nhuộm giemsa sẽ bắt màu tím đỏ ở khe tuyến, vùng chất nhầy trên bề mặt biểu mô phủ dạ dày.

Chữ viết tắt:

- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- HE: Hematoxylin Eosin.
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- KHVQH: Kính hiển vi quang học
- HP: *Helicobacter Pylori*
- QLKT: Quản lý kỹ thuật
- QLCL: Quản lý chất lượng
- KTY: Kỹ thuật y
- NB: Người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ: 01, chuyên ngành Giải phẫu bệnh.
- Kỹ thuật y: 01, được đào tạo, theo vị trí phân công công việc cá nhân.
- Hộ lý: 01.

2.2. Vật tư:

2.2.1 Hóa chất:

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
Dung dịch (DD) thay thế xylen (hoặc xylen)	ml	15-26°C

Cồn tuyệt đối	ml	15-26°C
Cồn 96°	ml	15-26°C
Nước cất	ml	15-26°C
DD Giemsa Merck đậm đặc	ml	15-26°C
DD gắn lamelle	ml	15-26°C
DD rửa tay	ml	15-26°C
DD khử khuẩn bề mặt	ml	15-26°C

Pha hóa chất: Dung dịch Giemsa 15% gồm 15ml Giemsa Merck đậm đặc + 85ml nước cất. Lọc/ vớt bỏ váng ngay trước khi sử dụng.

2.2.2. Vật tư:

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường, lamelle.
- Pipet nhựa, que dãn bệnh phẩm, kẹp không máu các kích cỡ.
- Giá để tiêu bản, bể nhuộm, khay đá.
- Găng tay không bột tan, khẩu trang y tế.
- Giấy A4, giấy in tem chống thấm nước và hóa chất, giấy thấm tiêu bản, bút chì, bút dạ dầu.

2.3. Trang thiết bị

- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu), bể cắt lát dạng tròn.
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa, inox đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại), cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 20ml.
- KHVQH 1 đầu, KHVQH nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn ca bệnh
- Tủ lạnh có ngăn làm đá.
- Tủ ấm, tủ hút mùi hóa chất, tủ đựng hóa chất chống cháy lan, tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất.
- Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khối nén.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm: không áp dụng.

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm:

- Là mẫu nền cần nhuộm giemsa để đánh giá *Helicobacter pylori*. Mẫu

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 5 trên 9
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.15.2
	Hướng dẫn quy trình nhuộm Giemsa trên mảnh cắt mô phát hiện HP	31/12/2024

bệnh phẩm đã qua các công đoạn xử lý mô, đúc khối nền và cắt thành các lát mỏng độ dày từ 3-5 μ m. Xem *Hướng dẫn cắt mẫu nền bệnh phẩm (HDCV.GP.8)*.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.
- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.
- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Tổng thời gian ước tính: 5 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 0,5 giờ.
- Thời gian thực hiện: 3.5 giờ.
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 1 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương.

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện:

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 1	2 phút
2	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 2	2 phút
3	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 3	2 phút

4	Ngâm các tiêu bản vào cồn tuyệt đối tẩy nền	1 phút
5	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 ⁰ tẩy nền I	1 phút
6	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 ⁰ tẩy nền II	1 phút
7	Ngâm các tiêu bản vào bể nước chảy	5 phút
8	Nhuộm tiêu bản trong dung dịch giemsa 15%.	15 phút
9	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy,	2 phút
10	Để khô tiêu bản trong tủ ẩm 60°C	30 phút
11	Ngâm các tiêu bản vào DD xylen gắn bề 6	30 giây
12	Gắnlamelle	
13	Hoàn thiện và bàn giao tiêu bản	

Nhân viên khi thực hiện quy trình cần đánh dấu vào *Bảng kiểm quy trình nhuộm Giemsa trên mô phát hiện HP (BM1/QTXN.GP.15)* để kiểm soát các bước thực hiện.

4.2. Nhận định kết quả

Thực hiện nội kiểm kỹ thuật, nội kiểm kết quả theo *Quy trình nội kiểm tra chất lượng (QTQL.GP.4)*.

- Xem xét kết quả nội kiểm kỹ thuật: Nếu kết quả nội kiểm không đạt cần kiểm tra lại các điều kiện cơ bản của kỹ thuật và khắc phục. Chỉ thực hiện xét nghiệm khi kết quả nội kiểm đạt yêu cầu.

- Đọc kết quả và nhận định kết quả: Thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.

Tiêu chí đánh giá: Vi khuẩn HP: màu tím đỏ; Nền mô: màu xanh

- Phiên giải và báo cáo kết quả: Đánh giá mức độ nhiễm vi khuẩn HP theo Phân loại viêm dạ dày của hệ thống Sydney 1994:

+ HP âm tính: Không thấy vi khuẩn HP.

+ HP dương tính: Có vi khuẩn HP, mức độ (+)/(++)/(+++).

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường (nếu cần).

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo *Quy trình công bố và trả kết quả xét nghiệm (QTQL.GP.8)*. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

- Lưu khối nền và tiêu bản theo *Quy trình lưu trữ mẫu và hủy bệnh phẩm (QTQL.GP.6)* theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
- Nhầm mẫu của NB này với NB khác - Nhầm mẫu nền khác loại của cùng NB	- Kiểm tra thông tin trên hệ thống điện tử không chính xác (mã GPB, số thứ tự của khối nền) - Lấy nhầm khối nền - Ghi sai mã GPB sau khi cắt	- Đối chiếu lại thông tin: Mã y tế, mã GPB, số thứ tự khối nền - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm sau khi kiểm tra đúng thông tin của NB

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Mẫu chứng âm tính giả	Hóa chất hỏng, mẫu chứng hết, các bước thực hiện quy trình sai sót	- Kiểm tra và pha lại hóa chất, thay hóa chất định kì. - Tìm mẫu chứng mới làm test lại, tuân thủ đúng quy trình.
Tiêu bản chỉ được nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm	- Không ngập hóa chất. - Chưa tẩy hết nền trong mẫu.	- Đảm bảo lượng hóa chất đủ ngập lam. - Thay hóa chất tẩy nền định kì
Tiêu bản nhuộm nhạt màu	- Thuốc nhuộm pha chưa đúng nồng độ. - Thời gian nhuộm quá ngắn. - Rửa nước chảy quá lâu.	- Đảm bảo pha hóa chất đúng nồng độ quy định. - Tuân thủ quy trình kỹ thuật.
Tiêu bản nhuộm đậm màu	- Thuốc nhuộm pha quá đậm đặc. - Thời gian nhuộm quá lâu. - Rửa nước chảy quá ngắn.	- Đảm bảo pha hóa chất đúng nồng độ quy định. - Tuân thủ quy trình kỹ thuật.
Tiêu bản nhuộm có nhiều cặn bẩn	- Thời gian rửa nước chảy không đủ - Không hớt văng hóa chất trước khi nhuộm	- Tuân thủ đúng quy trình kỹ thuật.

Tiêu bản ám nước	Không khử hết nước trước khi gắn	Tuân thủ đúng thời gian loại nước. Thay hóa chất định kỳ
Thiếu mẫu	- Bong một phần mẫu - Cắt chưa đủ thành	- Để tiêu bản khô hoàn toàn, cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn. - Cắt sơ bộ đến khi bằng mặt bệnh phẩm trước khi cắt lam nhuộm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bản giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bản giao tiêu bản
Báo cáo sai kết quả	Nhầm lẫn trong nhập kết quả	Đối chiếu cẩn thận kết quả trước khi trả.
Không tuân thủ quy trình báo cáo và công bố kết quả	Nhân viên chưa được đào tạo và nắm vững quy trình.	Đào tạo nhân viên nắm rõ quy trình trước khi trả kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
- + Sử dụng mẫu chứng đã đánh giá chất lượng.
- + Nhuộm Giemsa trên mẫu chứng khi nhập, pha hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
- Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.
 - Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện đánh giá trên mẫu bệnh.
 - Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục và đánh giá lại. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
- Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng hoặc so sánh liên phòng.
 - Hiệu chuẩn và bảo dưỡng trang thiết bị định kỳ.
 - Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo.
 - Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 9 trên 9
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.15.2
	Hướng dẫn quy trình nhuộm Giemsa trên mảnh cắt mô phát hiện HP	31/12/2024

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ Y tế Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tế bào học
- Thông tư số 01/2013/TT-BYT ngày 11/01/2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế, “Hướng dẫn thực hiện quản lý chất lượng xét nghiệm tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh”.
- Hoàng Ngọc Thạch. Đặc điểm mô bệnh học và phân loại viêm dạ dày mạn tính do *Helicobacter Pylori* ở trẻ em. Khoa Giải phẫu bệnh bệnh viện Nhi Trung ương
- Tasci ES, Akbas T (2020). The Relationship between the Sydney Classification and the First-Line Treatment Efficacy in *Helicobacter*-Associated Gastritis. *Medical Principles and Practice*, 29,551-557
- Park YH, Kim N (2015). Review of Atrophic Gastritis and Intestinal Metaplasia as a Premalignant Lesion of Gastric Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 20, 1, 25-40
- Sipponen P, Price AB (2010). The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. *Gastroenterology and Hepatology*, 1, 31-34
- Jacquelyn B. Arington (1992). Gaffney’s one hour giemsa, *Laboratory methods in histopathology* – AFIP, p.212-213.

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT
VỀ NHUỘM HÓA MÔ MIỄN DỊCH
CHO MỖI MỘT DẤU ẤN
QTXN.GP.16.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Nguyễn Anh Văn	Bác sĩ khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc Bệnh viện	



Hà Nội – 2024

	BỘ Y TẾ	Trang 2 trên 11
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.16.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Hóa mô miễn dịch cho mỗi một dấu ấn	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/1/2022	Phiên bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật nội dung theo định dạng mới

Phân phối:

Phòng xét nghiệm của khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

	<i>BỘ Y TẾ</i>	<i>Trang 3 trên 11</i>
	<i>BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG</i>	<i>QTXN.GP.16.2</i>
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Hóa mô miễn dịch cho mỗi một dấu ấn</i>	<i>31/12/2024</i>

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này hướng dẫn cách thức cho nhân viên khoa Giải phẫu bệnh (GPB) thực hiện được kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch (HMMD) trên mẫu bệnh phẩm mô bằng máy nhuộm hóa mô Dako Autostainer Link 48 và thủ công.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Dựa trên sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên (KN) và kháng thể (KT) khuếch đại phức hợp và hiển thị màu. Khi phủ KT đặc hiệu lên mô nếu trong mô có KN cần tìm sẽ xảy ra phản ứng kết hợp KN-KT. Phức hợp KN-KT này được gắn với hệ thống nhận biết một cách trực tiếp hoặc gián tiếp và có thể quan sát dưới kính hiển vi quang học.

Chữ viết tắt:

- BS: Bác sĩ
- GPB: Giải phẫu bệnh
- KN: Kháng nguyên
- KT: Kháng thể
- KHV: Kính hiển vi
- KTV: Kỹ thuật viên
- QLCL: Quản lý chất lượng
- QLKT: Quản lý kỹ thuật
- HMMD: Hóa mô miễn dịch
- NV: Nhân viên
- NB: Người bệnh
- PBS: Dung dịch Envision Flex Wash Buffer

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

2.2. Vật tư:

2.2.1. Hóa chất: Hóa chất pha theo bảng: Tóm tắt quy trình nhuộm hóa mô miễn dịch (TT/QTXN.GP.16.2)

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
Kháng thể 1 (hãng Dako hoặc có thể hãng khác)	ml	2-8 ⁰ C
Kháng thể 2 (Envision Flex/ HRP SM 802)	ml	2-8 ⁰ C
Hiển thị màu DAB	ml	2-8 ⁰ C
Dung dịch đệm PBS	ml	2-8 ⁰ C
Dung dịch bọc lộ kháng nguyên (sử dụng 1 trong 2 loại) + Dung dịch Envision Flex target Retrieval solution high pH + Dung dịch Citrate buffer pH6	ml	2-8 ⁰ C
Dung dịch oxy già (H ₂ O ₂) 10%	ml	2-8 ⁰ C

2.2.2. Vật tư:

- Tiêu bản dính super frost plus, bàn hơi, que dán, giá đựng tiêu bản.
- Bút ghi nhãn, bút mờ.
- Tube pha kháng thể, đầu côn.
- Bể nhuộm bằng thủy tinh, khay làm ẩm.
- Bể thủy tinh đựng cồn, xylen.

2.3. Trang thiết bị:

- Micro pipet.
- Tủ lạnh, tủ ấm 37⁰C.
- Nồi bọc lộ kháng nguyên (PTlink hãng Dako) hoặc lò vi sóng .
- Máy nhuộm hóa mô Dako Autostainer Link 48.
- Tủ hút khí độc.
- Máy cắt tiêu bản.
- Kính hiển vi.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 5 trên 11
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.16.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Hóa mô miễn dịch cho mỗi một dấu ấn	31/12/2024

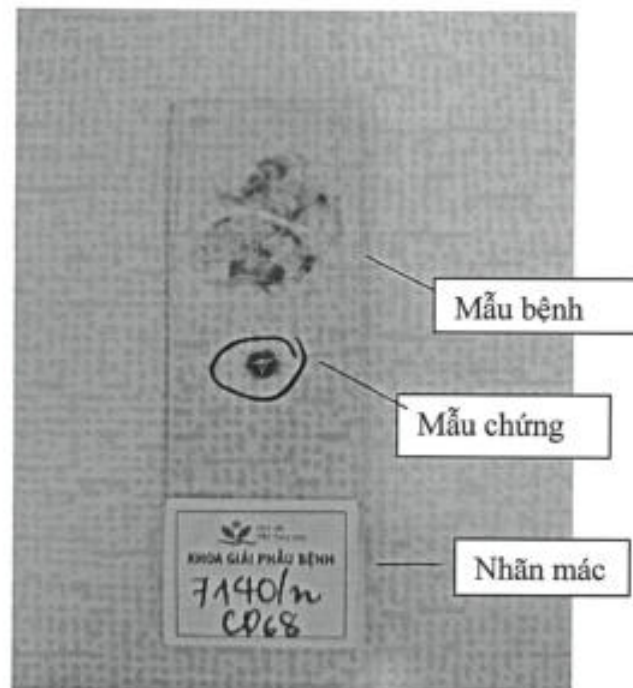
2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm: không áp dụng

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm:

Loại mẫu bệnh phẩm: Mẫu mô bệnh sau khi được xử lý qua các quy trình cố định, chuyển, đúc khối paraffin (bảo quản ở nhiệt độ phòng).

Cắt bệnh phẩm dày từ 3-4 μ m dán lên lam kính super frost plus đã ghi nhãn theo Hướng dẫn cắt mẫu nền bệnh phẩm (HDCV.GP.8.1) kèm mẫu chứng.

Mẫu chứng được cắt và dán trên lam kính theo mẫu sau:



Mẫu chứng: Khoanh tròn bằng bút màu đen

Nhãn: Dán ở vị trí màu trắng của lam kính

- Để tủ ẩm 40⁰C qua đêm, hoặc 56⁰C trong 1 giờ
- Tẩy paraffin
- Rửa nước chảy 5 phút, nước cất.
- Bảo quản mẫu khối nền ở nhiệt độ phòng

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.
- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.
- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	<i>BỘ Y TẾ</i>	<i>Trang 6 trên 11</i>
	<i>BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG</i>	<i>QTXN.GP.16.2</i>
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Hóa mô miễn dịch cho mỗi một dấu ấn</i>	<i>31/12/2024</i>

nghiệm.

- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ)

Tổng thời gian ước tính: 72 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 12 giờ.
- Thời gian nhuộm: 24 giờ.
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 36 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

4.1.1. Bộc lộ kháng nguyên (bộc lộ bằng 1 trong 2 cách sau):

A. Bộc lộ kháng nguyên bằng lò vi sóng:

- Cho 500ml dung dịch bộc lộ kháng nguyên vào bể nhựa có nắp
- Đặt giá tiêu bản vào bể nhựa sao cho dung dịch bộc lộ ngập lam hóa mô, đậy nắp lại.
- Quay vi sóng đến khi dung dịch sôi sủi nhẹ và để thời gian sôi nhẹ trong 15 phút.
- Lấy bể ra khỏi lò vi sóng, mở nắp, để nguội ở nhiệt độ phòng khoảng 20-30 phút

B. Bộc lộ kháng nguyên trong thiết bị bộc lộ PTlink (Hãng Dako, số seri: MY1936P495).

4.1.2. Tiếp tục quy trình nhuộm (nhuộm 1 trong 2 cách sau):

A. **Nhuộm thủ công:** theo bảng tóm tắt quy trình kỹ thuật về nhuộm hóa mô miễn dịch trên mô (TT/QTXN.GP.16.2)

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Khử protein nội sinh bằng H ₂ O ₂ 10% hoặc Envision Flex peroxidase – Blocking Reagent	5 phút
2	Rửa nước	2 phút
3	Rửa PBS 3 lần, mỗi lần 5 phút	15 phút
4	Phủ kháng thể 1	40 phút
5	Rửa PBS 3 lần, mỗi lần 5 phút	15 phút
6	Phủ kháng thể 2	30 phút
7	Rửa PBS 3 lần, mỗi lần 5 phút	15 phút
8	Phủ dung dịch hiển thị màu DAB	3 phút
9	Rửa nước chảy 5	5 phút
10	Nhuộm nhân bằng dung dịch hematoxylin	3 phút
11	Rửa nước	2 phút
12	Dội các tiêu bản bằng cồn 96 độ	5 giây
13	Ngâm các tiêu bản vào bể cồn 96 độ	30 giây
14	Ngâm các tiêu bản vào bể cồn tuyệt đối đầu tiên	30 giây
15	Ngâm các tiêu bản vào bể cồn tuyệt đối tiếp theo	30 giây
16	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 4	30 giây
17	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 5	30 giây
18	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 6	30 giây
19	Gắn lamen	
20	Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản	

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

B. Nhuộm máy(máy hóa mô miễn dịch Dako Autostainer Link 48)

Xem Hướng dẫn sử dụng máy nhuộm Hóa mô miễn dịch (HDCV.GP.29.1).

Bước	Nội dung
1	Khởi động chạy máy, mỗi nước
2	Bắt đầu chạy máy
3	Kết thúc chương trình ấn Done, lấy khay tiêu bản ra, cất khay hóa chất
4	Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản

4.2. Nhận định kết quả

- Nội kiểm tra đánh giá tiêu bản nhuộm chứng:
 - + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.
 - + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cất nhuộm lại từ đầu.
- Tiêu chí đánh giá:
 - + Nhân tế bào bắt màu xanh.
 - + Thành phần dương tính: có sự hiện diện của phức hợp KN-KT trên tế bào và mô, được hiển thị bằng màu vàng nâu.
 - + Thành phần âm tính: không có sự hiện diện của phức hợp KN-KT trên tế bào và mô, không được hiển thị bằng màu vàng nâu.
- Đọc kết quả và nhận định kết quả:
 - + Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học, đối chiếu với tiêu bản HE để đánh giá.
- Phiên giải và báo cáo kết quả: Báo cáo kết quả mẫu bệnh phẩm có dương tính hay âm tính.
- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: Bác sỹ đọc sẽ phối hợp đặc điểm mô học, kết quả nhuộm, thông tin lâm sàng, cận lâm sàng để phân tích và đánh giá kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình công bố và trả kết quả xét nghiệm

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	<i>Trang 9 trên 11</i>
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.16.2
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Hóa mô miễn dịch cho mỗi một dấu ấn</i>	<i>31/12/2024</i>

(QTQL.GP.8). Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

– Lưu khối nén và tiêu bản theo quy trình lưu trữ mẫu và hủy bệnh phẩm (QTQL.GP.6) theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Nhầm mẫu của NB này với NB khác Nhầm mẫu nén khác loại của cùng NB	- Kiểm tra thông tin trên hệ thống điện tử không chính xác (mã GPB, số thứ tự của khối nén). - Lấy nhầm khối nén. - Ghi sai mã GPB sau khi cắt.	- Đối chiếu lại thông tin: Mã y tế, mã GPB, số thứ tự khối nén. - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm sau khi kiểm tra đúng thông tin của NB

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Mẫu chứng âm tính	Hóa chất hỏng, mẫu chứng hết, các bước thực hiện quy trình sai sót.	Kiểm tra và pha lại hóa chất, tìm mẫu chứng mới làm test lại, tuân thủ đúng quy trình.
Tiêu bản chỉ được nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm	- Mẫu cắt mất mô do kỹ thuật cắt hoặc do máy cắt, dao cắt. Tiêu bản bị bóng nước, tiêu bản nhuộm chưa khô, cắt mẫu trên lam thường. Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm- Không khử hết nước trước khi gắn. - Không đủ lượng	- Dựa vào nguyên nhân để loại bỏ các yếu tố ảnh hưởng. Khi thấy trên mẫu bệnh phẩm có bóng nước cần loại bỏ bóng, bọt khí, để tiêu bản khô hoàn toàn, cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn. Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được để trong hệ

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	<i>Trang 10 trên 11</i>
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.16.2
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Hóa mô miễn dịch cho mỗi một dấu ấn</i>	<i>31/12/2024</i>

	bơm/đặt lamên lên tiêu bản không đều.	thống kín gió. - Thay hóa chất định kỳ.
Tiêu bản ám nước	Không khử hết nước trước khi gắn.	Tuân thủ đúng thời gian loại nước. Thay hóa chất định kỳ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bản giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình.	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bản giao tiêu bản.
Đọc kết quả	- Đọc nhầm tiêu bản - Kết luận nhầm	- Kiểm tra lại tiêu bản. - Đọc lại và sửa đổi kết quả.
Báo cáo kết quả	- Nhầm lẫn giữa các phiếu chỉ định. - Nhầm tên NB	- Kiểm tra lại thông tin NB. - Kiểm tra lại phiếu trả kết quả. - Thông báo ngay tới bác sĩ lâm sàng và NB để trả lại kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
 - + Sử dụng mẫu chứng dương đã đánh giá chất lượng
 - + Nhuộm HMMD trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
 Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.
 - Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện đánh giá trên mẫu bệnh.
 - Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục và đánh giá lại. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
- Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng hoặc so sánh liên phòng
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 11 trên 11
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.16.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Hóa mô miễn dịch cho mỗi một dấu ấn	31/12/2024

- Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ Y tế Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tế bào học
- Bộ Y tế (2016). Nhuộm hóa mô miễn dịch cho một dấu ấn cho các mảnh cắt parafin. *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành giải phẫu bệnh - Tế bào học*. Nhà xuất bản y học, 109: 345-348.
- Thông tư số 01/2013/TT-BYT ngày 11/01/2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế, “Hướng dẫn thực hiện quản lý chất lượng xét nghiệm tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh”.
- Bancroft JD, Gamble M (2008). *Immunohistochemical Techniques. Theory and practice of histotechnology, sixth edition*. Churchill Livingstone, 21, 454-460.



BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ
NHUỘM PERIODIC ACID SCHIFF (PAS)
QTXN.GP.17.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Nguyễn Thị Quỳnh Giang	KTY trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc Bệnh viện	



Hà Nội – 2024

	BỘ Y TẾ	Trang 2 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.17.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Periodic acid Schiff (PAS)	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/1/2022	Phiên bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật nội dung theo định dạng mới

Phân phối:

Phòng xét nghiệm của khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này giúp cho kỹ thuật viên khoa Giải phẫu bệnh thực hiện được kỹ thuật nhuộm Periodic Acid Schiff (PAS) trên mẫu bệnh phẩm paraffin.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

– Phương pháp nhuộm PAS dùng để phát hiện các thành phần trong tế bào và mô có chứa polysaccarid, glycogen, chất nhày, nấm và màng đáy của một số mô.

– Acid Periodic đóng vai trò là chất oxy hóa sẽ phá vỡ các cấu trúc phân tử của glycogen tạo aldehyt, các thành phần này kết hợp với Acid Schiff tạo màu hồng đỏ, nhân nhuộm Hematoxylin bắt màu xanh, xanh đen.

Chữ viết tắt:

- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- NB: Người bệnh
- HE: Hematoxylin Eosin.
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- KHVQH: Kính hiển vi quang học

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Vật tư:

2.2.1 Hóa chất: Hóa chất pha bộ kit nhuộm Periodic acid Schiff theo bảng: *Tóm tắt quy trình nhuộm Periodic acid Schiff trên mô (TT/QTXN.GP.17.2)*

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
- DD acid periodic 0,5% + Acid periodic: 0,5g + Nước cất: 100ml	ml	Nhiệt độ phòng

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

- DD acid Chlohydric 1N + Acid chlohydric đậm đặc: 8.35ml + Nước cất: 91.65ml	ml	Nhiệt độ phòng
- Thuốc nhuộm Schiff + Basic fucshin: 1g + Acid chlohydric 1N: 10ml + Nước cất: 200ml + Sodium metabisulfit: 2g + Than hoạt tính: 1g - Cách pha: + Hòa 1g Basic Fucshin vào 100ml nước cất đun sôi (*). + Để DD (*) xuống 50°C thêm vào 10ml acid chlohydric 1N (**). + Để DD (**) xuống 25°C thêm vào 2g Sodium metabisulfit đựng trong chai tối màu 24 giờ. + Thêm 1g than hoạt tính sau đó lọc bằng giấy lọc, thêm vào 100ml nước cất bảo quản trong tủ lạnh 2-8°C.	ml	Tủ lạnh 2-8°C
- DD Hematoxylin & Eosin pha theo quy trình nhuộm Hematoxylin & Eosin (QTKT.GP.14.1)	ml	Nhiệt độ phòng
Nước cất	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn 96°	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn tuyệt đối	ml	Nhiệt độ phòng
DD thay thế xylen hoặc xylen	ml	Nhiệt độ phòng
Baume	ml	Nhiệt độ phòng

2.2.2. Vật tư:

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường, lam kính tích điện dương super frost, lamelle.
- Pipet nhựa, que dàn bệnh phẩm, kẹp không máu các kích cỡ.
- Giá để tiêu bản, bể nhuộm, khay đá.
- Găng tay không bột tan, khẩu trang y tế.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 5 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.17.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Periodic acid Schiff (PAS)	31/12/2024

– Giấy A4, giấy in tem chống thấm nước và hóa chất, giấy thấm tiêu bản, bút chì, bút dạ dầu.

2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu), máy đúc bệnh phẩm, bể cắt lát dạng tròn.
- Máy khuấy từ, cân điện tử.
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại), có dung tích 1000ml, 500ml, 100ml và 20ml.
- KHVQH 1 đầu, KHVQH nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn ca bệnh.
- Tủ lạnh có ngăn làm đá, tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2-8°C.
- Tủ ấm, tủ hút mùi hóa chất, tủ đựng hóa chất chống cháy lan, tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất.
- Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khối nén.
- Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21 – 26°C, đảm bảo an toàn sinh học.
- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại), máy lọc nước RO, vòi nước ngược rửa mắt.
- Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm: không áp dụng.

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm:

- Loại mẫu bệnh phẩm: là mẫu nén cần nhuộm PAS để đánh giá.
- Tiêu bản mẫu bệnh nhuộm HE kèm theo.
- Mẫu nén chứa bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
 - + Bệnh phẩm được cố định trong DD formalin trung tính 10% ngay sau khi lấy ra khỏi cơ thể.
 - + Quy trình tạo ra mẫu nén phải đảm bảo đúng kỹ thuật.
- Chuẩn bị các lam kính chuyên dụng có mã số, ký hiệu tương ứng với từng loại tiêu bản nhuộm. Cắt từ mẫu nén 1-2 lát với độ dày 3-5µm gắn lên mỗi lam kính.
- + Mẫu bệnh để nhuộm PAS.

- + Mẫu chứng để nhuộm PAS.
- Bảo quản mẫu khô nên ở nhiệt độ phòng.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.
- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.
- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ)

- Tổng thời gian ước tính: 72 giờ, trong đó:
- Thời gian chuẩn bị mẫu: 12 giờ.
 - Thời gian nhuộm: 24 giờ.
 - Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 36 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương.

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 1	2 phút
2	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 2	2 phút
3	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 3	2 phút

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

4	Ngâm các tiêu bản vào cồn tuyệt đối	1 phút
5	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 độ I	1 phút
6	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 độ II	1 phút
7	Ngâm các tiêu bản vào bể nước chảy	5 phút
8	Phủ tiêu bản trong dung dịch Acid Periodic 0,5%	15 phút
9	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	5 phút
10	Nhuộm tiêu bản với thuốc nhuộm Schiff	7 – 10 phút
11	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	10 phút
12	Nhuộm nhân bằng Hematoxylin	5 phút
13	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	15 phút
14	Đề tiêu bản khô trong tủ ấm	10 phút
15	Gắnlamen	
16	Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản	

4.2. Nhận định kết quả

- Nội kiểm tra đánh giá tiêu bản nhuộm chứng:
 - + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.
 - + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.
- + Tiêu chí đánh giá:
 - Nhân tế bào: xanh đến xanh đen.
 - Bào tương, glycogen: hồng đỏ.
- Đọc kết quả và nhận định kết quả:
 - + Bác sĩ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học, đối chiếu với tiêu bản HE để đánh giá tổn thương.
- Phiên giải và báo cáo kết quả: Báo cáo kết quả mẫu bệnh phẩm có dương tính hay âm tính.
- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: Bác sĩ đọc sẽ phối hợp đặc điểm mô học, kết quả nhuộm, thông tin lâm sàng, cận lâm sàng để phân tích và đánh giá kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

– Trả kết quả theo quy trình công bố và trả kết quả xét nghiệm (QTQL.GP.8). Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

– Lưu khối nền và tiêu bản theo quy trình lưu trữ mẫu và hủy bệnh phẩm (QTQL.GP.6) theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Nhầm mẫu của NB này với NB khác Nhầm mẫu nền khác loại của cùng NB	- Kiểm tra thông tin trên hệ thống điện tử không chính xác (mã GPB, số thứ tự của khối nền) - Lấy nhầm khối nền - Ghi sai mã GPB sau khi cắt	- Đối chiếu lại thông tin: Mã y tế, mã GPB, số thứ tự khối nền - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm sau khi kiểm tra đúng thông tin của NB

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Mẫu chứng âm tính	Hóa chất hỏng, mẫu chứng hết, các bước thực hiện quy trình sai sót	Kiểm tra và pha lại hóa chất, tìm mẫu chứng mới làm test lại, tuân thủ đúng quy trình
Tiêu bản chỉ được nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm	- Mẫu cắt mất mô do kỹ thuật cắt hoặc do máy cắt, dao cắt. Tiêu bản bị bóng nước, tiêu bản nhuộm chưa khô, cắt mẫu trên lam thường. Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm- Không khử hết nước trước khi gắn - Không đủ lượng bơm/đặt lamên lên tiêu bản không đều	Dựa vào nguyên nhân để loại bỏ các yếu tố ảnh hưởng. Khi thấy trên mẫu bệnh phẩm có bóng nước cần loại bỏ bóng, bọt khí, để tiêu bản khô hoàn toàn, cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn. Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được để trong hệ

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

		thống kín gió - Thay hóa chất định kỳ
Tiêu bản ám nước	Không khử hết nước trước khi gắn	Tuân thủ đúng thời gian loại nước. Thay hóa chất định kỳ

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bản giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bản giao tiêu bản
Đọc kết quả	- Đọc nhầm tiêu bản	- Kiểm tra lại tiêu bản - Đọc lại và sửa kết quả
Báo cáo và trả kết quả nhầm NB này với NB khác	- Nhầm lẫn giữa các phiếu chỉ định - Nhầm tên NB	- Kiểm tra lại thông tin NB - Kiểm tra lại phiếu trả kết quả - Thông báo ngay tới bác sĩ lâm sàng và NB để trả lại kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
 - + Sử dụng mẫu chứng dương đã đánh giá chất lượng
 - + Nhuộm PAS trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.
 - Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện đánh giá trên mẫu bệnh.
 - Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục và đánh giá lại. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
- Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng hoặc so sánh liên phòng
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ
- Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có

	BỘ Y TẾ	Trang 10 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.17.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Periodic acid Schiff (PAS)	31/12/2024

hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

– Bộ Y Tế (2016). Nhuộm periodic acid schiff. *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh - Tế bào học*. Nhà xuất bản y học, 79: 248 - 250.

– Mc Manus, Carson and Pickett (1990). PAS Reaction, *Histotechnology A Self-Instructional Text*, p.119 - 120.

– Mc Manus (1992). Periodic acid schiff (PAS) procedure. *Laboratory methods in histopathology – AFIP*, p.151 - 152.

– Russell B. Myers, Jerry L. Fredenburgh and William E. Grizzle (2008), Carbonhydrates, The periodic acid schiff (PAS) technique, *Theory and Practice of Histological Techniques*, 6th edition, p.168 - 171.

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ
NHUỘM BA MÀU (TRICHROME)
QTXN.GP.19.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Nguyễn Thị Huyền Trang	Kỹ thuật y khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc Bệnh viện	



Hà Nội – 2024

	BỘ Y TẾ	Trang 2 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.19.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm ba màu (Trichrome)	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/01/2022	Bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật nội dung theo định dạng mới

Phân phối

Phòng xét nghiệm khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này giúp cho nhân viên khoa Giải phẫu bệnh (GPB) thực hiện được kỹ thuật nhuộm ba màu (Trichrome) trên mẫu bệnh phẩm paraffin.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

– Các thành phần có tính axit trong mô sẽ bắt màu đỏ của dung dịch chứa axit fuchsin và Biebrich scarlet.

– Các thành phần ít tính thấm sẽ giữ lại màu đỏ, các sợi collagen, sợi liên kết sẽ mất màu đỏ khi qua dung dịch axit molybdic và axit photphotungstic.

– Các sợi collagen, sợi liên kết bắt màu xanh của dung dịch xanh aniline.

Chữ viết tắt:

- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- HE: Hematoxylin Eosin.
- NB: Người bệnh
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- KHVQH: Kính hiển vi quang học

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Vật tư:

2.2.1. Hóa chất: Hóa chất pha hoặc sử dụng bộ kit AB 150686 Trichrome Stain theo biểu mẫu: Tóm tắt quy trình kỹ thuật nhuộm 3 màu Trichromo trên mô(TT/QTXN.GP.19.2)

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
Dung dịch (DD) thay thế xylen (hoặc	ml	Nhiệt độ phòng

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

xylen)		
Cồn tuyệt đối	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn 96 độ	ml	Nhiệt độ phòng
Nước cất	ml	Nhiệt độ phòng
Dung dịch Bouin's	ml	Nhiệt độ phòng
Dung dịch nhuộm Hematoxyline	ml	Nhiệt độ phòng
Dung dịch Masson I	ml	Nhiệt độ phòng
Dung dịch Masson II	ml	Nhiệt độ phòng
Hỗn hợp dung dịch Photphomolypdic – Photphotungstic acid	ml	Nhiệt độ phòng
Dung dịch acid acetic 1%	ml	Nhiệt độ phòng

2.2.2 Vật tư

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường, lam kính tích điện dương super frost, lamelle.
- Pipet nhựa, que dàn bệnh phẩm, kẹp không mẫu các kích cỡ.
- Giá để tiêu bản, bể nhuộm, khay đá.
- Găng tay không bột tan, khẩu trang y tế.
- Giấy A4, giấy in tem chống thấm nước và hóa chất, giấy thấm tiêu bản, bút chì, bút dạ dầu.

2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu), máy đúc bệnh phẩm, bể cắt lát dạng tròn.
- KHVQH 1 đầu, KHVQH nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn ca bệnh.
- Tủ lạnh có ngăn làm đá.
- Tủ ẩm, tủ hút mùi hóa chất, tủ đựng hóa chất chống cháy lan, tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất.
- Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khối nén.
- Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26°C, đảm bảo an toàn sinh học.
- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại), máy

	BỘ Y TẾ	Trang 5 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.19.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm ba màu (Trichrome)	31/12/2024

lọc nước RO, vòi nước ngược rửa mắt.

- Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm: không áp dụng.

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm:

- Loại mẫu bệnh phẩm: là mẫu nền cần nhuộm ba màu (Trichrome) để đánh giá.
- Tiêu bản mẫu bệnh nhuộm HE kèm theo.
- Mẫu nền chứa bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
 - + Bệnh phẩm được cố định trong DD formalin trung tính 10% ngay sau khi lấy ra khỏi cơ thể.
 - + Quy trình tạo ra mẫu nền phải đảm bảo đúng kỹ thuật.
- Chuẩn bị các lam kính chuyên dụng có mã số, ký hiệu tương ứng với từng loại tiêu bản nhuộm. Cắt từ mẫu nền 1-2 lát với độ dày 3-5µm gắn lên mỗi lam kính.
- + Mẫu bệnh để nhuộm ba màu (Trichrome).
- Bảo quản mẫu khối nền ở nhiệt độ phòng.

2.4.3. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.
- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.
- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Tổng thời gian ước tính: 72 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 12 giờ.
- Thời gian nhuộm: 24 giờ.
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 36 giờ.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương.

3. AN TOÀN

– Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất

– Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

– Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.

– Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 1	2 phút
2	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 2	2 phút
3	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 3	2 phút
4	Ngâm các tiêu bản vào cồn tuyệt đối	1 phút
5	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 độ I	1 phút
6	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 độ II	1 phút
7	Ngâm các tiêu bản vào bể nước chảy	5 phút
8	Phủ dung dịch Bouin's lên tiêu bản và đặt ở 56°C trong hộp kín	60 phút
9	Rửa nước chảy đến khi trên tiêu bản mẫu bệnh không còn màu vàng	5 phút
10	Rửa lại nhanh bằng nước cất	
11	Nhuộm dung dịch Hematoxyline	10 phút
12	Rửa nước chảy	5 phút
13	Phủ tiêu bản với dung dịch Masson I	10 phút
14	Rửa nhanh với nước cất	5 giây
15	Phủ tiêu bản với dung dịch acid photphomolypdic/ acid photphotungstic đến khi sợi collagen không còn màu đỏ	15 phút
16	Đổ bỏ dung dịch acid photphomolypdic/ acid	5 phút

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	photphotungstic trên tiêu bản, sau đó phủ dung dịch Masson II	
17	Rửa nhanh nước cất	5 giây
18	Để khô tủ ẩm 60 độ	10 phút
19	Gắn lamên	
20	Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản	

4.2. Nhận định kết quả

– Nội kiểm tra đánh giá tiêu bản nhuộm chứng:
+ Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.
+ Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.

– Tiêu chí đánh giá:

+ Collagen: xanh.

+ Sợi cơ: đỏ.

+ Hạt nhân: màu đỏ sẫm đến đen/xanh.

– Đọc kết quả và nhận định kết quả:

+ Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học, đối chiếu với tiêu bản HE để đánh giá tổn thương.

– Phiên giải và báo cáo kết quả: Báo cáo kết quả mẫu bệnh phẩm có dương tính hay âm tính.

– Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: Bác sỹ đọc sẽ phối hợp đặc điểm mô học, kết quả nhuộm, thông tin lâm sàng, cận lâm sàng để phân tích và đánh giá kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

– Trả kết quả theo quy trình công bố và trả kết quả xét nghiệm (QTQL.GP.8). Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

– Lưu khối nền và tiêu bản theo quy trình lưu trữ mẫu và hủy bệnh phẩm (QTQL.GP.6) theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
- Nhầm mẫu của NB này với NB khác - Nhầm mẫu nền khác loại của cùng NB	- Kiểm tra thông tin trên hệ thống điện tử không chính xác (mã GPB, số thứ tự của khối nền) - Lấy nhầm khối nền - Ghi sai mã GPB sau khi cắt	- Đối chiếu lại thông tin: Mã y tế, mã GPB, số thứ tự khối nền - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm sau khi kiểm tra đúng thông tin của NB

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Màu xanh sợi collagen mờ nhạt	Thời gian nhuộm xanh alinin chưa đủ	Tăng thời gian nhuộm xanh alinin
	Thời gian tẩy màu đỏ của collagen chưa đủ	Tăng thời gian nhuộm hỗn hợp dung dịch acid photphotungstic và acid photphomolypdic
Tiêu bản chỉ được nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm	- Mẫu cắt mất mô do kỹ thuật cắt hoặc do máy cắt, dao cắt. Tiêu bản bị bóng nước, tiêu bản nhuộm chưa khô, cắt mẫu trên lam thường. Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm- Không khử hết nước trước khi gắn - Không đủ lượng bơm/đặt lamen lên tiêu bản không đều	Dựa vào nguyên nhân để loại bỏ các yếu tố ảnh hưởng. Khi thấy trên mẫu bệnh phẩm có bóng nước cần loại bỏ bóng, bọt khí, để tiêu bản khô hoàn toàn, cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn. Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được để trong hệ

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

		thông kín gió - Thay hóa chất định kỳ
Tiêu bản ẩm nước	Không khử hết nước trước khi gắn	Tuân thủ đúng thời gian loại nước. Thay hóa chất định kỳ

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bản giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bản giao tiêu bản
Đọc kết quả	- Đọc nhầm tiêu bản - Kết luận nhầm	- Kiểm tra lại tiêu bản - Đọc lại và sửa đổi kết quả
Báo cáo và trả kết quả nhầm NB này với NB khác	- Nhầm lẫn giữa các phiếu chỉ định - Nhầm tên NB	- Kiểm tra lại thông tin Bn - Kiểm tra lại phiếu trả kết quả - Thông báo ngay tới bác sĩ lâm sàng và NB để trả lại kết quả

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
- + Sử dụng mẫu chứng dương đã đánh giá chất lượng.
- + Nhuộm ba màu (Trichrome) trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.
- Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện đánh giá trên mẫu bệnh.
- Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục và đánh giá lại. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
- Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 10 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.19.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm ba màu (Trichrome)	31/12/2024

kiểm chuẩn chất lượng hoặc so sánh liên phòng.

- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo.
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y Tế (2016). Nhuộm ba màu của Masson (1929). *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh - Tế bào học*. Nhà xuất bản y học, 84: 262-264.
- Jones M. L, Bancroft J. D, Gamble M (2008). Conective tissues and stains, *Theory and practice of histological techniques*, Six editon, (10), 135-160.
- Bộ kit AB 150686 Trichrome Stain

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT
VỀ NHUỘM GOMORI CHO SỢI VĨNG (NHUỘM BẠC)
QTXN.GP.20.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Nguyễn Thị Quỳnh Giang	KTY trưởng Khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Phó Hồng Diệp	Phó Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc Bệnh viện	

Hà Nội – 2024



	BỘ Y TẾ	Trang 2 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.20.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Gomori cho sợi võng (Nhuộm Bạc)	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/1/2022	Phiên bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật nội dung theo định dạng mới

Phân phối:

Phòng xét nghiệm của khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 3 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.20.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Gomori cho sợi võng (Nhuộm Bạc)	31/12/2024

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này nhằm mục đích hướng dẫn thực hiện đúng kỹ thuật nhuộm Bạc trên mẫu paraffin, tạo ra tiêu bản nhuộm Bạc đúng tiêu chuẩn giúp bác sĩ chẩn đoán bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Phương pháp nhuộm bạc dựa vào sự oxy hóa của cacbonhydrate thành aldehyt. Nó được phát hiện nhờ kết hợp với kim loại bạc. Dung dịch vàng chlorua làm sạch các phân tử bạc dư thừa.

Chữ viết tắt:

- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- HE: Hematoxylin Eosin.
- NB: Người bệnh
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- KHVQH: Kính hiển vi quang học

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Vật tư:

2.2.1. Hóa chất: Hóa chất pha theo bảng: Tóm tắt quy trình nhuộm Bạc(TT/QTXN.GP.20.2)

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
Dung dịch (DD) thay thế xylen (hoặc xylen)	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn tuyệt đối	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn 96 độ	ml	Nhiệt độ phòng
Nước cất	ml	Nhiệt độ phòng
Dung dịch Axit periodic 0.5%	ml	Nhiệt độ phòng

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 4 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.20.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Gomori cho sợi võng (Nhuộm Bạc)	31/12/2024

Dung dịch bạc nitrate 5%	ml	2-8 ⁰
Thiosulfate 2%	ml	Nhiệt độ phòng
Methanamin 3%	ml	2-8 ⁰
Borate 5%	ml	Nhiệt độ phòng
Gold chloride 1%	ml	Nhiệt độ phòng
Hematoxylin Mayer	ml	Nhiệt độ phòng
Eosin Y	ml	Nhiệt độ phòng
DD bạc methanamin sử dụng, cho lần lượt theo thứ tự hóa chất: - 20 ml DD Methanamin 3% - 20 ml Nước cất - 2 ml DD Borate 5% - 1,5 ml DD Bạc nitrate 5%	ml	Sử dụng ngay sau khi pha

2.2.2 Vật tư:

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường, lam kính tích điện dương super frost, lamelle.
- Pipet nhựa, que dàn bệnh phẩm, kẹp không máu các kích cỡ.
- Giá để tiêu bản, bể nhuộm, khay đá.
- Găng tay không bột tan, khẩu trang y tế.
- Giấy A4, giấy in tem chống thấm nước và hóa chất, giấy thấm tiêu bản, bút chì, bút dạ dầu.

2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu), máy đúc bệnh phẩm, bể cắt lát dạng tròn.
- Máy khuấy từ, cân điện tử.
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại), cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 20ml.
- KHVQH 1 đầu, KHVQH nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn ca bệnh.
- Tủ lạnh có ngăn làm đá, tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2-8⁰C.
- Tủ âm, tủ hút mùi hóa chất, tủ đựng hóa chất chống cháy lan, tủ đựng

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	<i>Trang 5 trên 10</i>
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.20.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Gomori cho sợi võng (Nhuộm Bạc)	31/12/2024

hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất.

- Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khối nền.
- Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26°C, đảm bảo an toàn sinh học.
- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại), máy lọc nước RO, vòi nước ngược rửa mắt.
- Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm: không áp dụng.

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm:

- Loại mẫu bệnh phẩm: là mẫu nền cần nhuộm Bạc để đánh giá.
- Tiêu bản mẫu bệnh nhuộm HE kèm theo.
- Mẫu nền chứa bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
 - + Bệnh phẩm được cố định trong DD formalin trung tính 10% ngay sau khi lấy ra khỏi cơ thể.
 - + Quy trình tạo ra mẫu nền phải đảm bảo đúng kỹ thuật.
 - Chuẩn bị các lam kính chuyên dụng có mã số, ký hiệu tương ứng với từng loại tiêu bản nhuộm. Cắt từ mẫu nền 1-2 lát với độ dày 3-5µm gắn lên mỗi lam kính.
 - + Mẫu bệnh để nhuộm Bạc.
 - Bảo quản mẫu khối nền ở nhiệt độ phòng.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.
- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.
- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ)

Tổng thời gian ước tính: 72 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 12 giờ.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 6 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.20.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Gomori cho sợi võng (Nhuộm Bạc)	31/12/2024

- Thời gian nhuộm: 24 giờ.
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 36 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương.

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện: Hoá chất pha theo biểu mẫu: Tóm tắt quy trình kỹ thuật nhuộm Bạc trên mô (TT/QTXN.GP.20.2)

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 1	2 phút
2	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 2	2 phút
3	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 3	2 phút
4	Ngâm các tiêu bản vào cồn tuyệt đối	1 phút
5	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 độ I	1 phút
6	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 độ II	1 phút
7	Ngâm các tiêu bản vào bể nước chảy	5 phút
8	Phủ dung dịch acid periodic 0,5%	60 phút
9	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	5 phút
10	Cho tiêu bản vào dung dịch methanamin silver sử dụng đun sôi trong lò vi sóng (kiểm tra BP chuyển màu vàng nâu đậm thì dừng lại)	2-3 phút
11	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	5 phút
12	Phủ dung dịch AuCl_2	1 phút
13	Phủ dung dịch thiosulfate 2%	2 phút

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 7 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.20.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Gomori cho sợi võng (Nhuộm Bạc)	31/12/2024

14	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	2 phút
15	Phủ trong dd Eosin Y	10 giây
16	Đội các tiêu bản bằng cồn 96 độ	5 giây
17	Đề tiêu bản khô trong tủ ẩm	10 phút
18	Gắn lamen	
19	Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản	

Chú ý: Trong bước 10 của quy trình nhuộm, dung dịch methanamin silver được chuẩn bị ngay trước khi sử dụng (chỉ dùng 1 lần).

4.2. Nhận định kết quả

- Nội kiểm tra đánh giá tiêu bản nhuộm chứng:
 - + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.
 - + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.
- + Tiêu chí đánh giá: Màng đáy: màu đen, Bào tương, nền: hồng đỏ.
- Đọc kết quả và nhận định kết quả:
 - + Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học, đối chiếu với tiêu bản HE để đánh giá tổn thương.
 - Phiên giải và báo cáo kết quả: Báo cáo kết quả mẫu bệnh phẩm có dương tính hay âm tính.
 - Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: Bác sỹ đọc sẽ phối hợp đặc điểm mô học, kết quả nhuộm, thông tin lâm sàng, cận lâm sàng để phân tích và đánh giá kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình công bố và trả kết quả xét nghiệm (QTQL.GP.8). Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.
- Lưu khối nền và tiêu bản theo quy trình lưu trữ mẫu và hủy bệnh phẩm (QTQL.GP.6) theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 8 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.20.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Gomori cho sợi võng (Nhuộm Bạc)	31/12/2024

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Nhầm mẫu của NB này với NB khác Nhầm mẫu nền khác loại của cùng NB	- Kiểm tra thông tin trên hệ thống điện tử không chính xác (mã GPB, số thứ tự của khối nền). - Lấy nhầm khối nền - Ghi sai mã GPB sau khi cắt.	- Đối chiếu lại thông tin: Mã y tế, mã GPB, số thứ tự khối nền. - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm sau khi kiểm tra đúng thông tin của NB.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Mẫu chứng âm tính giả	Hóa chất hỏng, mẫu chứng hết, các bước thực hiện quy trình sai sót	Kiểm tra và pha lại hóa chất, tìm mẫu chứng mới làm test lại, tuân thủ đúng quy trình
Tiêu bản chỉ được nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm	- Mẫu cắt mất mô do kỹ thuật cắt hoặc do máy cắt, dao cắt. - Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm - Không tẩy hết nền	- Dựa vào nguyên nhân để loại bỏ các yếu tố ảnh hưởng. + Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được để trong hệ thống kín gió + Thay hóa chất định kỳ
Tiêu bản nhuộm nhạt màu/ dương tính yếu	Thời gian nhuộm trong dd methanamin sliver không đủ; pha dd không đúng tỉ lệ	Tuân thủ quy trình kỹ thuật; pha đúng tỉ lệ nồng độ hóa chất.
Tiêu bản bị nền/ dương tính quá mức	Đun sôi trong dung dịch methanamin sliver quá mức	- Tuân thủ theo quy trình kỹ thuật
Tiêu bản ám nước	Không khử hết nước trước khi gắn	Tuân thủ đúng thời gian loại nước. Thay hóa chất định kỳ

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	<i>Trang 9 trên 10</i>
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.20.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Gomori cho sợi võng (Nhuộm Bạc)	31/12/2024

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bàn giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bàn giao tiêu bản
Đọc kết quả	- Đọc nhầm tiêu bản - Kết luận nhầm	- Kiểm tra lại tiêu bản - Đọc lại và sửa đổi kết quả
Báo cáo và trả kết quả nhầm NB này với NB khác	- Nhầm lẫn giữa các phiếu chỉ định - Nhầm tên NB	- Kiểm tra lại thông tin Bn - Kiểm tra lại phiếu trả kết quả - Thông báo ngay tới bác sĩ lâm sàng và NB để trả lại kết quả

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

– Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
+ Sử dụng mẫu chứng dương đã đánh giá chất lượng
+ Nhuộm Bạc trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.

- Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện đánh giá trên mẫu bệnh.

- Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục và đánh giá lại. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.

– Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng hoặc so sánh liên phòng.

– Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ.

– Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo.

– Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

– Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ Y tế Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tế bào học

	BỘ Y TẾ	Trang 10 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.20.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Gomori cho sợi võng (Nhuộm Bạc)	31/12/2024

– Thông tư số 01/2013/TT-BYT ngày 11/01/2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế, “Hướng dẫn thực hiện quản lý chất lượng xét nghiệm tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh”.

– Bancroft J. D, Gamble M (2008). Connective Tissues and Stains, *Theory and practice of histotechnology*, sixth edition, Churchill Livingstone, (10), 140-141

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT
VỀ NHUỘM GROCOTT
QTXN.GP.21.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Phan Thị Huyền	Nhân viên QLCL khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc Bệnh viện	

Hà Nội – 2024



	BỘ Y TẾ	Trang 2 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.21.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Grocott	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/1/2022	Phiên bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật nội dung theo định dạng mới

Phân phối:

Phòng xét nghiệm của khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này nhằm mục đích hướng dẫn thực hiện đúng kỹ thuật nhuộm Grocott trên mẫu paraffin, tạo ra tiêu bản nhuộm Grocott đúng tiêu chuẩn giúp bác sĩ chẩn đoán bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Các thành phần polysaccharide của vách tế bào nấm bị oxy hóa bởi axit chromic tạo ra các aldehyd, các aldehyd này được nhận biết nhờ vào hiện tượng thủy phân phức hợp chất bạc – methenamine (màu đen).

Chữ viết tắt:

- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- HE: Hematoxylin Eosin.
- NB: Người bệnh
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- KHVQH: Kính hiển vi quang học

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Vật tư:

2.2.1. Hóa chất: Hóa chất pha theo bảng: Tóm tắt quy trình nhuộm Grocott's (TT/QTXN.GP.21.2)

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
Dung dịch (DD) thay thế xylen (hoặc xylen)	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn tuyệt đối	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn 96 độ	ml	Nhiệt độ phòng
Nước cất	ml	Nhiệt độ phòng
Dung dịch Axit chromic 10%	ml	Nhiệt độ phòng

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

Dung dịch bạc nitrate 5%	ml	2-8 ⁰
Sodium thiosulfate 2%	ml	Nhiệt độ phòng
Methanamin 3%	ml	2-8 ⁰
Borate 5%	ml	Nhiệt độ phòng
Sodium bisulfite 1%	ml	Nhiệt độ phòng
Gold chloride 1%	ml	Nhiệt độ phòng
Lighgreen 0,2%	ml	Nhiệt độ phòng
DD bạc methanamin sử dụng, cho lần lượt theo thứ tự hóa chất: - 23 ml DD Methanamin 3% - 25 ml Nước cất - 3 ml DD Borate 5% - 1,3 ml DD Bạc nitrate 5%	ml	Sử dụng ngay sau khi pha

2.2.2. Vật tư:

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường, lam kính tích điện dương super frost, lamelle.
- Pipet nhựa, que dàn bệnh phẩm, kẹp không máu các kích cỡ.
- Giá để tiêu bản, bể nhuộm, khay đá.
- Găng tay không bột tan, khẩu trang y tế.
- Giấy A4, giấy in tem chống thấm nước và hóa chất, giấy thấm tiêu bản, bút chì, bút dạ dầu.

2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu), máy đúc bệnh phẩm, bể cắt lát dạng tròn.
- Máy khuấy từ, cân điện tử.
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại), cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 20ml.
- KHVQH 1 đầu, KHVQH nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn ca bệnh.
- Tủ lạnh có ngăn làm đá, tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2-8⁰C

	BỘ Y TẾ	Trang 5 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.21.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Grocott	31/12/2024

– Tủ ẩm, tủ hút mùi hóa chất, tủ đựng hóa chất chống cháy lan, tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất.

– Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khối nền.

– Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26°C, đảm bảo an toàn sinh học.

– Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại), máy lọc nước RO, vòi nước ngược rửa mắt.

– Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm: không áp dụng

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm:

– Loại mẫu bệnh phẩm: là mẫu nền cần nhuộm Grocott để đánh giá

– Tiêu bản mẫu bệnh nhuộm HE kèm theo

– Mẫu nền chứa bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:

+ Bệnh phẩm được cố định trong DD formalin trung tính 10% ngay sau khi lấy ra khỏi cơ thể.

+ Quy trình tạo ra mẫu nền phải đảm bảo đúng kỹ thuật.

– Chuẩn bị các lam kính chuyên dụng có mã số, ký hiệu tương ứng với từng loại tiêu bản nhuộm. Cắt từ mẫu nền 1-2 lát với độ dày 3-5µm gắn lên mỗi lam kính.

+ Mẫu bệnh để nhuộm Grocott.

+ Mẫu chứng để nhuộm Grocott.

– Bảo quản mẫu khối nền ở nhiệt độ phòng.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

– Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.

– Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

– Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.

– Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ)

Tổng thời gian ước tính: 72 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 12 giờ.
- Thời gian nhuộm: 24 giờ.
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 36 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương.

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện: theo bảng tóm tắt quy trình kỹ thuật về nhuộm Grocotts (TT/QTXN.GP.21.2)

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 1	2 phút
2	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 2	2 phút
3	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 3	2 phút
4	Ngâm các tiêu bản vào cồn tuyệt đối	1 phút
5	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 độ I	1 phút
6	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 độ II	1 phút
7	Ngâm các tiêu bản vào bể nước chảy	5 phút
8	Phủ axit chromic 10%	60 phút
9	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	2 phút
10	Cho vào dung dịch sodium bisulfite	1 phút
11	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	2 phút
12	Cho vào dung dịch methanamin silver nitrate để tủ ẩm 80 ⁰	35 phút

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	trong (cho đến khi tiêu bản có màu vàng nâu)	
13	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	2 phút
14	Đề tiêu bản vào dung dịch AuCl ₂ khoảng	1 phút
15	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	1 phút
16	Đề tiêu bản trong dung dịch sodium thiosulfate khoảng	1 phút
17	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	1 phút
18	Đề trong dung dịch lightgreen	15 giây
19	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	5 giây
20	Thấm nhẹ giấy thấm	
21	Đề tiêu bản khô ở tủ ẩm 60 độ	10 phút
22	Gắn lamén	
23	Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản	

Chú ý: Trong bước 12 của quy trình nhuộm, dung dịch methanamin silver nitrate được chuẩn bị ngay trước khi sử dụng (chỉ dùng 1 lần)

4.2. Nhận định kết quả

- Nội kiểm tra đánh giá tiêu bản nhuộm chứng:
- + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.
- + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.

- + Tiêu chí đánh giá: Nấm: màu đen, Chất nhày: màu xanh xám, Nền” màu xanh sáng.

- Đọc kết quả và nhận định kết quả:

- + Bác sĩ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học, đối chiếu với tiêu bản HE để đánh giá tổn thương.

- Phiên giải và báo cáo kết quả: Báo cáo kết quả mẫu bệnh phẩm có dương tính hay âm tính.

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: Bác sĩ đọc sẽ phối hợp đặc điểm mô học, kết quả nhuộm, thông tin lâm sàng, cận lâm sàng để phân tích và đánh giá kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

– Trả kết quả theo quy trình công bố và trả kết quả xét nghiệm (QTQL.GP.8). Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

– Lưu khối nền và tiêu bản theo quy trình lưu trữ mẫu và hủy bệnh phẩm (QTQL.GP.6) theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Nhầm mẫu của NB này với NB khác Nhầm mẫu nền khác loại của cùng NB	- Kiểm tra thông tin trên hệ thống điện tử không chính xác (mã GPB, số thứ tự của khối nền) - Lấy nhầm khối nền - Ghi sai mã GPB sau khi cắt	- Đối chiếu lại thông tin: Mã y tế, mã GPB, số thứ tự khối nền - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm sau khi kiểm tra đúng thông tin của NB

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Mẫu chứng âm tính	Hóa chất hỏng, mẫu chứng hết, các bước thực hiện quy trình sai sót	Kiểm tra và pha lại hóa chất, tìm mẫu chứng mới làm test lại, tuân thủ đúng quy trình
Tiêu bản chỉ được nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm	Mẫu cắt mất mô do kỹ thuật cắt hoặc do máy cắt, dao cắt. Tiêu bản bị bóng nước, tiêu bản nhuộm chưa khô, cắt mẫu trên lam thường. Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm- Không khử hết nước	Dựa vào nguyên nhân để loại bỏ các yếu tố ảnh hưởng. Khi thấy trên mẫu bệnh phẩm có bóng nước cần loại bỏ bóng, bọt khí, để tiêu bản khô hoàn toàn, cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn. Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được

	BỘ Y TẾ	<i>Trang 9 trên 10</i>
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.21.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Grocott	31/12/2024

	trước khi gắn - Không đủ lượng bơm/đặt lamên lên tiêu bản không đều	để trong hệ thống kín gió - Thay hóa chất định kỳ
Tiêu bản ám nước	Không khử hết nước trước khi gắn	Tuân thủ đúng thời gian loại nước. Thay hóa chất định kỳ

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bản giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bản giao tiêu bản
Đọc kết quả	- Đọc nhầm tiêu bản - Kết luận nhầm	- Kiểm tra lại tiêu bản - Đọc lại và sửa đổi kết quả
Báo cáo và trả kết quả nhầm NB này với NB khác	- Nhầm lẫn giữa các phiếu chỉ định - Nhầm tên NB	- Kiểm tra lại thông tin Bn - Kiểm tra lại phiếu trả kết quả - Thông báo ngay tới bác sĩ lâm sàng và NB để trả lại kết quả

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

– Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
+ Sử dụng mẫu chứng dương đã đánh giá chất lượng
+ Nhuộm Grocott trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.

- Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện đánh giá trên mẫu bệnh.

- Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục và đánh giá lại. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 10 trên 10
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.21.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Grocott	31/12/2024

- Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng hoặc so sánh liên phòng.
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo.
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ Y tế Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tế bào học
- Thông tư số 01/2013/TT-BYT ngày 11/01/2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế, “Hướng dẫn thực hiện quản lý chất lượng xét nghiệm tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh”.
- Bancroft J. D, Gamble M (2008). *Microorganisms, Theory and practice of histotechnology*, sixth edition, Churchill Livingstone, (17), 320-321.

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT
NHUỘM SẮT
QTXN.GP.23.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Nguyễn Thị Quỳnh Giang	KTY trưởng Khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Phó Hồng Điệp	Phó Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc Bệnh viện	



Hà Nội – 2024

	BỘ Y TẾ	Trang 2 trên 9
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.23.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm Sắt	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/1/2022	Phiên bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật nội dung theo định dạng mới

Phân phối:

Phòng xét nghiệm của khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này nhằm mục đích hướng dẫn thực hiện đúng kỹ thuật nhuộm Sắt trên mẫu paraffin, tạo ra tiêu bản nhuộm Sắt đúng tiêu chuẩn giúp bác sĩ chẩn đoán bệnh.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Rối loạn chuyển hóa sắt gây ứ đọng sắt trong mô và tế bào. Mảnh mô được xử lý bằng dung dịch acid ferrocyanit sẽ bộc lộ ion sắt dưới dạng hydroxide $[Fe(OH)_3]$ bằng cách hòa tan acid hydrochloric. Sau đó, ion sắt phản ứng với dung dịch ferrocyanide kali để tạo ra phức màu xanh không hòa tan là ferrocyanide sắt (màu xanh Phổ).

Chữ viết tắt:

- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- HE: Hematoxylin Eosin.
- NB: Người bệnh
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- KHVQH: Kính hiển vi quang học

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

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

2.2. Vật tư:

2.2.1. Hóa chất: Hóa chất pha và sử dụng bộ kit AB150674 Iron stain) theo biểu mẫu: Tóm tắt quy trình kỹ thuật nhuộm sắt(TT/QTXN.GP.21.2)

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
Dung dịch (DD) thay thế xylen (hoặc xylen)	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn tuyệt đối	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn 95 độ	ml	Nhiệt độ phòng
Nước cất	ml	Nhiệt độ phòng
Dung dịch Potassium ferrocyanode	ml	Nhiệt độ phòng

Dung dịch HCl	ml	Nhiệt độ phòng
Nhân đỏ Nuclear fast red	ml	Nhiệt độ phòng

2.2.2. Vật tư:

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường, lam kính tích điện dương super frost, lamelle.
- Pipet nhựa, que dãn bệnh phẩm, kẹp không mẫu các kích cỡ.
- Giá để tiêu bản, bể nhuộm, khay đá.
- Găng tay không bột tan, khẩu trang y tế.
- Giấy A4, giấy in tem chống thấm nước và hóa chất, giấy thấm tiêu bản, bút chì, bút dạ dầu.

2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu), máy đúc bệnh phẩm, bể cắt lát dạng tròn.
- Máy khuấy từ, cân điện tử
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại), cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 20ml.
- KHVQH 1 đầu, KHVQH nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn ca bệnh.
- Tủ lạnh có ngăn làm đá, tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2-8°C.
- Tủ ẩm, tủ hút mùi hóa chất, tủ đựng hóa chất chống cháy lan, tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất.
- Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khối nén.
- Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26°C, đảm bảo an toàn sinh học
- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại), máy lọc nước RO, vòi nước ngược rửa mắt.
- Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm: không áp dụng.

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm:

- Loại mẫu bệnh phẩm: là mẫu nén cần nhuộm Sắt để đánh giá.
- Tiêu bản mẫu bệnh nhuộm HE kèm theo.
- Mẫu nén chứa bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau:
- + Bệnh phẩm được cố định trong DD formalin trung tính 10% ngay sau

khi lấy ra khỏi cơ thể.

- + Quy trình tạo ra mẫu nền phải đảm bảo đúng kỹ thuật.
- Chuẩn bị các lam kính chuyên dụng có mã số, ký hiệu tương ứng với từng loại tiêu bản nhuộm. Cắt từ mẫu nền 1-2 lát với độ dày 3-5µm gắn lên mỗi lam kính.
- + Mẫu bệnh để nhuộm Sắt.
- + Mẫu chứng để nhuộm Sắt.
- Bảo quản mẫu khỏi nền ở nhiệt độ phòng.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.
- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.
- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ)

- Tổng thời gian ước tính: 72 giờ, trong đó:
- Thời gian chuẩn bị mẫu: 12 giờ.
 - Thời gian nhuộm: 24 giờ.
 - Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 36 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương.

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện

Bước	Nội dung	Thời gian
------	----------	-----------

1	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 1	2 phút
2	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 2	2 phút
3	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 3	2 phút
4	Ngâm các tiêu bản vào cồn tuyệt đối	1 phút
5	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 độ I	1 phút
6	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 độ II	1 phút
7	Ngâm các tiêu bản vào bể nước chảy	5 phút
8	Trộn đều dung dịch Potassium ferrocyanode và dung dịch HCl theo tỉ lệ 1: 1 để tạo thành dung dịch nhuộm sắt sử dụng (pha trước khi sử dụng và xong loại bỏ)	3 phút
9	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	5 phút
10	Nhuộm nhân đỏ Nuclear fast red	5 phút
11	Rửa các tiêu bản trong bể nước RO chảy nhẹ	5 phút
12	Để tiêu bản khô trong tủ ấm	10 phút
13	Gắn lamen	
14	Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản	

4.2. Nhận định kết quả

- Nội kiểm tra đánh giá tiêu bản nhuộm chứng:
- + Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.
- + Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.
- + Tiêu chí đánh giá: Nhân tế bào: hồng đỏ - đỏ, Sắt: xanh lam sáng, Nền: hồng.
- Đọc kết quả và nhận định kết quả:
- + Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học, đối chiếu với tiêu bản HE để đánh giá tổn thương.
- Phiên giải và báo cáo kết quả: Báo cáo kết quả mẫu bệnh phẩm có dương tính hay âm tính.
- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: Bác sỹ đọc sẽ

phối hợp đặc điểm mô học, kết quả nhuộm, thông tin lâm sàng, cận lâm sàng để phân tích và đánh giá kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

– Trả kết quả theo quy trình công bố và trả kết quả xét nghiệm (QTQL.GP.8). Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

– Lưu khối nền và tiêu bản theo quy trình lưu trữ mẫu và hủy bệnh phẩm (QTQL.GP.6) theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Nhầm mẫu của NB này với NB khác Nhầm mẫu nền khác loại của cùng NB	- Kiểm tra thông tin trên hệ thống điện tử không chính xác (mã GPB, số thứ tự của khối nền) - Lấy nhầm khối nền - Ghi sai mã GPB sau khi cắt	- Đối chiếu lại thông tin: Mã y tế, mã GPB, số thứ tự khối nền - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm sau khi kiểm tra đúng thông tin của NB

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Mẫu chứng âm tính	Hóa chất hỏng, mẫu chứng hết, các bước thực hiện quy trình sai sót.	Kiểm tra và pha lại hóa chất, tìm mẫu chứng mới làm test lại, tuân thủ đúng quy trình.
Tiêu bản chỉ được nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm	- Mẫu cắt mất mô do kỹ thuật cắt hoặc do máy cắt, dao cắt. Tiêu bản bị bóng nước, tiêu bản nhuộm chưa khô, cắt mẫu trên lam thường. Tiêu bản khi thực hiện nhuộm bị nghiêng hoặc hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc	- Dựa vào nguyên nhân để loại bỏ các yếu tố ảnh hưởng. Khi thấy trên mẫu bệnh phẩm có bóng nước cần loại bỏ bóng, bọt khí, để tiêu bản khô hoàn toàn, cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn. Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Trong

	nhuộm- Không khử hết nước trước khi gấn. - Không đủ lượng bơm/đặt lamên lên tiêu bản không đều.	quá trình thực hiện quy trình tiêu bản luôn được để trong hệ thống kín gió. - Thay hóa chất định kỳ.
Tiêu bản ám nước	Không khử hết nước trước khi gấn.	Tuân thủ đúng thời gian loại nước. Thay hóa chất định kỳ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bản giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bản giao tiêu bản
Đọc kết quả	- Đọc nhầm tiêu bản - Kết luận nhầm	- Kiểm tra lại tiêu bản - Đọc lại và sửa đổi kết quả
Báo cáo kết quả	- Nhầm lẫn giữa các phiếu chỉ định - Nhầm tên NB	- Kiểm tra lại thông tin Bn - Kiểm tra lại phiếu trả kết quả - Thông báo ngay tới bác sĩ lâm sàng và NB để trả lại kết quả

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
 - + Sử dụng mẫu chứng dương đã đánh giá chất lượng
 - + Nhuộm Sắt trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.
 - Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện đánh giá trên mẫu bệnh.
 - Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục và đánh giá lại. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
- Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng hoặc so sánh liên phòng
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ

	BỘ Y TẾ	Trang 9 trên 9
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.23.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm Sắt	31/12/2024

- Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y Tế (2016). Nhuộm xanh phổ perl phát hiện ion sắt. *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật Giải phẫu bệnh – Tế bào học*. Nhà xuất bản y học, 88: 275-277.
- Bộ kit AB150674 IRON STAIN.

(1)

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ
NHUỘM MIỄN DỊCH HUỲNH QUANG TRỰC TIẾP
PHÁT HIỆN KHÁNG NGUYÊN
QTXN.GP.26.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Nguyễn Anh Văn	Bác sĩ khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Phó Hồng Diệp	Phó Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc Bệnh viện	



Hà Nội – 2024

	<i>BỘ Y TẾ</i>	<i>Trang 2 trên 11</i>
	<i>BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG</i>	<i>QTXN.GP.26.2</i>
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên</i>	<i>31/12/2024</i>

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/01/2022	Bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật nội dung theo định dạng mới

Phân phối

Khoa Giải Phẫu Bệnh: 01 bản

	<i>BỘ Y TẾ</i>	<i>Trang 3 trên 11</i>
	<i>BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG</i>	<i>QTXN.GP.26.2</i>
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên</i>	<i>31/12/2024</i>

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này giúp phát hiện kháng nguyên trên mẫu mô tươi dựa vào phản ứng kết hợp đặc hiệu giữa kháng nguyên trong mô và kháng thể gắn chất phát quang.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Kháng nguyên (KN) trong mô sẽ phản ứng với kháng thể (KT) đặc hiệu đã gắn chất màu huỳnh quang (FITC fluorescence isothiocynate) có thể phát sáng màu xanh tảo khi quan sát bằng kính hiển vi (KHV) huỳnh quang dưới ánh sáng của tia cực tím.

Chữ viết tắt

- BP: Bệnh phẩm
- DD: Dung dịch
- NB: Người bệnh
- FITC: Fluorescence isothiocynate
- HE: Hematoxylin Eosin.
- KN: Kháng nguyên
- KT: Kháng thể
- MDHQ: Miễn dịch huỳnh quang.
- TBS: Dung dịch đệm duy trì pH (Tris-Buffered Saline)
- XN: Xét nghiệm
- GPB: Giải phẫu bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện: Nhân lực trực tiếp

- Bác sỹ Giải phẫu bệnh: 01
- Kỹ thuật y: 02
- Hộ lý: 01

2.2. Vật tư

2.2.1. Dụng cụ

	BỘ Y TẾ	<i>Trang 4 trên 11</i>
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.26.2
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên</i>	<i>31/12/2024</i>

- Pipet điện tử.
- Que dàn bệnh phẩm.
- Kẹp không mẫu các kích cỡ.
- Khay đá.
- Giá để tiêu bản.
- Bể nhuộm.
- Thùng đựng rác thải y tế (màu vàng).
- Thùng đựng rác thông thường (màu xanh).

2.2.2. Hóa chất: Hóa chất pha theo bảng tóm tắt quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên (TT/QTXN.GP.26.2)

Tên hóa chất	Đơn vị
Dung dịch (DD) pha loãng kháng thể	ml
DD đệm TBS pH 7,4	ml
Kháng thể gắn huỳnh quang (FITC)	test
Nước cất	ml
DD Hematoxylin	ml
DD Eosin	ml
DD gắn lamelle (DPX mountant)	ml

2.2.3. Vật tư tiêu hao.

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường.
- Lam kính tích điện dương super frost.
- Lamelle
- Pipet nhựa, đầu côn
- Hộp nhựa đựng bệnh phẩm không gamma
- Ống bảo quản mẫu nắp vặn vô trùng 2ml
- Hộp nhựa đựng ống Cryo 1,5-2ml, 100 vị trí

	<i>BỘ Y TẾ</i>	<i>Trang 5 trên 11</i>
	<i>BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG</i>	<i>QTXN.GP.26.2</i>
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên</i>	<i>31/12/2024</i>

- Giấy nhôm Aluminium
- Bút mỡ (dako pen)
- Khăn sạch.
- Găng tay không bột tan
- Khẩu trang y tế.
- Hộp đựng rác thải sắc nhọn
- Bút chì, bút dạ dầu.
- Giấy A4
- Giấy in tem chống thấm nước, hóa chất
- Giấy thấm tiêu bản
- Giấy lau tay

2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt lạnh
- Máy nhuộm đặc biệt
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại).
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Kính hiển vi quang học 1 đầu
- Kính hiển vi soi nổi
- Kính hiển vi huỳnh quang
- Tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất
- Tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2-8°C
- Tủ -20°C lưu mẫu đông lạnh
- Máy in nhãn
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm) và lưu trữ bệnh phẩm.
- Hệ thống máy tính có phần mềm chuyên dụng kết nối kính huỳnh quang.

	<i>BỘ Y TẾ</i>	<i>Trang 6 trên 11</i>
	<i>BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG</i>	<i>QTXN.GP.26.2</i>
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên</i>	<i>31/12/2024</i>

- Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26°C, đảm bảo an toàn sinh học.
- Phòng tối độc tiêu bản huỳnh quang.
- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại).
- Máy lọc nước RO 2 lần.
- Vòi nước ngược rửa mắt.
- Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:

– Bệnh phẩm là mẫu mô tươi (ví dụ: thận, da) sau khi sinh thiết và gửi ngay đến khoa GPB.

– Tùy vào loại mô, bác sĩ GPB kiểm tra chất lượng mẫu tươi dưới kính hiển vi soi nổi (đúng loại mô, đủ độ lớn) và phân chia mẫu cho nhuộm MDHQ. Mẫu được cố định trong dung dịch Cryomatrix ở nhiệt độ -23°C.

– Cắt 01 tiêu bản dán trên lam thường và nhuộm tiêu bản theo Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm HE cho mẫu sinh thiết lạnh (QTXN.GP.25.2) để xác định hướng và thành phần của bệnh phẩm, đảm bảo mẫu đủ tiêu chuẩn nhuộm MDHQ.

– Cắt mẫu bệnh và mẫu chứng âm, chứng dương thành các lát cắt mỏng, có độ dày 5µm dán trên lam kính super frost plus đã ghi nhãn. Số lượng và thứ tự các lát cắt theo quy định, tùy thuộc vào loại dấu ấn miễn dịch huỳnh quang.

– Dùng bút dạ dầu khoanh quanh vị trí lát cắt ở mặt dưới lam kính. Để khô 30 phút ở nhiệt độ phòng.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:

	<i>BỘ Y TẾ</i>	<i>Trang 7 trên 11</i>
	<i>BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG</i>	<i>QTXN.GP.26.2</i>
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên</i>	<i>31/12/2024</i>

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

– Có ghi chẩn đoán lâm sàng, thời gian chỉ định, họ tên, chữ ký bác sĩ yêu cầu.

– Có ghi loại mẫu cần làm xét nghiệm (mẫu tươi), thời gian lấy mẫu và họ tên người lấy mẫu.

– Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.

– Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật:

Tổng thời gian ước tính: 120 giờ, trong đó:

– Thời gian chuẩn bị mẫu: 24 giờ.

– Thời gian nhuộm: 24 giờ.

– Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 72 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Các cơ sở xét nghiệm Giải phẫu bệnh có đầy đủ tiêu chuẩn.

3. AN TOÀN:

– Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của từng phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.

– Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT

– Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

– Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.

– Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện: theo bảng tóm tắt Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên (TT/QTXN.GP.26.2)

	BỘ Y TẾ	<i>Trang 8 trên 11</i>
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.26.2
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên</i>	<i>31/12/2024</i>

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Rửa các tiêu bản trong DD đệm TBS pH 7,4.	5 phút
2	Làm ráo tiêu bản, lau viền quanh bệnh phẩm, khoanh bút mờ quanh bệnh phẩm và chúng.	
3	Phủ kháng thể gắn FITC lên mẫu bệnh phẩm trong phòng tối (máy nhuộm đặc biệt hoặc hộp giữ ẩm)	40 phút
4	Rửa tiêu bản trong DD đệm TBS pH 7,4 lần 1 (phòng tối)	5 phút
5	Rửa tiêu bản trong DD đệm TBS pH 7,4 lần 2 (phòng tối)	5 phút
6	Đề tiêu bản khô tự nhiên (phòng tối).	60 phút
7	Gắn lamelle bằng dung dịch gắn	
8	Đánh giá chất lượng tiêu bản nhuộm	
9	Đặt tiêu bản trên khay bọc giấy nhôm Aluminium.	
10	Hoàn thiện và bàn giao tiêu bản	

4.2. Nhận định kết quả

4.2.1. Phân tích kết quả

– Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích, chụp ảnh nhuộm MDHQ trên tiêu bản dưới kính hiển vi huỳnh quang và hệ thống phần mềm chuyên dụng.

– Đánh giá tiêu bản nhuộm HE trên kính hiển vi quang học.

– Đánh giá tiêu bản nhuộm chứng âm và chứng dương:

+ Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.

+ Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cắt nhuộm lại từ đầu.

+ Tiêu chí đánh giá: Lắng đọng miễn dịch hiển thị bằng màu xanh táo sáng tại các vị trí trên mô. Mô nền không lắng đọng miễn dịch hiển thị bằng màu xanh nhạt đồng đều.

– Đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh theo các tiêu chí:

+ Loại dấu ấn miễn dịch.

+ Vị trí lắng đọng miễn dịch.

+ Kiểu hình: hạt (granular), đường (linear).

+ Cường độ: Không (0), vết (0,5+), nhẹ (1+), vừa (2+), mạnh (3+), rất mạnh (4+).

4.2.2. Báo cáo kết quả xét nghiệm và lưu trữ

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 9 trên 11
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.26.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên	31/12/2024

– Trả kết quả theo các quy trình liên quan. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

– Lưu mẫu tươi, tiêu bản và ảnh chụp MDHQ theo quy trình lưu và hủy bệnh phẩm Giải phẫu bệnh và theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Nhầm mẫu của NB này với NB khác	- Không đối chiếu thông tin mẫu đang làm và dụng cụ đặt mẫu khi phẫu tích bệnh phẩm. - Đặt lát cắt của NB không đúng mã GPB.	- Kiểm tra và thực hiện lại đúng (nếu có thể). - Thực hiện lần lượt đối với từng ca bệnh, đảm bảo kiểm tra, đối chiếu thông tin NB ở mỗi bước.
Sai mã GPB trên hệ thống phần mềm	Đánh nhầm mã GPB khi nhập chỉ định XN	- Sửa lại đúng mã GPB - Cẩn thận khi nhập mã.
Mẫu chứng âm bị nền	Mẫu bị khô trong quá trình ủ hoặc bị nhiễm chéo.	- Kiểm tra và thực hiện lại đúng. - Không để mẫu bị khô trong suốt quá trình thao tác. Thay đầu côn trước khi hút, pha chế hóa chất.
Mẫu chứng dương bị âm	- Hóa chất hỏng - Mẫu chứng không đạt tiêu chuẩn -Thực hiện không đúng các bước trong quy trình. - Tiêu bản nhuộm mất màu	- Kiểm tra và thực hiện lại đúng. - Tuân thủ điều kiện bảo quản hóa chất, tránh rửa đông nhiều lần. Pha lại hóa chất mới - Kiểm tra lại mẫu chứng

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	<i>Trang 10 trên 11</i>
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.26.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên	31/12/2024

	theo thời gian.	- Tuân thủ đúng theo quy trình kỹ thuật. - Đọc kết quả càng sớm càng tốt do phức hợp MDHQ sẽ bị mất màu theo thời gian.
--	-----------------	--

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Nhầm loại dấu ấn (kháng thể)	Không phù đúngn loại kháng thể trên tiêu bản tương ứng với tên dấu ấn.	- Kiểm tra và thực hiện lại đúng. - Đối chiếu loại kháng thể và tên dấu ấn trên tiêu bản ở mỗi bước thực hiện
Tiêu bản chỉ được nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm	- Còn bọt khí trên tiêu bản khi phủ hóa chất. - Chỉ dùng lam kính thường - Tiêu bản bị nghiêng hoặc để hóa chất bay hơi dẫn đến khô vùng phản ứng. Vùng nào khô sẽ không bắt màu thuốc nhuộm.	- Kiểm tra và thực hiện lại đúng. - Loại bỏ bọt khí - Cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn. - Cân bằng lại hệ thống máy, dụng cụ nhuộm. Tiêu bản luôn được để trong hệ thống kín gió.
- Tiêu bản bị mất mô	- Mẫu cắt mất mô do kỹ thuật cắt hoặc do máy cắt, dao cắt. - Rửa quá mạnh làm bong, trôi bệnh phẩm.	- Kiểm tra lại máy cắt, dao cắt. - Đảm bảo cắt hết mặt của bệnh phẩm. - Cắt lại nếu bệnh phẩm bị bong.
- Tiêu bản bị bóng nước	- Tiêu bản nhuộm chưa khô	Để khô trước khi gắn lamelle.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
----------------	--------------------	------------------------------

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	<i>Trang 11 trên 11</i>
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.26.2
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm miễn dịch huỳnh quang trực tiếp phát hiện kháng nguyên</i>	<i>31/12/2024</i>

Sai mã GPB trên tiêu bản	Lỗi sao chép thông tin mã (do ghi tay)	Sửa lại cho đúng
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bàn giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bàn giao tiêu bản

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
- + Sử dụng mẫu chứng âm và mẫu chứng dương đã được đánh giá chất lượng.
- + Nhuộm trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.1.
- + Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
- + Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
- Thực hiện ngoại kiểm (nếu có): theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng.
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị.
- Kiểm soát điều kiện môi trường.
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ Y tế Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tế bào học
- Quyết định 3376/QĐ-BYT ngày 30/09/2023 của Bộ y tế Ban hành “Đề cương Quy trình kỹ thuật xét nghiệm.
- Bancroft JD, Gamble M (2008). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier 6th edition.
- Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD (2019). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier, 8th edition.

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ
XÉT NGHIỆM SINH THIẾT TỨC THÌ BẰNG CẮT LẠNH
QTXN.GP.5.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Lê Thị Quỳnh	KTY khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc Bệnh viện	

Hà Nội – 2024

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 2 trên 9
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.5.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về xét nghiệm sinh thiết tức thì bằng cắt lạnh	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/01/2022	Phiên bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật thay đổi định dạng quy trình

Phân phối:

Phòng xét nghiệm của khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 3 trên 9
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.5.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về xét nghiệm sinh thiết tức thì bằng cắt lạnh	31/12/2024

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này nhằm giúp nhân viên Giải phẫu bệnh thực hiện kỹ thuật cắt lạnh đối với mẫu mô tươi.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đây là quy trình xét nghiệm nhanh thường dùng trong phẫu thuật để chẩn đoán tức thì, hoặc xét nghiệm huỳnh quang, ... Mô sau khi được đưa ra khỏi cơ thể sẽ được phủ gel OCT- Cryomatrix và đông lạnh trong buồng lạnh của máy cắt lạnh. Mẫu có gel sẽ bị đông cứng lại tạo thành giá đỡ và khung thuận lợi cho việc cắt lát bệnh phẩm. Bệnh phẩm sau đó được tiến hành nhuộm nhanh hoặc nhuộm huỳnh quang để chẩn đoán mô bệnh.

Chữ viết tắt:

- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- KTY: Kỹ thuật y
- OCT: Gel Cryomatrix
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- KHVQH: Kính hiển vi quang học
- NB: Người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ: 01

Kỹ thuật y: 01

Hộ lý: 01

2.2. Vật tư:

2.2.1. Hóa chất: Hóa chất pha theo tóm tắt (TT/QTXN.GP.5.2)

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
Dung dịch Hematoxylin & Eosin	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn 95°	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn tuyệt đối	ml	Nhiệt độ phòng

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

Gel cắt lạnh Cryomatrix (OCT)	ml	Nhiệt độ phòng
Bơm Canada	ml	Nhiệt độ phòng
Nước cắt	ml	Nhiệt độ phòng

2.2.2. Vật tư:

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường, lam kính tích điện dương super frost, lamelle.
- Pipet nhựa, que dầm bệnh phẩm, kẹp không mẫu các kích cỡ.
- Giá để tiêu bản, bể nhuộm, khay đá.
- Găng tay không bột tan, khẩu trang y tế.
- Giấy A4, giấy in tem chống thấm nước và hóa chất, giấy thấm tiêu bản, bút chì, bút dạ dầu.
- Lamen gắn tiêu bản.

2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt lạnh đang ở trạng thái hoạt động , trong buồng máy bao gồm:
 - + Chổi lông mềm.
 - + Mâm kim loại (metal grids).
 - + Bộ phận áp lạnh.
 - + Dao cắt.
- Máy khuấy từ, cân điện tử.
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại), cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 20ml.
- KHVQH 1 đầu, KHVQH nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn ca bệnh.
- Tủ lạnh có ngăn làm đá, tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2 – 8°C.
- Tủ ẩm, tủ hút mùi hóa chất, tủ đựng hóa chất chống cháy lan, tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất.
- Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21 – 26°C, đảm bảo an toàn sinh học.
- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại), máy lọc nước RO, vòi nước ngược rửa mắt.
- Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 5 trên 9
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.5.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về xét nghiệm sinh thiết tức thì bằng cắt lạnh	31/12/2024

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm: không áp dụng.

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm:

- Chuẩn bị máy cắt lạnh trước khi nhận mẫu ít nhất 60 phút:
 - + Nhiệt độ buồng lạnh -20°C đến -23°C .
 - + Làm sạch bộ phận làm lạnh.
 - + Lắp một lưỡi dao mới vào vị trí cắt.
- Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm:
 - + KTY tiếp nhận mẫu ghi ngày giờ nhận mẫu, số lượng, kích thước mẫu và mã hóa cho phiếu chỉ định xét nghiệm.
 - + BS kiểm tra, phẫu tích và mô tả chi tiết mẫu bệnh phẩm.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.
- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.
- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là phút)

Tổng thời gian ước tính: 30 phút, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 10 phút.
- Thời gian nhuộm: 3 phút.
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 15 phút.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương.

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 6 trên 9
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.5.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về xét nghiệm sinh thiết tức thì bằng cắt lạnh	31/12/2024

- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện: tóm tắt hướng dẫn quy trình kỹ thuật cắt lạnh (TT/QTXN.GP.5.2)

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Phủ gel OCT lên mâm kim loại, đặt ngay vào thanh làm lạnh (cryobar).	2 phút
2	Đặt mẫu tươi, chưa cố định lên trên (đường kính mẫu < 2cm). Tiếp tục phủ OCT lên bệnh phẩm và xung quanh, để đông lạnh. Dùng bộ phận áp lạnh để bề mặt mẫu phẳng, song song với mâm kim loại và lưỡi dao.	2 phút
3	Đóng kín cửa kính buồng máy cắt lạnh, chờ đến khi khối bệnh phẩm đông cứng (có màu trắng).	2 phút
4	Bắt đầu cắt các lát thô có độ dày 10-15µm để tạo mặt phẳng cho đến khi vào hết mặt bệnh phẩm. Quay máy cắt với nhịp độ vừa phải, sau đó điều chỉnh độ dày lát cắt từ 5- 7 µm..	1 phút
5	Dùng chổi lông đầu mềm, chải các lát cắt cho bằng phẳng, loại bỏ các lát cắt bị nhăn, rách, mất mô.	
6	Dán lát cắt lên lam kính đã được mã hóa.	
7	Để khô lam kính ở nhiệt độ phòng.	2 phút
8	Tiến hành nhuộm theo quy trình nhuộm tùy loại: nhuộm Hematoxylin & Eosin cho sinh thiết lạnh (QTXN.GP.25.2), nhuộm Diff- Quick(QTXN.GP.3.2).	2 phút
9	Loại nước, gấn lamen, dán nhãn lên tiêu bản.	2 phút
10	Tiếp tục quy trình hoàn thiện và bàn giao tiêu bản (QTQL.GP.5.1).	1 phút

4.2. Nhận định kết quả

- Các thành phần cấu trúc mô giữ gần như nguyên vẹn hình thái ban đầu.
- Vị trí mảnh cắt tập trung ở trung tâm tiêu bản.
- Mảnh cắt lạnh lấy hết mặt bệnh phẩm, mỏng đều, không nhăn, gấp, xước, bắt màu thuốc nhuộm rõ.

- Đọc kết quả và nhận định kết quả: Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.

- Phiên giải và báo cáo kết quả.

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: Bác sỹ đọc sẽ phối

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 7 trên 9
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.5.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về xét nghiệm sinh thiết tức thì bằng cắt lạnh	31/12/2024

hợp đặc điểm mô học, kết quả nhuộm, thông tin lâm sàng, cận lâm sàng để phân tích và đánh giá kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình công bố và trả kết quả xét nghiệm (QTQL.GP.8). Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

- Lưu khối nền và tiêu bản theo quy trình lưu trữ mẫu và hủy bệnh phẩm (QTQL.GP.6) theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Nhầm mẫu của NB này với NB khác	- Thông tin của NB trên giấy chỉ định và mẫu BP không trùng khớp với nhau. - Nhầm lẫn do sai sót của nhân viên lấy mẫu - Ghi sai mã GPB sau khi cắt	- Đối chiếu lại thông tin: Mã y tế, mã GPB, tên NB. - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm sau khi kiểm tra đúng thông tin của NB

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
- Tiêu bản cắt bị gấp, xước, mất mô.	- Mẫu chưa đủ lạnh, dao cắt cùn, dính bụi, mảnh cắt quá mỏng.	- Cắt nhiều lát bệnh phẩm trên cùng 1 lam kính.
- Mảnh cắt chưa lấy hết các thành phần mô.	- Đặt sai vị trí cố định mảnh cắt, sai chiều, hướng của bệnh phẩm. - Chưa bào hết mặt bệnh phẩm, bào quá nông.	- Làm mềm khối bệnh phẩm và đặt lại vị trí mảnh BP. - Thực hiện lại kỹ thuật cắt mảnh, bào mặt sâu hơn.
- Tiêu bản bắt màu nhuộm chưa đạt. Các thành phần mô chưa bắt màu	- Sai thời gian các bước nhuộm làm tiêu bản đậm màu hoặc nhạt màu.	- Nhuộm lại.
- Tiêu bản ẩm nước	- Không để khô tiêu bản trước khi gắn.	- Để khô tiêu bản triệt để rồi mới gắn lamen.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
- Giấy chỉ định chưa được code mã GPB	- Nhân viên chưa hoàn thiện	- Nhập lại thông tin hành chính trước khi bàn giao.
Đọc kết quả	- Đọc nhầm tiêu bản - Kết luận nhầm	- Kiểm tra lại tiêu bản - Đọc lại và sửa đổi kết quả
Báo cáo và trả kết quả nhầm NB này với NB khác	- Nhầm lẫn giữa các phiếu chỉ định - Nhầm tên NB	- Kiểm tra lại thông tin NB - Kiểm tra lại phiếu trả kết quả - Thông báo ngay tới bác sĩ lâm sàng và NB để trả lại kết quả

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng hóa chất hàng ngày
- + Sử dụng mẫu chứng dương đã đánh giá chất lượng:
 - Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện đánh giá trên mẫu bệnh.
 - Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục và đánh giá lại. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
- Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng hoặc so sánh liên phòng.
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo.
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y Tế (2016). Kỹ thuật cắt lạnh mảnh mô. *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tế bào học*, Nhà xuất bản y học, 77: 239-241.
- Bob Mills (1992). Frozen sections, *Laboratory methods in histopathology-AFIP*, 67-70.

	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	Trang 9 trên 9
	KHOA GIẢI PHẪU BỆNH	QTXN.GP.5.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về xét nghiệm sinh thiết tức thì bằng cắt lạnh	31/12/2024



BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ
XÉT NGHIỆM LAI TẠI CHỖ GẮN MÀU (CISH)
QTXN.GP.29.2

Phiên bản: 02
Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Nguyễn Thị Quỳnh Giang	KTY trưởng Khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc Bệnh viện	



	BO Y TE	Trang 2 trên 14
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.29.2
	Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về xét nghiệm lại tại chỗ gắn màu (CISH)	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	01/01/2023	Phiên bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật nội dung theo định dạng mới

Phân phối

Phòng xét nghiệm khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Lai tại chỗ nhuộm màu (CISH) giúp nhận biết chuỗi DNA hoặc RNA cụ thể trong mô hoặc tế bào mà không làm mất đặc điểm hình thái của mô.

1.2. Nguyên lý của kỹ thuật

Nguyên lý của quy trình dựa trên phản ứng (lai) đặc hiệu giữa đoạn DNA hoặc RNA được đánh dấu (probe) với đoạn DNA hoặc RNA có trong mẫu (đích). Liên kết đã hình thành được nhận biết bằng bước nhuộm màu tương ứng.

Chữ viết tắt

- DD: Dung dịch
- HE: Hematoxylin Eosin.
- NB: Người bệnh
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- CISH: Chromogen In situ hybridization
- EBV: Epstein-Barr Virus

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

- Bác sĩ Giải phẫu bệnh: 01
- Kỹ thuật y: 02
- Hộ lý: 01

2.2. Vật tư:

2.2.1. Hóa chất: Hoá chất sử dụng Bộ kit REMBRANDT RISH & AP Detection Kit-v11 theo biểu mẫu: Tóm tắt quy trình kỹ thuật nhuộm Cish trên mô (TT/QTXN.GP.29.2)

Màu nắp lọ	Tên sản phẩm	Mô tả	Thành phần	Số lượng	Bảo quản
Trong suốt	PEPSIN POW	Pepsin bột	Pepsin ly giải protein	1 g	2 ⁰ C- 8 ⁰ C
Trong suốt	PEPSIN DIL	DD pha loãng pepsin	DD pha loãng pepsin (dd HCL 1M)	15 ml	2 ⁰ C- 8 ⁰ C
Vàng/tím	PROBE	BIO- or DIG- PROBE	Probe gắn Biotin (vàng), hoặc	1 ml	2 ⁰ C- 8 ⁰ C

Ghi chú:Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

			Digoxigenin (tím)		
Hồng	PROBE	⁺ RISH	PROBE gắn chứng dương RISH	1 ml	2 ⁰ C- 8 ⁰ C
Xanh	PROBE	⁻ RISH	PROBE gắn chứng âm RISH	1 ml	2 ⁰ C- 8 ⁰ C
Đỏ	CONJ	Anti-BIO AP (or Anti-DIG AP)	Phức hợp kháng thể kháng BIO (hoặc DIG)	15 ml	2 ⁰ C- 8 ⁰ C
Xanh nước biển	SUBS	NBT/BCIP	Cơ chất NBT/BCIP	15 ml	2 ⁰ C- 8 ⁰ C
Cam	COUNT	NFR	Nhuộm nhân Nuclear Fast Red	15 ml	2 ⁰ C- 8 ⁰ C
Túi trắng	WASH	TBS	Muối đệm TBS	2 túi	2 ⁰ C- 8 ⁰ C
Hộp trắng A	SUPPORT	GL SLIDES	Lam kính có dính	50 chiếc	Nhiệt độ phòng
Hộp trắng B	SUPPORT	COVERSL	Lamen	100 chiếc	Nhiệt độ phòng
Hộp trắng C	CONTROL	Chứng dương	Lam chứng dương	2 lam	Nhiệt độ phòng

- Cồn tuyệt đối, 96°, 70° bảo quản nhiệt độ phòng.
- Dung dịch khử paraffin: dung dịch thay thế xylen, xylen, hoặc dung dịch khử theo máy, bảo quản nhiệt độ phòng.
- Nước cất, bảo quản nhiệt độ phòng.

2.2.2 Vật tư tiêu hao

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 5 trên 14
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.29.2
	Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu (CISH)	31/12/2024

- Lam kính thường, lam kính tích điện dương super frost, lamelle.
- Pipet nhựa, tuýp 2ml nhựa pha hóa chất.
- Que dàn bệnh phẩm, giá để tiêu bản, bể nhuộm, khay đá.
- Găng tay không bột tan, khẩu trang y tế.
- Bút chì, bút dạ dầu, giấy A4.
- Giấy in tem chống thấm nước, hóa chất, giấy thấm tiêu bản

2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu), máy nhuộm đặc biệt, bể dàn tiêu bản.
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Pipet tự động, đầu côn các loại.
- Kính hiển vi quang học 1 đầu, nhiều đầu hội chẩn ca bệnh.
- Tủ lạnh có ngăn làm đá, và bảo quản hóa chất.
- Đế nhiệt/thiết bị làm ấm bề mặt đến 37⁰C, nhiệt kế bề mặt.
- Tủ ẩm, tủ hút mùi hóa chất, tủ đựng hóa chất chống cháy lan, tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất, hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khối nền.
- Hệ thống công nghệ thông tin có phần mềm nhận biết bệnh phẩm của toàn bộ quá trình (máy in, máy quét và in barcode, hệ thống thu âm) và lưu trữ bệnh phẩm.
- Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26⁰C, đảm bảo an toàn sinh học.
- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại), máy lọc nước RO 2 lần.
- Vòi nước ngược rửa mắt.
- Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư.

2.4. Chuẩn bị

2.4.1. Chuẩn bị hóa chất

- Dung dịch Pepsin phân giải protein (Pepsin digestion reagent)

Hòa tan hóa chất phân giải protein PEPSIN POW nắp trong với 8mL nước cất hoặc nước khử ion (có trong bộ kit), chia thành các phần nhỏ (tube), ví dụ 150 μ L, lưu trữ ở -20 độ C.

- Dung dịch pha loãng pepsin (pepsin diluant)

Pha loãng dung dịch HCL 1M PEPSIN DIL (nắp trong suốt) tới nồng độ yêu cầu của mẫu tương ứng (mẫu paraffin: 0,1M; mẫu tế bào và mẫu đông lạnh 0,01M) với nước cất hoặc nước khử ion, bảo quản ở 2-8⁰C.

- Dung dịch muối đệm TBS (TBS buffer salt)

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.



Hòa tan một túi WASH màu trắng (trong bộ kit) với 1000 ml nước cất hoặc nước khử ion. Hòa tan hoàn toàn muối, tránh các tác nhân lây nhiễm vào dung dịch, bảo quản ở 2-8 °C.

– Chuẩn bị dung dịch phân giải protein hoạt động (Proteolytic work solution)

Chuẩn bị dung dịch ly giải protein hoạt động: 300 – 400 µl cho mỗi mảnh 1 cm². Pha dung dịch mới trước khi sử dụng, bỏ đi phần không sử dụng đến.

+ Mẫu bệnh phẩm trong paraffin

Pha loãng dd phân giải protein 100x trong dung dịch HCl 0,1M. Ví dụ 100 µl với 5ml HCl 0,1M, lắc đều.

+ Mẫu tế bào

Pha loãng dd phân giải protein 25 000x trong dung dịch HCl 0,01M. Ví dụ 8 µl với 100 ml HCL 0,01M, lắc đều.

+ Mẫu sinh thiết lạnh

Pha loãng dd phân giải protein 50 000x trong dung dịch HCl 0,01M. Ví dụ 4 µl với 100 ml HCL 0,01M, lắc đều.

2.4.2. Chuẩn bị mẫu chứng trước nhuộm

– Chuẩn bị mẫu chứng dương

+ Lam chứng dương của nhà sản xuất (*).

+ Lam mẫu bệnh phẩm của khoa, là mẫu mô được lấy từ bệnh nhân huyết thanh định lượng có EBV, và mẫu mô đã nhuộm Hóa mô miễn dịch dương tính với EBV(**).

+ Thực hiện đồng hai mẫu lam * và ** đã chuẩn bị trên với cùng quy trình lai tại chỗ gắn màu CISH.

+ Khi kết quả của hai lam * và ** tương đồng cho kết quả dương tính như nhau, thì mẫu mô bệnh ** của khoa đã được nhuộm CISH dương tính với EBV được chọn làm mẫu Chứng dương cho các lần nhuộm tiếp theo.

– Chuẩn bị mẫu chứng âm

+ Mẫu mô được lấy từ bệnh nhân có định lượng huyết thanh EBV âm tính, mẫu mô đã được xác định âm tính với EBV bằng phương pháp nhuộm Hóa mô miễn dịch.

+ Thực hiện tiếp các bước của quy trình CISH với mẫu âm tính.

+ Khi kết quả của lam có mẫu mô âm tính với quy trình nhuộm CISH thì được chọn làm mẫu chứng âm trong quy trình nhuộm CISH.

2.4.3. Chuẩn bị bệnh phẩm

	BO Y TE	Trang 7 trên 14
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.29.2
	Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu (CISH)	31/12/2024

– Bệnh phẩm là mẫu nền cần nhuộm CISH để đánh giá. Mẫu nền chứa bệnh phẩm đạt chất lượng cần có các yêu cầu sau: Bệnh phẩm được cố định trong DD formalin trung tính 10% ngay sau khi lấy ra khỏi cơ thể. Quy trình tạo ra mẫu nền phải đảm bảo đúng kỹ thuật.

– Chuẩn bị các lam kính chuyên dụng có mã số, ký hiệu tương ứng với từng loại tiêu bản nhuộm. Cắt từ mẫu bệnh phẩm và mẫu chứng từ khối nền 1-2 lát với độ dày 3-5µm gắn lên lam kính.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

Kiểm tra phiếu chỉ định xét nghiệm: ghi đầy đủ thông tin theo quy định bao gồm: họ tên người bệnh, tuổi, tên khoa phòng, chẩn đoán lâm sàng, tên loại xét nghiệm yêu cầu, bác sĩ chỉ định.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Tổng thời gian ước tính: 72 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 12 giờ.
- Thời gian nhuộm: 24 giờ.
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 36 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Các cơ sở xét nghiệm Giải phẫu bệnh có đầy đủ tiêu chuẩn.

3. AN TOÀN

– Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của từng phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.

– Thực hiện an toàn sinh học phù hợp tác nhân gây bệnh theo thông tư 41/2016/TT-BYT.

– Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

– Một vài hóa chất có chứa chất bảo quản có thể gây kích ứng khi tiếp xúc với da hoặc màng nhầy. Nồng độ của các chất này rất thấp (dưới 0.1%). Nếu có tiếp xúc với mắt hoặc da, cần rửa với thật nhiều nước.

– Slide chứng dương có trong kit có chứa nhân tố gây bệnh được cố định trong 4% para-formaldehyde khiến nó bị bất hoạt, tuy nhiên cần chú ý an toàn khi sử dụng.

– Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.

– Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện: theo bảng tóm tắt hướng dẫn quy trình kỹ thuật về xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu CISH (TT/QTXN.GP.29.2)

Nêu các bước thực hiện chính theo trình tự, cụ thể, ngắn gọn và dễ hiểu

Bước	Mô tả	Thời gian
	Lai tại chỗ gắn màu CISH	
1	Đề khô tiêu bản ở tủ ẩm 37 ⁰ C qua đêm, tiếp tục đề tủ ẩm 58 ⁰ C trong 1 giờ.	
2	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 1	2 phút
3	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 2	2 phút
4	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 3	2 phút
5	Ngâm các tiêu bản vào cồn tuyệt đối	1 phút
6	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 ^o	1 phút
7	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96 ^o	1 phút
8	Ngâm các tiêu bản vào bể nước chảy	2 phút
10	Đặt tiêu bản bệnh và tiêu bản chứng lên thiết bị làm ẩm ở 37 ⁰ C	1 phút
11	Phủ 400 µl/ 1 tiêu bản dung dịch phân giải protein đã chuẩn bị sẵn, ủ 37 ⁰ C	30 phút
12	Nghiêng tiêu bản loại bỏ dung dịch thừa	
13	Khử nước lần lượt với cồn 96 ^o cồn tuyệt đối	2 phút
14	Đề tiêu bản khô tự nhiên	
15	Nhỏ 1 giọt hoặc 20 µl dung dịch Probe nắp vàng lên mỗi mẫu chứng dương và mẫu bệnh.	
16	Nhỏ 1 giọt hoặc 20 µl dung dịch Probe chứng âm nắp xanh lá cây lên mỗi mẫu chứng âm (nếu có).	
17	Nhỏ 1 giọt hoặc 20 µl dung dịch Probe chứng dương nắp hồng lên mỗi mẫu chứng dương.	
18	Đặt lamên lên mỗi mẫu, tránh tạo bọt khí.	
19	Ủ trong môi trường ẩm ở 37 ⁰ C trong	16 giờ
20	Nhúng tiêu bản vào dung dịch TBS đến khi lamên dờ ra, ngâm rửa tiếp trong TBS	10 phút

	BỘ Y TẾ		Trang 9 trên 14
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG		QTXN.GP.29.2
	Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu (CISH)		31/12/2024
21	Lấy tiêu bản ra, thấm khô và lau khô viên tiêu bản bằng giấy thấm.		
22	Nhỏ 2-3 giọt AP- Conjugate nắp đỏ lên mỗi mẫu, ủ 37 ⁰ C		30 phút
23	Loại bỏ dung dịch trên lam, ngâm rửa trong TBS 3 lần mỗi lần		1 phút
24	Rửa nước cất		1 phút
25	Loại bỏ nước trên tiêu bản, lau khô viên		
26	Nhỏ 2-3 giọt NBT/BCIP substrate năm xanh da trời lên mỗi tiêu bản, ủ 37 ⁰ c (kiểm tra trên kính hiển vi mỗi 5 phút)		5-15 phút
27	Loại bỏ dung dịch thừa, rửa trong nước cất 3 lần mỗi lần		1 phút
28	Nhỏ 2- 3 giọt Nuclear Fast red nắp cam trong		1 phút
29	Rửa nhanh trong nước cất hoặc nước khử ion		
30	Đề khô tiêu bản trong tủ ẩm 58 ⁰ C		1 giờ
31	Gắn lamelle		
32	Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản		

4.2. Nhận định kết quả

– Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.

+ Đánh giá tiêu bản nhuộm HE nhằm xác định vùng tổn thương.

+ Nội kiểm tra đánh giá tiêu bản nhuộm chứng âm và chứng dương:

- Chứng âm nên âm hoàn toàn (không có bất kì tín hiệu màu xác định nào). Nếu chứng âm có biểu hiện giống như dương tính, cần loại bỏ các kết quả nhuộm vì sẽ không thể kết luận được gì.

- Chứng dương nên xuất hiện tín hiệu màu xác định ở vị trí của DNA, RNA đích khu trú. Màu sắc cần chính xác và nhìn thấy được rõ ràng ở dạng tế bào/mô tương ứng.

+ Trên các slide mẫu, bắt đầu quan sát với vật kính phóng đại thấp, chú ý với việc tập trung vào tín hiệu màu và quan sát:

- Dương tính (có màu) quan sát được khu trú ở loại tế bào tương ứng với DNA, RNA đích.

- Màu sắc chuẩn xác (không có tín hiệu màu nội sinh hoặc từ formalin).

- Sau đó sử dụng vật kính độ phóng đại cao để quan sát:

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BO Y TẾ	Trang 10 trên 14
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.29.2
	Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về xét nghiệm lại tại chỗ gắn màu (CISH)	31/12/2024

- Đặc điểm hình thái màu nhuộm dương tính (dạng hạt...), ranh giới và đặc điểm khu trú giống nhau trên các mẫu dương tính.

- Tiêu chí đánh giá: Nhân tế bào bắt màu hồng nhạt. Thành phần chứa EBV trong mô bắt màu đen. Thành phần khác hồng nhạt.

- Đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh theo các tiêu chí:

- + Tế bào/ thành phần cần đánh giá dương tính hay âm tính.

- + Vị trí dương tính.

- + Mức độ dương tính (nếu cần).

- Đưa ra kết luận: Nhuộm CISH dương tính hay âm tính cho thành phần nào.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

Trả kết quả theo các quy trình liên quan. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

Lưu khối nén và tiêu bản theo quy trình lưu và hủy bệnh phẩm Giải phẫu bệnh và theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Sự không phù hợp	Nguyên nhân	Khắc phục
Nhận dạng sai NB, bệnh phẩm	- Lấy nhầm mẫu bệnh phẩm của NB khác. - Mẫu bệnh phẩm khác loại của cùng NB.	- Đối chiếu thông tin trên phiếu chỉ định xét nghiệm với kết quả của NB trước đó (nếu có), tìm thông tin xét nghiệm trên phần mềm bao gồm: họ và tên, mã y tế, mã Giải phẫu bệnh, số block nén, mã số block làm xét nghiệm phải trùng khớp nhau. Đối chiếu kết quả gần nhất với bác sĩ nếu NB có nhiều kết quả xét nghiệm.
		- Thực hiện lại quy trình xét nghiệm trên đúng mẫu của NB.
Chỉ định xét nghiệm chưa đúng.	Do lâm sàng chỉ định không rõ ràng	Hướng dẫn lâm sàng đối chiếu thông tin trên phiếu kết quả của NB trước đó (nếu có), tìm đúng loại chỉ định và thông tin về tên xét nghiệm, số lượng cần làm.
Mẫu nén không đảm bảo	Mặt cắt mẫu nén không bằng phẳng, bệnh phẩm bị bong có viền trắng, mẫu còn ít.	- Đúc lại mẫu nén để làm bằng mặt cắt, và tiết kiệm mẫu. - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm trên đúng mẫu của NB.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Sự không phù hợp	Nguyên nhân	Khắc phục
Tín hiệu nhuộm yếu hoặc không có trên mẫu nghi dương tính	Cố định mô	Chỉ sử dụng chất ổn định formalin có đệm, chọn mẫu khác nếu còn mẫu chưa xử lý.
	Loại nền	Thay mới các dung dịch tan sáp
	Phân giải protein	Đảm bảo sử dụng đúng nồng độ pepsin Đảm bảo quá trình phân giải xảy ra tại 37 độ C
	Tương tác nội cấu trúc của probe	Với quy trình RISH, làm biến tính mẫu ở 60 độ C trong vòng 5 phút trước khi cho dung dịch probe
	Quy trình lai	Lắc đều dung dịch probe trước khi cho lên mẫu cắt
	Nhiệt độ rửa	Đảm bảo nhiệt độ rửa là 37 ± 2 độ C
	Quy trình phát hiện	Đảm bảo nhiệt độ là 37 ± 2 độ C Chú ý cẩn ù trong bóng tối
	Số lượng DNA đích thấp	Kéo dài quy trình lai
	Màu kết tủa bị trắng mất	Đảm bảo quá trình rửa trắng và dung dịch gắn lamen theo đúng khuyến cáo
Kết quả âm tính với mẫu chứng dương	Loại nền	Thay mới các dung dịch tan sáp
	Mẫu chứng dương được ủ với probe chứng dương rửa bằng PanWash (một loại hóa chất khác)	Không sử dụng PanWash với mẫu chứng dương
	Tương tác nội cấu trúc của probe	Với quy trình RISH, làm biến tính mẫu ở 60 độ C trong vòng 5 phút trước khi cho dung dịch probe
	Quy trình phát hiện	Đảm bảo nhiệt độ là 37 ± 2 độ C
Kết quả dương tính với mẫu chứng âm	Loại nền	Thay mới các dung dịch tan sáp
	Mẫu chứng dương được ủ với probe chứng dương rửa bằng PanWash (một loại hóa chất khác)	Không sử dụng PanWash với mẫu chứng dương

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.



	chất khác)	
	Tương tác nội cấu trúc của probe	Với quy trình RISH, làm biến tính mẫu ở 60 độ C trong vòng 5 phút trước khi cho dung dịch probe
	Quy trình phát hiện	Đảm bảo nhiệt độ là 37 ± 2 độ C
Kết quả dương tính với mẫu chứng âm	Mẫu cắt bị khô	Ủ mẫu trong môi trường ẩm
	Quá trình rửa	Đảm bảo nhiệt độ là 37 ± 2 độ C
	Lây nhiễm từ probe chứng dương hoặc probe khác	Đảm bảo probe chứng dương là thứ cuối cùng được nhỏ lên mẫu cắt
Tín hiệu nhuộm nền	Mẫu cắt quá dày	Độ dày tối ưu của mẫu mô là 4-6 μ m
	Mô bị nhăn rúm	Đảm bảo mô được duỗi hoàn toàn
	Loại nền	Thay mới các dung dịch tan sáp
	Mẫu cắt bị khô	Thực hiện tất cả các bước trong môi trường ẩm, hạn chế việc bay hơi
	Nhiệt độ rửa	Đảm bảo nhiệt độ là 37 ± 2 độ C
	Ủ với cơ chất quá lâu	Giảm quá trình ủ với cơ chất khoảng 5 phút
	Peroxidase nội sinh	Bất hoạt peroxidase nội sinh bằng việc ủ mẫu cắt trong 3% oxy già trong 15 phút tại nhiệt độ phòng trước khi tiến hành phân giải protein
	AP nội sinh	Bất hoạt AP nội sinh bằng cách ủ mẫu trong dung dịch cơ chất và thêm vào 4mg levamisole.
Không có mẫu hoặc tế bào nào còn lại trên slide	Chuẩn bị mẫu	Đảm bảo mẫu được chuẩn bị theo đúng quy trình, mô được cố định trong dung dịch formalin đậm trung tính và slides được hong khô hoàn toàn.
	Phản cắt mẫu quá mỏng	Độ dày tối ưu của mẫu mô là 4-6 μ m
	Dùng sai mặt slide	Chú ý dùng mặt được phủ keo dính sinh học
	Nồng độ pepsin quá cao	Sử dụng chính xác nồng độ pepsin dựa trên loại mẫu
	Bước phân giải quá lâu	Giảm thời gian phân giải (15 phút thay vì 30 phút) và phân giải ở nhiệt độ

	BỘ Y TẾ		Trang 13 trên 14
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG		QTXN.GP.29.2
	Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về xét nghiệm lai tại chỗ gắn màu (CISH)		31/12/2024
		phòng	
	Loại bỏ lamen quá mạnh	Đảm bảo các slides được nhúng trong PBS ít nhất 10 phút.	
Do trang thiết bị	Trang thiết bị lỗi thời, không được bảo dưỡng, kiểm tra định kì.	Lên lịch bảo dưỡng, kiểm tra định kì trang thiết bị sử dụng.	
Do nhân viên thực hiện kỹ thuật	Thao tác khi thực hiện kỹ thuật chưa đúng.	Có quy trình chuẩn và hướng dẫn nhân viên trước khi thực hiện kỹ thuật.	
Do hóa chất	Hóa chất không đảm bảo chất lượng	Bảo quản đúng hóa chất sinh phẩm theo yêu cầu của nhà sản xuất. Kiểm tra chất lượng hóa chất trước khi đưa vào sử dụng.	
Lai chéo	Bệnh nhân có thể mang nhiều hơn một nhóm phụ của cùng loại virus	Kết hợp với các phương pháp xét nghiệm khác để loại trừ.	

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bản giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bản giao tiêu bản
Đọc kết quả	- Đọc nhầm tiêu bản - Kết luận nhầm	- Kiểm tra lại tiêu bản - Đọc lại và sửa đổi kết quả
Báo cáo kết quả	- Nhầm lẫn giữa các phiếu chỉ định. - Nhầm tên NB	- Kiểm tra lại thông tin NB - Kiểm tra lại phiếu trả kết quả. - Thông báo ngay tới bác sĩ lâm sàng và NB để trả lại kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

– Thực hiện nội kiểm:

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 14 trên 14
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.29.2
	Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật về xét nghiệm lại tại chỗ gắn màu (CISH)	31/12/2024

+ Sử dụng mẫu chứng CISH EBV âm và mẫu chứng CISH EBV dương đã đánh giá chất lượng.

+ Nhuộm CISH trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất. Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.1.

+ Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện đánh giá trên mẫu bệnh.

+ Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục. Sau đó nhuộm lại với mẫu bệnh và mẫu chứng.

- Ngoại kiểm tra chất lượng hoặc so sánh liên phòng hoặc kiểm tra mẫu mù.
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị.
- Kiểm soát điều kiện môi trường.
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2013). Hướng dẫn qui trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh- Tế bào học.
- Quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất: Pan path.

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT
CHỌC HÚT KIM NHỎ
QTXN.GP.1.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Phó Hồng Điệp	Phó Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó giám đốc Bệnh viện	

Hà Nội – 2024



Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/1/2022	Bản mới
2	31/12/2024	Thay đổi định dạng và mã tài liệu - Bổ sung biểu mẫu Sổ xét nghiệm tế bào (BM1/QTXN.GP.1.2) - Bổ sung Phụ lục Xét nghiệm tế bào học - Những điều cần biết - Bổ sung nội dung theo định dạng mới

Phân phối

Khoa Giải Phẫu Bệnh: 01 bản

	<i>BỘ Y TẾ</i>	<i>Trang 3 trên 11</i>
	<i>BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG</i>	<i>QTXN.GP.1.2</i>
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chọc hút kim nhỏ</i>	<i>31/12/2024</i>

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Chọc hút kim nhỏ (fine-needle aspiration FNA) là kỹ thuật được sử dụng trong xét nghiệm (XN) tế bào học, giúp chẩn đoán sơ bộ các tổn thương dạng khối, nang, đánh giá giai đoạn hoặc tái phát bệnh lý ác tính. Kỹ thuật này thường thực hiện trước các phương pháp xâm lấn hơn (sinh thiết kim, phẫu thuật cắt bỏ).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

1.2.1. Định nghĩa, nguyên lý:

Chọc hút kim nhỏ là thủ thuật xâm lấn tối thiểu, an toàn và nhanh chóng, sử dụng loại kim có kích thước nhỏ (22-25G), đưa vào vùng mô hoặc nang dịch để lấy mẫu tế bào nhằm đánh giá hình thái trên kính hiển vi từ đó định hướng chẩn đoán.

Chọc hút kim nhỏ có thể được thực hiện ở hầu hết các vị trí trên cơ thể, thường sử dụng nhất đối với các khối sưng, khối u dưới da, mô mềm. Ngoài ra, có thể kết hợp với siêu âm, chụp cắt lớp vi tính, nội soi để chọc hút kim nhỏ ở các vùng tổn thương sâu trong cơ thể.

1.2.2. Chữ viết tắt

NB:	Người bệnh
BS:	Bác sỹ
FNA:	Chọc hút kim nhỏ (Fine-needle aspiration)
GPB:	Giải phẫu bệnh
KHV:	Kính hiển vi
KTY:	Kỹ thuật y
NNNB:	Người nhà người bệnh
QLCL:	Quản lý chất lượng
XN:	Xét nghiệm

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện: Nhân lực trực tiếp.

Bác sỹ Giải phẫu bệnh:	01
Kỹ thuật y:	01
Hộ lý:	01

2.2. Vật tư:

2.2.1. Dụng cụ

- Hộp inox đựng bông cotton, bông khô có nắp đậy.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.



BỘ Y TẾ	Trang 4 trên 11
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.1.2
Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chọc hút kim nhỏ	31/12/2024

- Ống inox đựng panh, kéo.
- Panh thẳng không mấu .
- Kéo inox.
- Khay quả đậu inox đựng dụng cụ, vật tư...
- Khay/giá để tiêu bản nhuộm.
- Cốc thủy tinh pha thuốc nhuộm.
- Khay để tiêu bản sau khi nhuộm.
- Hộp đựng tiêu bản lưu.
- Thùng đựng rác thải y tế (màu vàng).
- Thùng đựng rác thông thường (màu xanh).

2.2.2. Hóa chất

- Cồn 70 độ sát khuẩn hoặc dung dịch Betadine.
- Cồn tuyệt đối.
- Dung dịch nhuộm Giemsa hoặc bộ dung dịch nhuộm Diff Quick.
- Dung dịch giảm đau tại chỗ (xịt hoặc bôi).
- Dung dịch sát khuẩn tay nhanh, dung dịch rửa tay.
- Toàn bộ các hóa chất được bảo quản ở nhiệt độ phòng (21-26 độ C) trong dụng cụ chứa riêng biệt có nhãn dán nhận biết, ngày mở nắp, hạn sử dụng, đóng nắp sau mỗi lần sử dụng.

2.2.3. Vật tư tiêu hao

- Bơm tiêm vô trùng 10ml hoặc 20ml, kích cỡ kim 23G hoặc 25G (kim 22G dùng với các khối xơ chắc).
- Lam kính sạch .
- Pipet nhựa.
- Bông khô tiệt trùng cắt nhỏ.
- Băng dính y tế.
- Găng tay sạch, khẩu trang, mũ y tế.
- Giấy lau tay.
- Giấy A4.
- Bút dạ dầu, bút chì mềm, bút bi.
- Hộp đựng rác thải sắc nhọn.

2.3. Trang thiết bị:

- KHV quang học.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 5 trên 11
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.1.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chọc hút kim nhỏ	31/12/2024

- Bàn hơi tiêu bản.
- Phòng XN tế bào có đủ ánh sáng, thoáng, nguồn cấp nước sạch, chậu rửa và bàn để dụng cụ nhuộm và trang thiết bị khác.
- Hệ thống máy tính để bản, máy in.
- Phần mềm vào kết quả kết nối phần mềm bệnh viện.
- Máy quét mã vạch.
- Tủ đựng vật tư, giấy tờ.
- Giường làm thủ thuật.

2.4. Chuẩn bị mẫu

2.4.1. Chuẩn bị người bệnh:

- Người bệnh (NB) không cần nhịn ăn trước khi làm thủ thuật.
- Người nhà người bệnh (NNNB) và/hoặc NB được hỏi để xác định đúng thông tin như trong phiếu chỉ định xét nghiệm.
- NNNB/NB được giải thích về kỹ thuật chọc hút kim nhỏ (Phụ lục: Xét nghiệm tế bào học- Những điều cần biết) và ký xác nhận cam kết đồng ý thực hiện trong Sổ xét nghiệm tế bào (BM1/QTXN.GP.1.2).
- Hỏi tiền sử và diễn biến lâm sàng của NB. Khám, xác định vị trí lấy mẫu xét nghiệm.
- Thực hiện giảm đau tại chỗ (nếu cần).

2.4.2. Chuẩn bị lam kính:

- Lam kính sạch, ghi tên bệnh nhân, mã số Giải phẫu bệnh (GPB) và vị trí lấy mẫu (nếu cần).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm:

- Kiểm tra đầy đủ các thông tin sau và ghi vào Sổ xét nghiệm tế bào (BM1/QTXN.GP.1.2):
 - + Thông tin bệnh nhân: họ tên, tuổi, giới, mã y tế, mã số phiếu.
 - + Nơi yêu cầu XN, loại XN, chẩn đoán lâm sàng, vị trí cần làm XN.
 - + Thời gian chỉ định, họ tên của bác sĩ yêu cầu XN.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ)

Tổng thời gian ước tính: 2 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị: 0,5 giờ
- Thời gian chọc hút và nhuộm: 1 giờ
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 0,5 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Phòng xét nghiệm tế bào học thuộc khoa Giải phẫu bệnh.

3. AN TOÀN

- Bác sĩ GPB cần hiểu rõ về giải phẫu của vùng cần làm XN, tránh chọc hút vào các cấu trúc thần kinh, mạch máu quan trọng, tránh chọc vào ổ nhiễm trùng vì có thể đưa vật liệu lây nhiễm vào vùng vô trùng.
- Chống chỉ định tương đối: NB đang được điều trị bằng thuốc chống đông hoặc có rối loạn đông máu, u mạch máu. Nếu cần thiết thực hiện ở những NB này, băng ép bằng tay thường có thể cầm máu.
- Tránh chọc hút tại các vị trí nguy hiểm (mắt, khoang miệng, ổ bụng, vùng sinh dục, sát phổi...) nếu không có biện pháp dự phòng bệnh NB không hợp tác làm XN (tiên mê, gây mê...).
- Nếu thủ thuật được thực hiện qua nội soi hoặc siêu âm qua da thì cần có sự chuẩn bị bổ sung đối với bất kỳ thủ thuật nào được thực hiện theo cách đó, bao gồm xác định vị trí dự kiến, an thần hoặc gây mê cho NB.
- Đeo khẩu trang, găng tay trong tất cả các bước thực hiện quy trình.
- Đảm bảo an toàn khi sử dụng các vật dụng sắc nhọn, dễ vỡ: kim tiêm, lam kính.
- Không để hóa chất tiếp xúc trực tiếp với mắt và da.
- Vệ sinh khu vực làm thủ thuật khi hoàn tất quy trình.
- Thực hiện quy định về an toàn cho người thực hiện và dự phòng nguy cơ trước, trong và sau phơi nhiễm.
- Thực hiện quy định về an toàn điện và phòng tránh cháy nổ.
- Thực hiện quy định về an toàn hóa chất.
- Thực hiện quy định về an toàn sinh học.
- Thực hiện quy định kiểm soát môi trường: đánh giá các yếu tố vi khí hậu như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng, tiếng ồn...

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

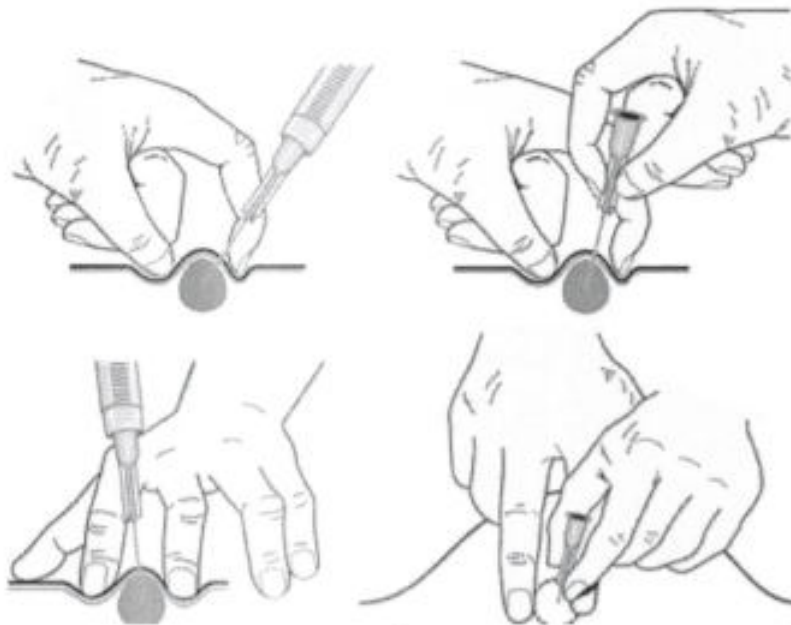
4.1. Các bước thực hiện

Bước	Mô tả	Thực hiện
4.1.1	Hướng dẫn tư thế làm thủ thuật: - BS, KTY sát khuẩn tay, mang găng tay sạch - Hướng dẫn NB ngồi/nằm, hướng vị trí làm thủ thuật về phía bác sĩ. Thông thường với NB là trẻ nhỏ cần một người nhà cho ngồi/nằm vào lòng, giữ cho NB không vùng tay chân trong quá trình thực hiện. - KTY hỗ trợ giữ NB và bộc lộ vị trí lấy mẫu.	BS, KTY
4.1.2	Thực hiện thủ thuật chọc hút kim nhỏ:	BS, KTY



- BS di chuyển pit tông trong xilanh đẩy các chất có thể còn trong bơm tiêm (khí, dầu).
- Sát khuẩn vị trí lấy mẫu bằng bông cồn 70 độ/ Betadine theo vòng tròn hướng từ trong ra ngoài, để da khô tự nhiên.
- Cố định tổn thương giữa ngón tay cái và ngón trỏ hoặc giữ giữa ngón trỏ và các ngón tay, đồng thời kéo căng da bên dưới.
- Đưa kim nhẹ nhàng xuyên nhanh qua da vào tổn thương, tạo áp suất âm bằng cách bịt đốc kim bằng đầu ngón cái (nếu chỉ dùng kim) hoặc kéo pit tông ra (nếu dùng kim gắn xilanh). Chuyển động kim ra vào ít một trong tổn thương và đổi hướng nếu cần (hình dưới). Hạn chế chuyển hướng kim nhanh gây đau cho NB.

Chú ý: Nếu nghi ngờ nang dịch/ổ mủ nên dùng kim gắn xilanh và hút hết dịch bên trong. Không hút khi thấy máu trào vào trong đốc kim.



Hình: Hướng dẫn chọc hút kim nhỏ

- Sau khi hút xong, rút nhanh kim qua da, đồng thời một tay kéo nhẹ mặt da chỗ chọc hút để cầm máu.
- Dùng bông khô và băng dán để cầm máu vào vị trí chọc hút, nhắc NB/NNNB giữ bông 5-10 phút, theo dõi NB và hẹn thời gian, địa điểm trả kết quả XN.

4.1.3 Phết phiến đồ

- Bác sĩ tháo kim ra khỏi bơm tiêm, kéo pit tông ra lấy khí vào xilanh sau đó lắp lại kim vào và phun dịch trong bơm

BS

	tiêm vào giữa tiêu bản của NB. - Dùng lam kính khác áp lên và kéo dàn dịch trên tiêu bản thành lớp mỏng, đều. - Bỏ lam kéo và kim vào hộp đựng rác thải sắc nhọn.	
4.1.4	Nhuộm tiêu bản - Để dịch khô tự nhiên, nếu dịch loãng có thể cố định nhanh bằng cách đặt lên bàn hơi tiêu bản (nhiệt độ 38-40 độ C). - Cố định bằng cồn tuyệt đối - Nhuộm Giemsa hoặc Diff-Quick theo quy trình (QTXN.GP.2 và QTXN.GP.3). - Rửa tiêu bản sau khi nhuộm, dùng giấy thấm khô mặt dưới tiêu bản. - Kiểm tra chất lượng tiêu bản (màu nhân, bào tương) trên KHV quang học. - Bàn giao tiêu bản và phiếu chỉ định XN cho BS đọc.	KTY

Chú ý: Các trường hợp thực hiện thủ thuật tại giường/ buồng bệnh hoặc dưới hướng dẫn của phương tiện chẩn đoán hình ảnh khác (siêu âm, nội soi), một số nội dung trong quy trình có thể có thay đổi.

4.2. Nhận định kết quả

- Đọc kết quả và nhận định kết quả: BS đọc tiêu bản trên KHV quang học, đánh giá loại tế bào, hình thái, màu sắc, mật độ tế bào trên tiêu bản nhuộm.

- Tiêu bản chất lượng tốt gồm các tiêu chuẩn:

+ Các tế bào tập trung chủ yếu ở trung tâm tiêu bản, lớp tế bào mỏng đều.

+ Các tế bào bắt màu rõ nhân và bào tương: nhân tím xanh, bào tương hồng nhạt, hồng cầu xanh nhạt.

- Phiên giải và báo cáo kết quả:

+ Phiên giải kết quả cần kết hợp với các thông tin lâm sàng, cận lâm sàng của BN qua hỏi bệnh, khám bệnh và/hoặc xem bệnh án. Các kết quả có giá trị cảnh báo (VD: nghi ngờ ác tính) cần được ghi vào phiếu kết quả XN hoặc báo cho BS khám, điều trị.

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

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- KTY ghi kết quả vào Sổ xét nghiệm tế bào (BM1/QTXN.GP.1.2) và trả kết quả bản cứng cho NB tại phòng xét nghiệm tế bào học.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 9 trên 11
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.1.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chọc hút kim nhỏ	31/12/2024

- Lưu tiêu bản tại khoa trong thời gian quy định:
- + Các trường hợp kết quả tế bào lành tính: 6 tháng.
- + Các trường hợp kết quả tế bào ác tính hoặc nghi ngờ ác tính: 1 năm.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

- Nhầm bệnh nhân: Cần hỏi đầy đủ thông tin họ tên đầy đủ, tuổi của bệnh nhân trước khi thực hiện thủ thuật.
- Sai phiếu chỉ định XN: Nhân viên phòng XN kiểm tra đúng loại phiếu, nếu sai cần báo cho NB/NNNB.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

- Nhầm vị trí lấy mẫu: Xác định vị trí lấy mẫu theo yêu cầu của BS chỉ định xét nghiệm. Kết hợp khám, hỏi NB/NNNB và/hoặc xem trên bệnh án điện tử.
- Không đánh giá đúng khả năng thực hiện thủ thuật: Một số tổn thương không nên chọc hút như nốt rất nhỏ ($< 0,5\text{cm}$), nông trên da hoặc rất sâu, hoặc gần vị trí nguy hiểm, sẹo xơ, phần xương cứng chồi lên.
- Chọc vào mạch máu: Trước khi chọc hút cần đánh giá các vị trí gần mạch máu để tránh đâm kim vào. Nếu xảy ra cần rút ngay kim và băng ép vào vị trí chọc hút.
- Dịch chọc hút có thể bị khô trong lòng kim hoặc khô trên phiến đồ trước khi dàn: chọc hút nhanh, phụt nhanh ra lam kính đã chuẩn bị sẵn và dàn ngay.
- Phiến đồ tế bào không thỏa đáng và cần thực hiện tốt kỹ thuật:
 - + Rất ít tế bào/ không lấy được tế bào tổn thương: do mũi kim chọc quá nông/ quá sâu hoặc cố định không tốt vùng cần chọc hút.
 - + Quá nhiều hồng cầu: tránh đâm kim vào vị trí mạch máu.
 - + Phiến đồ dàn quá dày làm tế bào chồng chất hoặc kéo mạnh làm tế bào kéo dài, nát.
 - + Cố định kém làm tế bào thoái hóa không nhận định được hình thái nhân, bào tương.
 - + Các tế bào bắt màu quá nhạt: cần nhuộm đủ thời gian hoặc kiểm tra chất lượng thuốc nhuộm.
 - + Tiêu bản nhuộm đậm màu: tẩy bớt màu bằng cồn và/hoặc giảm nồng độ thuốc nhuộm.
- Nhầm tiêu bản giữa các bệnh nhân: Cần đối chiếu đúng BN và tên BN trên lam kính.

	<i>BỘ Y TẾ</i>	<i>Trang 10 trên 11</i>
	<i>BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG</i>	<i>QTXN.GP.1.2</i>
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chọc hút kim nhỏ</i>	<i>31/12/2024</i>

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

- Nhắm NB khi vào kết quả XN : Kiểm tra kỹ phiếu chỉ định và tiêu bản của NB, ghi mô tả/ chẩn đoán trên phiếu chỉ định trước khi vào kết quả trên máy.

- Trả nhầm phiếu kết quả cho NB khác: Cần đọc rõ họ tên đầy đủ của NB để người nhà nhận đúng phiếu kết quả. Nếu có 2 NB trùng tên toàn bộ, cần đối chiếu thêm thông tin khác (tuổi, địa chỉ, mã y tế).

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện đánh giá chất lượng tiêu bản theo tiêu chuẩn (mục 4.2).
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị.
- Đào tạo và đánh giá năng lực nhân viên hàng năm.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ Y tế Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tế bào học
- Cytopathology checklist (2022). College of American Pathologists.
- Hagerty K (2021). Fine needle aspiration. Journal Article:1-4.
- Sigmon DF, Fatima S (2021). Fine needle aspiration. StatPearls Publishing, Treasure Island.

PHỤ LỤC

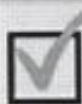


XÉT NGHIỆM TẾ BÀO HỌC NHỮNG ĐIỀU CẦN BIẾT



Xét nghiệm Tế bào học qua chọc hút kim nhỏ là gì?

Xét nghiệm Tế bào học qua chọc hút kim nhỏ là xét nghiệm lấy dịch hay mẫu tế bào từ tổ chức bệnh bằng kim nhỏ, làm tiêu bản và nhuộm, soi dưới kính hiển vi quang học để định hướng và hỗ trợ chẩn đoán bệnh.



Khi nào nên làm xét nghiệm?



- Khi sờ thấy các khối bất thường trên cơ thể (khối sưng - u của da, mô mềm, tuyến giáp, tuyến vú,...)
- Hạch to ở cổ, nách, bẹn hay vị trí khác
- Các tổn thương dạng nang hay vùng tổn thương có dịch, máu, dịch khớp ...
- Một số trường hợp tổn thương sâu, có thể phối hợp siêu âm để làm xét nghiệm.

- Vị trí khó thực hiện: cạnh nhãn cầu, gần mạch máu lớn
- Bệnh nhân rối loạn tâm lý, hành vi
- Bệnh nhân có rối loạn đông máu, chảy máu



Bệnh nhân **không** cần nhịn ăn trước khi làm xét nghiệm Tế bào học!



Kết quả xét nghiệm được trả sau 1-2h tại Phòng xét nghiệm Tế bào học.



Một số biến chứng có thể gặp và cách xử trí

- Đau, sưng nhẹ tại vị trí chọc kim sau khi làm thủ thuật: triệu chứng sẽ tự hết sau 24-48 giờ
- Đau sưng lâu hết tại vị trí chọc kim: có thể do nhiễm trùng tại chỗ, cha mẹ cần đưa trẻ đến trung tâm y tế khám lại
- Chảy máu nhỏ tại vị trí chọc kim: thay băng ép, hết chảy máu sau 5-7 phút
- Nếu chảy máu nhỏ lâu cầm (thường ở bệnh nhân có rối loạn chức năng đông máu - chảy máu, giảm tiểu cầu hoặc căn nguyên khác), cha mẹ cần đưa trẻ đến trung tâm y tế kiểm tra thêm.

Địa chỉ liên hệ: Phòng xét nghiệm tế bào học C102, tầng 1 - Tòa nhà A
Bệnh viện Nhi Trung ương, số 18/B79, Đường La Thành, Quận Đống Đa, Hà Nội.
Điện thoại: 024 6273 8621. Email: kgpb@nch.gov.vn.
Giờ làm việc: Thứ 2 đến thứ 6: Sáng: 7:00 - 12:00. Chiều: 13:30 - 16:30

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ
NHUỘM GIEMSA TRÊN PHIẾN ĐỒ
QTXN.GP.2.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Nguyễn Thị Huyền Trang	KTY Khoa giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó giám đốc Bệnh viện	

Hà Nội – 2024



	BỘ Y TẾ	Trang 2 trên 7
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.2.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm Glemsa trên phiến đồ	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/01/2022	Soạn thảo mới
2	31/12/2024	Cập nhật quy trình theo định dạng mới

Phân phối:

Khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này giúp cho nhân viên khoa Giải phẫu bệnh (GPB) thực hiện được kỹ thuật nhuộm Giemsa trên phiến đồ

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Nguyên lý của phương pháp này dựa trên nhóm phosphat của phẩm nhuộm gắn với liên kết adenin - thymine, liên kết có nhiều ở DNA trong tế bào. Phản ứng oxy hóa sẽ tạo ra màu xanh của metylen ở nhân tế bào, bào tương tế bào có thể bắt màu xanh hoặc hồng. Hiện nay, phương pháp nhuộm Giemsa được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán tế bào học trên các phiến đồ chọc hút kim nhỏ hay phiến đồ áp.

Chữ viết tắt:

- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- KHVQH: Kính hiển vi quang học
- NB: Người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ: 01

Kỹ thuật y: 01

Hộ lý: 01

2.2. Vật tư:

2.2.1. Hóa chất

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
Dung dịch Giemsa 20%	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn tuyệt đối	ml	Nhiệt độ phòng
Nước cất	ml	Nhiệt độ phòng

2.2.2. Vật tư

- Lam kính thường, lamelle.
- Pipet nhựa, giá để tiêu bản.
- Găng tay không bột tan, khẩu trang y tế.

	BỘ Y TẾ	Trang 4 trên 7
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.2.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm Giemsa trên phiên đồ	31/12/2024

- Giấy A4, giấy in tem chống thấm nước và hóa chất, giấy thấm tiêu bản, bút chì, bút dạ dầu.

2.3. Trang thiết bị:

- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại), cốc đong loại 100ml và 20ml.

- Máy ly tâm, bàn hơi tiêu bản.

- KHVQH 1 đầu, KHVQH nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn ca bệnh.

- Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản.

- Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26°C, đảm bảo an toàn sinh học.

- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại), máy lọc nước RO, vòi nước ngược rửa mắt.

- Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm: không áp dụng

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm:

- Loại mẫu bệnh phẩm:

+ Máu ngoại vi

+ Dịch các màng tim, phổi, bụng, khớp, dịch não tủy....

+ Dịch chọc hút tế bào qua kim nhỏ....

- Chuẩn bị các lam kính chuyên dụng có mã số, ký hiệu tương ứng với từng bệnh nhân, phết dịch/ly tâm dịch lên lam tương ứng.

2.4.3. Phiếu chỉ định xét nghiệm

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

- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.

- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.

- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.

- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật

Tổng thời gian ước tính: 1-2 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 10-30 phút.

- Thời gian nhuộm: 20 phút.

- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 30 phút.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương và phòng xét nghiệm tế bào học thuộc khoa Giải phẫu bệnh.

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.

- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện: Theo bảng tóm tắt Hướng dẫn quy trình kỹ thuật nhuộm Giemsa trên phiến đồ (TT/QTXN.GP.2.2)

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Tiêu bản được dàn từ dịch chọc hút kim nhỏ, dịch các màng trong cơ thể, để khô tự nhiên/ hơ trên bàn hơ tiêu bản.	
2	Cố định tiêu bản bằng cồn tuyệt đối, để khô.	30 giây
3	Phủ dung dịch Giemsa 20%	15 phút
4	Rửa nước chảy	1 phút
5	Để khô, gắn lamên	
6	Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản	

4.2. Nhận định kết quả

- Nội kiểm tra đánh giá tiêu bản nhuộm chứng:

+ Đạt: Tiếp tục đánh giá tiêu bản nhuộm mẫu bệnh.

+ Không đạt: yêu cầu kiểm tra lại toàn bộ quy trình kỹ thuật, sinh phẩm và cất nhuộm lại từ đầu.

- Tiêu chí đánh giá:

+ Sắt/ hemosiderin: màu xanh.

+ Hồng cầu: màu vàng.

+ Bạch cầu đa nhân trung tính: màu tím

+ Bạch cầu đa nhân ái toan: màu đỏ

+ Các loại tế bào khác: nhân màu tím đỏ, bào tương xanh nhạt.

- Đọc kết quả và nhận định kết quả

Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học để đánh giá tổn thương.

- Phiên giải và báo cáo kết quả:

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường:

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình công bố và trả kết quả xét nghiệm (QTQL.GP.8). Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

- Lưu khối nền và tiêu bản theo quy trình lưu trữ mẫu và hủy bệnh phẩm (QTQL.GP.6) theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Viết sai mã GPB	Cấp trùng lặp/ sai mã GPB	-Vào sổ trước khi thực hiện KT

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Tiêu bản nhạt màu/ bắt màu thuốc nhuộm kém	Pha hóa chất không đúng tỷ lệ Không thay hóa chất hằng ngày	Pha lại hóa chất theo đúng tỷ lệ Hóa chất phải thay mới hằng ngày
Tiêu bản quá dày, khó quan sát	Dàn tiêu bản quá dày	Dàn mỏng bệnh phẩm
Tiêu bản bị bong	Cố định khi tiêu bản chưa khô	Để tiêu bản khô hoàn toàn trước khi cố định

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bàn giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy

sổ bàn giao		trình bàn giao tiêu bản
Đọc kết quả	- Đọc nhằm tiêu bản - Kết luận nhằm	- Kiểm tra lại tiêu bản - Đọc lại và sửa đổi kết quả
Báo cáo và trả kết quả nhằm NB này với NB khác	- Nhầm lẫn giữa các phiếu chỉ định - Nhầm tên NB	- Kiểm tra lại thông tin NB - Kiểm tra lại phiếu trả kết quả - Thông báo ngay tới bác sĩ lâm sàng và NB để trả lại kết quả

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
 - + Sử dụng mẫu chứng dương đã đánh giá chất lượng
 - + Nhuộm giemsa trên mẫu chứng khi nhập hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất.
 - + Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.
 - Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện đánh giá trên mẫu bệnh.
 - Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục và đánh giá lại. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.
- Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng hoặc so sánh liên phòng.
 - Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ.
 - Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo.
 - Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế (2016). Nhuộm giemsa trên phiến đồ. *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh - Tế bào học*. Nhà xuất bản y học, 124: 388 - 390.

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT
VỀ NHUỘM DIFF - QUICK
QTXN.GP.3.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Lê Thị Quỳnh	KTV Khoa Giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó giám đốc Bệnh viện	

Hà Nội – 2024



	BỘ Y TẾ	Trang 2 trên 7
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.3.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Diff - Quick	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/01/2022	Phiên bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật nội dung theo định dạng mới

Phân phối:

Phòng xét nghiệm của khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này nhằm mục đích hướng dẫn nhân viên khoa Giải phẫu bệnh thực hiện được kỹ thuật nhuộm Diff-Quick.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Đây là phương pháp nhuộm nhanh tế bào và mô dựa trên sự cải tiến của phương pháp nhuộm Giemsa, nó có ưu điểm hơn phương pháp nhuộm Giemsa. Phương pháp này cho phép đánh giá nhân, bào tương tế bào, các tế bào chế nhày, chất nhày, hồng cầu, vi khuẩn.

Chữ viết tắt:

- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- HE: Hematoxylin Eosin.
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- KHVQH: Kính hiển vi quang học
- NB: Người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ: 01

Kỹ thuật y: 01

Hộ lý: 01

2.2. Vật tư:

2.2.1 Hóa chất: Sử dụng bộ kit pha sẵn Kwik-Diff

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
Kwik-Diff Solution 1 (Fixative)	ml	Nhiệt độ phòng
Kwik-Diff Solution 2 (Eosin)	ml	Nhiệt độ phòng
Kwik-Diff Solution 3 (Methylene Blue)	ml	Nhiệt độ phòng
Nước cất	ml	Nhiệt độ phòng
Dung dịch thay thế xylene hoặc xylene	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn tuyệt đối	ml	Nhiệt độ phòng
Cồn 95°	ml	Nhiệt độ phòng

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 4 trên 7
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.3.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm Diff - Quick	31/12/2024

2.2.2. Vật tư:

- Lam kính thường, lam kính tích điện dương super frost, lamelle.
- Pipet nhựa, que dàn bệnh phẩm.
- Giá để tiêu bản, bể nhuộm, khay đá.
- Găng tay không bột tan, khẩu trang y tế.
- Giấy A4, giấy in tem chống thấm nước và hóa chất, giấy thấm tiêu bản, bút chì, bút dạ dầu.
- Bơm tiêm 20ml, bông y tế, cồn 70° hoặc dung dịch sát khuẩn tay nhanh, urgo nhiều kích cỡ, băng dán y tế.

2.3. Trang thiết bị:

- KHVQH 1 đầu, KHVQH nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn ca bệnh.
- Tủ lạnh có ngăn làm đá, tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2-8°C.
- Tủ âm, tủ hút mùi hóa chất, tủ đựng hóa chất chống cháy lan, tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất.
- Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khối nền.
- Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21-26°C, đảm bảo an toàn sinh học
- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại), máy lọc nước RO, vòi nước ngược rửa mắt.
- Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư.
- Bàn hơ tiêu bản.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm: QT chọc hút tế bào bằng kim nhỏ.

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm:

- Loại mẫu bệnh phẩm: Phiến đồ tế bào học chọc hút kim nhỏ.
- Phiến đồ dịch các màng và dịch cơ thể khác.
- Bảo quản mẫu trong ngăn mát tủ lạnh (2-8°C).

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.
- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.
- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ)

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

Tổng thời gian ước tính: 1 – 5 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 30 phút.
- Thời gian nhuộm: 1 – 5 phút.
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 30 phút – 5 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương và phòng xét nghiệm tế bào học thuộc khoa Giải phẫu bệnh.

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.

- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện: Thực hiện theo bảng tóm tắt quy trình kỹ thuật nhuộm Diff – Quick (TT/QTXN.GP.3.2)

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Phiến đồ để khô tự nhiên	1-5 phút
2	Cố định phiến đồ bằng dung dịch 1	5 giây
3	Thấm tiêu bản bằng giấy thấm	30 giây
4	Nhuộm tiêu bản bằng dung dịch 2	5 giây
5	Thấm tiêu bản bằng giấy thấm	30 giây
6	Nhuộm tiêu bản bằng dung dịch 3	20 giây
7	Rửa nước cất	10 giây
8	Làm khô tiêu bản	5 phút
9	Đánh giá chất lượng nhuộm và bàn giao tiêu bản	

Chú ý: Những tiêu bản cần lưu lại sẽ được gắn lamen để bảo quản được lâu.

4.2. Nhận định kết quả

- Hồng cầu: màu hồng/vàng đỏ.
- Tiểu cầu: màu tím/hạt màu tím.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

- Bạch cầu đa nhân trung tính: nhân màu xanh, bào tương màu hồng tím.
- Bạch cầu ái toan: nhân màu xanh, bào tương màu xanh, các hạt màu đỏ.
- Bạch cầu ưa kiềm: nhân màu tím hoặc xanh đen.
- Bạch cầu đơn nhân: nhân màu tím, bào tương xanh sáng.
- Vi khuẩn: màu xanh.
- Đọc kết quả và nhận định kết quả: Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.
- Phiên giải và báo cáo kết quả.
- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: Bác sỹ đọc sẽ phối hợp đặc điểm mô học, kết quả nhuộm, thông tin lâm sàng, cận lâm sàng để phân tích và đánh giá kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình công bố và trả kết quả xét nghiệm (QTQL.GP.8). Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.
- Lưu tiêu bản theo quy trình lưu trữ mẫu và hủy bệnh phẩm (QTQL.GP.6) theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Nhầm mẫu của NB này với NB khác	- Nhân viên lấy mẫu dán nhầm code, viết sai thông tin NB. - Ghi sai số GPB trên tiêu bản sau khi dán bệnh phẩm trên lam kính	- Đối chiếu lại thông tin: Mã y tế, mã GPB, báo lại với nhân viên giao mẫu để kiểm tra và đối chiếu. - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm sau khi kiểm tra đúng thông tin của NB. - Lấy lại bệnh phẩm.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bong trôi mất bệnh phẩm	- Bệnh phẩm cố định không tốt, dán tiêu bản quá dày, rửa tiêu bản	- Làm lại tiêu bản khác, lấy lại bệnh phẩm.

	quá mạnh dưới vôi nước chảy.	
Tiêu bản bắt màu không đạt	- Không đảm bảo thời gian nhuộm, hóa chất dùng lâu giảm chất lượng hoặc hết hạn sử dụng không được thay mới.	- Nhuộm lại tiêu bản cho tới khi bắt màu đạt yêu cầu. - Thay hóa chất định kỳ.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bản giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bản giao tiêu bản.
Độc kết quả	- Đọc nhầm tiêu bản - Kết luận nhầm	- Kiểm tra lại tiêu bản. - Đọc lại và sửa đổi kết quả
Báo cáo và trả kết quả nhầm NB này với NB khác	- Nhầm lẫn giữa các phiếu chỉ định - Nhầm tên NB	- Kiểm tra lại thông tin NB. - Kiểm tra lại phiếu trả kết quả. - Thông báo ngay tới bác sĩ lâm sàng và NB để trả lại kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ
- Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ tài liệu hướng dẫn sử dụng của hãng Kwik-Diff
- Bộ y tế (2016). Nhuộm diff quick. *Hướng dẫn quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh - Tế bào học*. Nhà xuất bản y học, 123: 386 – 387.

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ
KHỐI TẾ BÀO (CELL BLOCK)
QTXN.GP.13.2

Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Trần Thị Kim Tiến	KTY Khoa giải phẫu bệnh	
Xem xét	Hoàng Ngọc Thạch	Trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó Giám đốc Bệnh viện	



Hà Nội – 2024

	BỘ Y TẾ	Trang 2 trên 8
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.13.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về khối tế bào (cell block)	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	06/01/2022	Phiên bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật nội dung theo định dạng mới

Phân phối:

Phòng xét nghiệm của khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Quy trình này giúp cho kỹ thuật viên khoa Giải phẫu bệnh (GPB) thực hiện thành thạo kỹ thuật đúc khối tế bào (cell block).

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Các tế bào trong các dịch chọc hút hoặc dịch màng trong cơ thể có thể tập trung thành một khối, đưa vào chuyên, đúc, cắt nhuộm giống qui trình mô học thường quy, tiết kiệm tối đa mẫu bệnh phẩm lấy ra khỏi cơ thể người bệnh.

Sử dụng dung dịch Gel matrix hoặc thạch agar 3% hòa tan với dung dịch chứa tế bào nhưng có thể đông lại để tạo khối cố định các tế bào tại một vị trí cố định. Dung dịch có thể thay đổi tính chất vật lý theo nhiệt độ từ lỏng sang đặc ở nhiệt độ thấp tạo khối rắn.

Chữ viết tắt:

- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- HE: Hematoxylin Eosin.
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- KHVQH: Kính hiển vi quang học
- NB: Người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện:

Bác sĩ: 01

Kỹ thuật y: 01

Hộ lý: 01

2.2. Vật tư:

2.2.1 Hóa chất: Hóa chất pha theo (TT/QTXN.GP.13.1)

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
Dung dịch thạch agar 3% + Bột thạch agar : 3g + Nước cất: 100ml Hòa tan thạch trong nước cất và đun sôi trong lò vi sóng	ml	Nhiệt độ 2-8°C
Acid acetic 1%	ml	Nhiệt độ phòng

Dung dịch Formol đậm trung tính 10%	ml	Nhiệt độ phòng
-------------------------------------	----	----------------

2.2.2 Vật tư:

- Lam kính thường, lamelle.
- Pipet nhựa, casset, que gồ có đầu nhọn.
- Giá để tiêu bản, bể nhuộm.
- Găng tay không bột tan, khẩu trang y tế.
- Giấy A4, giấy in tem chống thấm nước và hóa chất, giấy thấm tiêu bản, bút chì, bút dạ dầu.

2.3. Trang thiết bị:

- Lò vi sóng, cân điện tử.
- Máy ly tâm để bàn (laboratory centrifuge) và máy ly tâm tế bào (cytocentrifuge)..
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại), cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 20ml.
- KHVQH 1 đầu, KHVQH nhiều đầu cho chẩn đoán và hội chẩn ca bệnh.
- Tủ lạnh có ngăn làm đá, tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2 – 8°C.
- Tủ ẩm, tủ hút mùi hóa chất, tủ đựng hóa chất chống cháy lan, tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất.
- Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khối nén.
- Phòng xét nghiệm: nhiệt độ phòng 21 – 26°C, đảm bảo an toàn sinh học.
- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại), máy lọc nước RO, vòi nước ngược rửa mắt.
- Các dụng cụ làm sạch trang thiết bị, vật tư.

2.4. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

2.4.1. Đối với QTKT lấy mẫu bệnh phẩm: không áp dụng.

2.4.2. Đối với QTKT về thực hiện xét nghiệm:

- Loại mẫu bệnh phẩm: là mẫu dịch cơ thể, mẫu dịch chọc hút kim nhỏ.
- Tiêu bản mẫu dịch nhuộm Giemsa/ Diff quick kèm theo.
- Mẫu dịch cần thực hiện xét nghiệm cần được mô tả các đặc điểm sau:
+ Thể tích (ml), màu sắc, tính chất dịch...
- Bảo quản mẫu dịch:

- + Mẫu dịch cần thực hiện xét nghiệm ngay sau khi lấy ra khỏi cơ thể.
- + Mẫu dịch nếu chưa được thực hiện xét nghiệm ngay có thể bảo quản trong điều kiện nhiệt độ 2 – 8°C trong 24 – 48 giờ.

2.5. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.
- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.
- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.6. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ)

Tổng thời gian ước tính: 72 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 12 giờ.
- Thời gian nhuộm: 24 giờ.
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 36 giờ.

2.7. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.
- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).
- Hiệu chuẩn vật tư, thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện: Thực hiện theo Tóm tắt quy trình kỹ thuật đúc khối tế bào (TT/QTXN.GP.13.2)

Bước	Nội dung	Thời gian
1	Ly tâm ống dịch bằng máy tập trung tế bào 2000 vòng/phút	10 phút
2	Loại bỏ phần dịch nổi phía trên	
3	- Nếu dịch trong, rất ít/không lắng cặn: (0,5 – 1ml) + Dùng pipet paster hút thạch ở thể lỏng, nhỏ 3 – 4 giọt	

vào khuôn đúc. + Sau khi thạch trở nên bán rắn, tạo một vết lõm nhỏ ở trung tâm khuôn thạch. + Dùng pipet paster lấy lượng cận tế bào vừa ly tâm được nhỏ vào vết lõm . + Dùng pipet paster nhỏ 1-2 giọt thạch lỏng để che phủ vết lõm. + Để thạch đông đặc hoàn toàn ở nhiệt độ phòng hoặc trong tủ lạnh 2 – 8°C. + Dùng que gỗ có đầu nhọn tách nhẹ khuôn thạch ra khỏi casset. + Khuôn thạch được bỏ vào casset có ghi nhãn dán, cố định trong formol tối thiểu 4h và tiếp tục quy trình xử lý dưới dạng mẫu mô. - Nếu dịch có lắng cặn > 1ml: + Cố định cặn tế bào bằng dung dịch formol 10% tối thiểu 1 giờ. + Ly tâm bệnh phẩm lần nữa với tốc độ 2000 vòng/ phút trong 10 phút. + Loại bỏ dịch nổi phía trên. + Dùng que gỗ có đầu nhọn tách nhẹ phần cặn đã đông cục và đặt vào casset có ghi nhãn. + Tiếp tục xử lý dưới dạng mẫu mô.	
---	--

Chú ý: Trong bước 3 của quy trình nhuộm, dung dịch thạch agar 3% chỉ đun nóng trước khi sử dụng và được bảo quản trong ngăn mát tủ lạnh 2 – 8°C.

4.2. Nhận định kết quả

- KTV đánh giá khối cặn tế bào: Casset nhựa chứa khối tế bào sau khi đã được chuyển qua các bước xử lý mô học còn nguyên vẹn, rắn, tập trung được tế bào.

- Đọc kết quả và nhận định kết quả: Bác sỹ Giải phẫu bệnh thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học, đối chiếu với tiêu bản Giemsa/ Diff quick để đánh giá tổn thương.

- Phiên giải và báo cáo kết quả.

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường: Bác sỹ đọc sẽ phối hợp đặc điểm mô học, kết quả nhuộm, thông tin lâm sàng, cận lâm sàng để phân tích và đánh giá kết quả.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo quy trình công bố và trả kết quả xét nghiệm (QTQL.GP.8). Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

- Lưu khối nền và tiêu bản theo quy trình lưu trữ mẫu và hủy bệnh phẩm (QTQL.GP.6) theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Nhầm mẫu của NB này với NB khác	- Nhân viên lấy mẫu dán nhầm code, viết sai thông tin bệnh - Ghi sai số GPB trên lọ đựng bệnh phẩm và casset có nhãn dán	- Đối chiếu lại thông tin: Mã y tế, mã GPB, báo lại với nhân viên. - Thực hiện lấy lại mẫu.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Không tập trung được tế bào, tế bào bị tràn ra ngoài vết lõm	Tạo vết lõm quá nhỏ hoặc lượng dịch chứa cần được lấy quá nhiều	- Tạo vết lõm đủ rộng để chứa cần tế bào. - Loại bỏ tối đa lượng dịch trong nổi phía trên sau khi ly tâm.
Khuôn thạch bị vỡ, không thành khối đồng nhất	- Tách thạch khỏi khuôn đúc quá sớm khi thạch chưa đông hoàn toàn	- Đảm bảo thạch đông đặc hoàn toàn trước khi tách khỏi khuôn đúc.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục
Bệnh phẩm bị vỡ, không tạo thành khối đồng nhất	Tách bệnh phẩm/ thạch khi thạch chưa đông đặc hoàn toàn	Đảm bảo tách bệnh phẩm/ thạch khi đã đông đặc hoàn toàn
Bệnh phẩm bị	- Thời gian cố định BP không	- Chuyển BP theo qui

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

sống, mềm mủn	đủ, BP quá dày. - Hóa chất formol, cồn, xylen và nền cũ không đảm bảo. - Thiếu hóa chất, hóa chất bị cạn không ngập hết BP.	trình ngược lại xylen, cồn, formol đảm bảo BP về trạng thái không còn paraffin sau đó chuyển lại theo quy trình. - Thường xuyên kiểm tra hóa chất, thay mới và bổ xung theo lịch định kỳ và trước khi chạy máy.
---------------	---	--

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng thông qua nhuộm sơ bộ bằng phương pháp nhuộm Hematoxylin & Eosin.
- Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng hoặc so sánh liên phòng.
- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ.
- Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo.
- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ Y tế Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tế bào học
- Thông tư số 01/2013/TT-BYT ngày 11/01/2013 của Bộ trưởng Bộ Y tế, “Hướng dẫn thực hiện quản lý chất lượng xét nghiệm tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh”.
- Journal of Cytology (2020), *Indian Academy of Cytologists Guidelines for Collection, Preparation, Interpretation, and Reporting of Serous Effusion Fluid Samples*, Volume 37, Issue 1

BỘ Y TẾ
BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG



HƯỚNG DẪN QUY TRÌNH KỸ THUẬT VỀ
NHUỘM HAI MÀU HEMATOXYLIN – EOSIN
TRÊN MÔ
QTXN.GP.14.2



Phiên bản: 2

Ngày hiệu lực: 31/12/2024

	Họ tên	Chức vụ	Chữ ký
Soạn thảo	Phan Thị Huyền	Nhân viên QLCL Khoa giải phẫu bệnh	
Xem xét	Phó Hồng Điệp	Phó trưởng khoa Giải phẫu bệnh	
Phê duyệt	Cao Việt Tùng	Phó giám đốc Bệnh viện	



Hà Nội – 2024

	BỘ Y TẾ	Trang 2 trên 12
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.14.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm hai màu Hematoxylin – Eosin trên mô	31/12/2024

Lịch sử thay đổi tài liệu

Phiên bản	Ngày hiệu lực	Sửa đổi
1	01/10/2023	Bản mới
2	31/12/2024	Cập nhật định dạng mới

Phân phối:

Phòng xét nghiệm của khoa Giải phẫu bệnh: 01 bản

	BỘ Y TẾ	Trang 3 trên 12
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.14.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm hai màu Hematoxylin – Eosin trên mô	31/12/2024

1. ĐẠI CƯƠNG

1.1. Mục đích của kỹ thuật

Hướng dẫn các bước thực hiện quy trình nhuộm Hematoxylin – Eosin trên mô giúp đánh giá khái quát cấu trúc, hình thái mô và tế bào.

1.2. Định nghĩa, nguyên lý

Hematoxylin và eosin (HE) là phương pháp nhuộm được sử dụng rộng rãi nhất giúp thể hiện các cấu trúc mô khác nhau một cách rõ ràng. Hematoxylin nhuộm nhân tế bào màu xanh đen, hiển thị chi tiết hạt nhân rõ ràng, trong khi eosin nhuộm tế bào chất của tế bào và hầu hết các sợi mô liên kết với các sắc thái và cường độ khác nhau của màu hồng, cam và đỏ.

1.3. Chữ viết tắt:

- DD: Dung dịch
- GPB: Giải phẫu bệnh
- HE: Hematoxylin - Eosin.
- MSDS: Bảng chỉ dẫn an toàn hóa chất (Material Data Safety Sheets)
- KHVQH: Kính hiển vi quang học
- NB: Người bệnh

2. CHUẨN BỊ

2.1. Người thực hiện: Nhân lực trực tiếp

Bác sĩ Giải phẫu bệnh : 01

Kỹ thuật y : 01

Hộ lý : 01

2.2. Hóa chất, dụng cụ, vật tư:

2.2.1. Hóa chất:

Tên hóa chất	Đơn vị	Bảo quản
DD thay thế xylen (hoặc xylen)	ml	15-26°C
Cồn tuyệt đối	ml	15-26°C
Cồn 96°	ml	15-26°C
DD Hematoxylin Mayer (*)	ml	15-26°C

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

DD Eosin Y (*)	ml	15-26°C
Nước cất	ml	15-26°C
DD gắn lamelle	ml	15-26°C
DD rửa tay	ml	15-26°C
DD khử khuẩn bề mặt	ml	15-26°C
Khử khuẩn Presept 2,5 gram	viên	15-26°C

(*): Hóa chất pha: xem Phụ lục 1. Chuẩn bị hóa chất pha.

2.2.2. Dụng cụ, vật tư:

- Dao cắt tiêu bản sử dụng một lần.
- Lam kính thường
- Lá kính (lamelle)
- Que tải bệnh phẩm.
- Kẹp không mẫu các kích cỡ
- Khay nhôm làm đá lạnh.
- Giá để tiêu bản nằm, đứng.
- Bể nhuộm
- Dụng cụ bằng thủy tinh hoặc bằng nhựa đựng hóa chất sau pha (tùy mỗi loại)
- Cốc đong loại 1000ml, 500ml, 100ml và 50ml.
- Găng tay không bột tan.
- Khẩu trang, mũ, quần áo y tế.
- Bút chì, bút dạ dầu.
- Giấy A4.
- Giấy in tem chống thấm nước, hóa chất.
- Cuộn mực in tem.
- Giấy thấm tiêu bản.
- Giấy lau tay.
- Hộp đựng rác thải sắc nhọn.
- Thùng, túi đựng rác thải các loại.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 5 trên 12
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.14.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm hai màu Hematoxylin – Eosin trên mô	31/12/2024

2.3. Trang thiết bị:

- Máy cắt mảnh bệnh phẩm (máy cắt vi phẫu microtome).
- Máy nhuộm đặc biệt (nếu có).
- Bể dàn tiêu bản.
- Máy gắn lamelle tự động (nếu có).
- Máy khuấy từ.
- Cân điện tử.
- Kính hiển vi quang học.
- Tủ ẩm.
- Tủ hút mùi hóa chất.
- Tủ lạnh có ngăn làm đá.
- Tủ đựng hóa chất chống cháy lan.
- Tủ đựng hóa chất có hệ thống lọc khí, hóa chất.
- Tủ lạnh lưu trữ hóa chất nhiệt độ 2 – 8°C.
- Hệ thống tủ lưu trữ tiêu bản, khối nén.
- Máy in tem/nhãn.
- Hệ thống lavabo cấp thoát nước (có đường thải hóa chất độc hại).
- Máy lọc nước RO 2 lần.
- Các trang thiết bị, dụng cụ vệ sinh, làm sạch.

2.3. Chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

- Loại mẫu bệnh phẩm: mẫu nén cần nhuộm HE để đánh giá.
- Chuẩn bị các lam kính có mã số, ký hiệu tương ứng với từng tiêu bản nhuộm. Cắt từ mẫu nén 1 hay nhiều lát với độ dày 3-5µm gắn lên mỗi lam kính. Xem *Hướng dẫn cắt mẫu nén bệnh phẩm (HDCV.GP.8)*.
- Đặt các tiêu bản vào tủ ẩm nhiệt độ 60°C trong 1 giờ.

2.4. Phiếu chỉ định xét nghiệm

- Có đầy đủ thông tin về người bệnh (họ tên, tuổi, giới, địa chỉ, điện thoại), khoa phòng yêu cầu xét nghiệm, loại xét nghiệm yêu cầu.
- Có ghi chẩn đoán lâm sàng, loại mẫu cần làm xét nghiệm.

	BỘ Y TẾ	Trang 6 trên 12
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.14.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm hai màu Hematoxylin – Eosin trên mô	31/12/2024

- Có ghi thời gian chỉ định, họ tên và chữ ký của bác sĩ yêu cầu xét nghiệm.
- Ghi ngày giờ nhận mẫu và phiếu, người bàn giao và người nhận.
- Đối chiếu chỉ định và mẫu: tên, tuổi, loại bệnh phẩm, vị trí lấy mẫu.

2.5. Thời gian thực hiện kỹ thuật (ước tính, đơn vị là giờ)

Tổng thời gian ước tính: 5 giờ, trong đó:

- Thời gian chuẩn bị mẫu: 0,5 giờ.
- Thời gian nhuộm và hoàn thiện tiêu bản: 3,5 giờ.
- Thời gian phân tích kết quả, trả kết quả: 01 giờ.

2.6. Địa điểm thực hiện kỹ thuật

Tại khoa xét nghiệm Giải phẫu bệnh Bệnh viện Nhi Trung ương.

3. AN TOÀN

- Thực hiện các biện pháp an toàn theo Sổ tay an toàn của phòng xét nghiệm: an toàn sinh học, an toàn điện, an toàn cháy nổ, an toàn hoá chất.

- Sử dụng hoá chất sinh phẩm an toàn theo khuyến cáo của nhà sản xuất (tham khảo MSDS).

- Hiệu chuẩn và bảo dưỡng trang thiết bị định kỳ.

- Kiểm soát môi trường: Ánh sáng, tiếng ồn, nhiệt độ, độ ẩm.

4. CÁC BƯỚC TIỀN HÀNH

4.1. Các bước thực hiện:

Có hai phương thức gồm:

- Nhuộm bằng máy nhuộm tiêu bản (ưu tiên sử dụng).

- Nhuộm thủ công (nhuộm tay).

4.1.1. Thực hiện nhuộm bằng máy nhuộm tiêu bản. Xem Phụ lục 2: Hướng dẫn sử dụng máy nhuộm tiêu bản đối với nhuộm HE.

4.1.2. Thực hiện nhuộm thủ công (khi máy nhuộm tiêu bản bị lỗi/quá tải có thể dùng để thay thế):

Bước	Nội dung	Thời gian
Tẩy nền		
1	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 1	2 phút
2	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 2	2 phút

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	BỘ Y TẾ	Trang 7 trên 12
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.14.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm hai màu Hematoxylin – Eosin trên mô	31/12/2024

3	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 3	2 phút
4	Ngâm các tiêu bản vào cồn tuyệt đối	1 phút
5	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96°	1 phút
6	Ngâm các tiêu bản vào cồn 96°	1 phút
7	Ngâm các tiêu bản vào bể nước chảy	5 phút
Nhuộm tiêu bản		
8	Nhuộm tiêu bản trong DD Hematoxylin	5 phút
9	Rửa các tiêu bản trong bể nước chảy nhẹ	5 phút
10	Ngâm tiêu bản trong cồn 96°	2 phút
11	Ngâm tiêu bản trong DD Eosin Y	10 giây
12	Dội các tiêu bản bằng cồn 96°	5 giây
Khử nước		
13	Ngâm các tiêu bản vào bể cồn 96°	30 giây
14	Ngâm các tiêu bản vào bể cồn tuyệt đối đầu tiên	30 giây
15	Ngâm các tiêu bản vào bể cồn tuyệt đối tiếp theo	30 giây
16	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 4	30 giây
17	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 5	30 giây
18	Ngâm các tiêu bản vào DD thay thế xylen (hoặc xylen) bể 6	30 giây
19	Gắn lamelle bằng dung dịch gắn	
20	Hoàn thiện và bàn giao tiêu bản	

4.2. Nhận định kết quả

- Thực hiện nội kiểm kỹ thuật, nội kiểm kết quả theo *Quy trình nội kiểm tra chất lượng (QTQL.GP.4)*.

- Xem xét kết quả nội kiểm: Nếu kết quả nội kiểm không đạt cần kiểm tra lại các điều kiện cơ bản của kỹ thuật và khắc phục. Chỉ thực hiện xét nghiệm khi kết quả nội kiểm đạt yêu cầu.

	BỘ Y TẾ	Trang 8 trên 12
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.14.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm hai màu Hematoxylin – Eosin trên mô	31/12/2024

- Đọc kết quả và nhận định kết quả: Thực hiện đánh giá và phân tích kết quả trên tiêu bản dưới kính hiển vi quang học.

+ Nhân tế bào xanh đến xanh đen, màng nhân rõ nét, chất nền trong nhân sáng, mở rộng, chất nhiễm sắc rõ nét

+ Bào tương hồng đến đỏ đậm, tế bào cơ hồng đến đỏ đậm, hồng cầu đỏ cam sáng, sợi collagen hồng nhạt.

- Phiên giải và báo cáo kết quả: Bác sĩ đọc sẽ phối hợp đặc điểm mô học, kết quả nhuộm, thông tin lâm sàng, cận lâm sàng để đưa ra kết quả chẩn đoán trong báo cáo.

- Biện luận kết quả cho những trường hợp bất thường. Trường hợp đặc biệt khó chẩn đoán cần có sự hội chẩn của lãnh đạo khoa hoặc các chuyên gia và chỉ định thêm các xét nghiệm đặc biệt để hỗ trợ chẩn đoán.

4.3. Trả kết quả và lưu trữ hồ sơ

- Trả kết quả theo *Quy trình báo cáo và công bố kết quả (QTQL.GP.8)*. Kết quả có đầy đủ thông tin bệnh phẩm, kỹ thuật, chẩn đoán và người thực hiện. Lưu vào biểu mẫu theo quy định và lưu trữ hồ sơ.

- Lưu khối nền và tiêu bản theo *Quy trình lưu và hủy mẫu (QTQL.GP.6)* theo thời gian quy định.

5. NHỮNG SAI SÓT VÀ XỬ TRÍ

5.1. Trước khi thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Nhầm mẫu của NB này với NB khác Nhầm mẫu nền khác loại của cùng NB	- Kiểm tra thông tin trên hệ thống điện tử không chính xác (mã GPB, số thứ tự của khối nền) - Lấy nhầm khối nền - Ghi sai mã GPB sau khi cắt	- Đối chiếu lại thông tin: Mã y tế, mã GPB, số thứ tự khối nền. - Thực hiện lại quy trình xét nghiệm sau khi kiểm tra đúng thông tin của bệnh nhân
Sai mã GPB trên hệ thống phần mềm	Đánh nhầm mã GPB khi nhập chỉ định XN	- Sửa lại đúng mã GPB - Cẩn thận khi nhập mã.

5.2. Trong quá trình thực hiện kỹ thuật:

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Không kiểm soát nội	Nhân viên quên không	Đào tạo nhân viên và lập

	BỘ Y TẾ	<i>Trang 9 trên 12</i>
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.14.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm hai màu Hematoxylin – Eosin trên mô	31/12/2024

kiểm.	nội kiểm.	bảng nội kiểm.
Nhuộm tiêu bản không đạt: - Nhân nhạt/ đậm màu - Bảo tương và các thành phần khác nhạt/ đậm màu	- Thời gian nhuộm HE thiếu/ thừa - Hóa chất không đủ tiêu chuẩn	- Tuân thủ đúng quy trình nhuộm/ gắn - Thay hóa chất định kỳ
Tiêu bản chỉ được nhuộm một phần mẫu bệnh phẩm	- Không ngập hóa chất. - Chưa tẩy hết nền trong mẫu.	- Đảm bảo lượng hóa chất đủ ngập lam. - Thay hóa chất tẩy nền định kỳ.
Tiêu bản ám nước	Không khử hết nước trước khi gắn	Tuân thủ đúng thời gian loại nước. Thay hóa chất định kỳ.
Thiếu mẫu	- Bong một phần mẫu - Cắt chưa đủ thành	- Để tiêu bản khô hoàn toàn, cắt mẫu trên lam tích điện dương có chất gắn. - Cắt sơ bộ đến khi bằng mặt bệnh phẩm trước khi cắt lam nhuộm.

5.3. Sau khi thực hiện kỹ thuật

Tên lỗi	Nguyên nhân	Khắc phục- Phòng ngừa
Bản giao tiêu bản thiếu/ không ghi vào sổ bàn giao	Nhân viên không tuân thủ đúng quy trình	Yêu cầu nhân viên thực hiện đúng quy trình bàn giao tiêu bản
Báo cáo sai kết quả	Nhầm lẫn trong nhập kết quả	Đối chiếu cẩn thận kết quả trước khi trả.
Sai sót trong quy trình báo cáo và công bố kết quả	Nhân viên chưa nắm vững quy trình hoặc quy trình chưa rõ ràng.	Xem lại quy trình/ Đào tạo nhân viên nắm rõ quy trình trước khi trả kết quả.

6. TIÊU CHUẨN ĐÁNH GIÁ VÀ KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

- Thực hiện nội kiểm tra chất lượng:
- + Sử dụng mẫu chứng nội kiểm đã đánh giá chất lượng.

Ghi chú: Đây là tài liệu đã được kiểm soát. Bất cứ tài liệu nào không được đóng dấu của bệnh viện phải được kiểm tra trước khi sử dụng và cần được thông báo với nhân viên phụ trách. Lưu hành nội bộ.

	<i>BỘ Y TẾ</i>	<i>Trang 10 trên 12</i>
	<i>BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG</i>	<i>QTXN.GP.14.2</i>
	<i>Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm hai màu Hematoxylin – Eosin trên mô</i>	<i>31/12/2024</i>

+ Nhuộm HE trên mẫu chứng khi nhập, pha hoặc thay lô hóa chất, sinh phẩm mới hoặc khi thay đổi quy trình theo khuyến cáo của nhà sản xuất.

+ Đánh giá chất lượng theo tiêu chí đánh giá ở mục 4.2.

Nếu chất lượng nhuộm đạt yêu cầu sẽ thực hiện đánh giá trên mẫu bệnh.

Nếu không đạt yêu cầu, cần tìm hiểu nguyên nhân, khắc phục và đánh giá lại. Sau đó nếu đạt sẽ thực hiện nhuộm cùng mẫu bệnh.

- Thực hiện ngoại kiểm: theo chương trình ngoại kiểm của Trung tâm kiểm chuẩn chất lượng hoặc so sánh liên phòng.

- Hiệu chuẩn và hiệu chỉnh trang thiết bị định kỳ.

- Kiểm soát điều kiện môi trường đảm bảo.

- Đào tạo thường xuyên nhân viên về kỹ thuật, quản lý chất lượng và có hệ thống quản lý chất lượng theo tiêu chuẩn.

7. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Quyết định số 5199/QĐ-BYT ngày 25/12/2013 của Bộ Y tế Hướng dẫn Quy trình kỹ thuật chuyên ngành Giải phẫu bệnh – Tế bào học.

- Bancroft JD, Layton C (2019). The hematoxylin and eosin. Theory and Practice of Histological Techniques. Elsevier, 8th edition, 10: 126-137.

- Thomas C.Allen (1992). Mayer's Hematoxylin and eosin procedure. Laboratory methods in histopathology – AFIP: 53-55.

- Marilyn Gamble (2008). The Hematoxylin and eosin. Theory and Practice of Histological Techniques, 6th edition: 121-134.

	BỘ Y TẾ	Trang 11 trên 12
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.14.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm hai màu Hematoxylin – Eosin trên mô	31/12/2024

PHỤ LỤC 1

CHUẨN BỊ HÓA CHẤT PHA

1.1 Dung dịch Hematoxylin Mayer

- Nước cất	1000 ml
- Thêm Potassium hoặc Ammonium alum	50g (Khuấy từ 15 phút)
- Thêm Hematoxylin bột	1g (Khuấy từ 15 phút)
- Thêm Sodium iodate	0,2g (Khuấy từ 30 phút)
- Thêm Acid citric	1g (Khuấy từ 15 phút)
- Để qua đêm	
- Thêm Chloral hydrate SLR	50g

1.2. Dung dịch Eosin Y gồm:

* Eosin Y 1%	
- Eosin Y	1 g
- Nước cất	100ml
* Ploxin B 1%	
- Ploxin B	0,1 g
- Nước cất	10ml
* Cồn 96°	780ml
* Acid acetic nguyên chất	4ml

	BỘ Y TẾ	Trang 12 trên 12
	BỆNH VIỆN NHI TRUNG ƯƠNG	QTXN.GP.14.2
	Hướng dẫn quy trình kỹ thuật về nhuộm hai màu Hematoxylin – Eosin trên mô	31/12/2024

PHỤ LỤC 2

HƯỚNG DẪN SỬ DỤNG MÁY NHUỘM TIÊU BẢN ĐỐI VỚI NHUỘM HE

1. Bỏ nắp của các cốc đựng hoá chất. Không được để nắp và chường ngại vật khi bắt đầu khởi động máy.
2. Kiểm tra các cốc đựng hoá chất (lượng hoá chất ngang vạch)
3. Bật màn hình
4. Ấn “Select”
5. Ấn “Program”
6. Chọn chương trình phù hợp: **Nhuộm HE**
7. Ấn “Reagent layout”
8. Ấn “Complete”
9. Cho giá nhuộm vào:

Nhuộm HE: Cho tiêu bản vào cửa A (mở cửa A)

10. Đóng cửa máy
11. Ấn “Stantdart start”
12. Ấn “Overrid”

Sau khi nhuộm xong tiêu bản HE ở cửa C

Sau khi nhuộm xong tiêu bản GS ở cửa D

13. Mở nắp máy, nhắc tiêu bản ra
14. Ấn acknowlege

Đóng cửa máy