



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0029902

(51)⁷ C12Q 1/68; G01N 1/30

(13) B

(21) 1-2019-05033

(22) 13/09/2019

(45) 25/10/2021 403

(43) 25/11/2019 380A

(76) Trần Văn Tính (VN)

Nhà thuốc Hiền Linh, 124A Phúc Diễn, quận Bắc Từ Liêm, thành phố Hà Nội

(54) KIT NHUỘM LIPIT TẾ BÀO VÀ PHƯƠNG PHÁP NHUỘM LIPIT TẾ BÀO
BẰNG KIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kit nhuộm lipit tế bào và phương pháp nhuộm lipit tế bào bằng kit này. Theo đó, bằng cách cải tiến hệ dung dịch cố định tiêu bản và dung dịch nhuộm trên nền thuốc nhuộm là dung dịch Sudan Black B và dung dịch Giemsa, kit theo sáng chế cho phép nhuộm lipit tế bào trực tiếp bằng một bước nhuộm duy nhất mà không cần bước tẩy etanol. Kit theo giải pháp hữu ích cho phép rút ngắn đáng kể thời gian xét nghiệm với kết quả rõ ràng. Giá trị phân loại dòng tế bào để xác định thể bệnh phù hợp với các phương pháp khác theo tiêu chuẩn FAB là 93,33%.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa sinh và y học, cụ thể là sáng chế đề cập đến kit nhuộm lipit tế bào và phương pháp nhuộm lipit tế bào bằng kit này để ứng dụng trong chẩn đoán ung thư như phân loại dòng tế bào tủy trong bệnh bạch cầu cấp, ung thư tế bào mỡ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Kỹ thuật nhuộm lipit bằng thuốc nhuộm Sudan Black B (SBB) thường được dùng để nhuộm lipit có trong tế bào và đã được ứng dụng trong xét nghiệm phân loại dòng tế bào tủy trong bệnh bạch cầu cấp, ung thư tế bào mỡ trong ngành giải phẫu bệnh. Quy trình nhuộm lipit bằng SBB được nhiều tác giả như Sheehan, Storey và Hayhoe phát triển. Hiện nay nhiều hãng như Merck, Sigma... đều dựa trên quy trình do Hayhoe để thương mại hóa thành các kit nhuộm thương phẩm.

Quy trình nhuộm theo Hayhoe và các hạn chế của các phương pháp nhuộm lipit hiện nay:

Kit dựa trên quy trình của Hayhoe thường bao gồm 6 loại dung dịch: Cố định, SBB 6,3% trong etanol và đệm, etanol 70%, Giemsa đậm đặc và đệm Giemsa. Quy trình nhuộm gồm 5 bước:

Bước 1: Cố định tiêu bản: bằng hơi formaldehyt: 10 phút.

Bước 2: Nhuộm lipit bằng dung dịch Sudan Black B, trong đó dung dịch Sudan Black 6,3% trong etanol, sau đó phối với với dung dịch bao gồm 16% phenol trong etanol 70% theo tỷ lệ 6:4 sau đó phủ dung dịch này lên vùng bệnh phẩm của tiêu bản đã cố định trong thời gian 60 phút.

Bước 3: Tẩy dung dịch Sudan Black B hấp phụ trên tế bào của tiêu bản bằng cách rửa bằng dung dịch etanol 70% trong thời gian 3 phút.

Bước 4: Rửa tiêu bản: bằng nước thường 2 phút, để khô.

Bước 5: Nhuộm nhân bằng dung dịch Giemsa 7% trong thời gian 20 phút.

Quy trình nhuộm này khá phức tạp, trải qua nhiều bước (5 bước) và dung dịch nhuộm Sudan Black B cần pha lại sau mỗi lần nhuộm. Dung dịch thừa phải loại bỏ. Việc trải qua nhiều bước sẽ làm kỹ thuật viên dễ không tuân thủ đúng quy trình bởi vì

để chẩn đoán định danh tế bào ung thư thường mẫu bệnh phẩm phải nhuộm cùng lúc nhiều kỹ thuật mà các kỹ thuật này thường không đồng bộ về mặt thời gian và các bước tiến hành.

Đặc biệt bước tẩy còn dễ gây dương tính giả khi tẩy chưa đủ hoặc âm tính giả nếu tẩy quá mức. Kết quả âm tính hoặc dương tính giả ảnh hưởng lớn đến chất lượng chẩn đoán đặc biệt là chẩn đoán định danh tế bào ung thư có vai trò quyết định sử dụng thuốc hướng đích trong điều trị.

Thời gian nhuộm khá dài, tới 85 phút. Thời gian nhuộm dài sẽ làm bệnh nhân phải chờ đợi điều trị ảnh hưởng đến kết quả điều trị thậm chí đe dọa đến tính mạng bệnh nhân như trường hợp bệnh bạch cầu cấp tiền tủy bào là thể xuất huyết mạnh cần phải điều trị càng sớm càng tốt.

Hầu hết các kit nhuộm tế bào hiện nay đều yêu cầu pha chế dung dịch nhuộm Suban B black B với đệm ngay tại thời điểm nhuộm, do số lượng tiêu bản nhuộm ít nên phải bỏ đi phần dung dịch thừa gây lãng phí và ô nhiễm môi trường.

Sản phẩm nhuộm tạo thành không bền, dễ bị tan trong dầu soi kính hiển vi nên việc hội chẩn giữa các tuyến có thể bị ảnh hưởng đến kết quả.

Ngoài quy trình nhuộm Hayhoe, một số tác giả khác như: Sheehan và Storey, Chiffelle và Putt hoặc Gutierrez và Lillie nhưng cũng đều đi qua từ 4 đến 6 bước nhuộm, thời gian từ 80-100 phút. Tất cả các quy trình của các tác giả đều sử dụng nồng độ SBB cao từ 1-7% trong dung môi là etanol, diethylen glycol (DEG) hoặc axeton trong axit axetic. Hầu hết các quy trình đều yêu cầu pha chế dung dịch SBB ngay trước khi nhuộm và pha thừa đều bỏ đi. Tất cả các quy trình đều có bước tẩy Sudan Black B sau khi nhuộm, sử dụng chính các dung môi pha chế dung dịch nhuộm Sudan, nhưng ở nồng độ thấp hơn.

Theo đó, các quy trình hiện nay có nhiều yếu điểm cần cải tiến về mặt quy trình nhằm: giảm số bước nhuộm, rút ngắn thời gian, giảm nồng độ các hóa chất, kéo dài đời sống thuốc nhuộm để kỹ thuật nhuộm trở thành đơn giản, giảm giá thành, bảo vệ môi trường nhưng có độ tin cậy và kết quả rõ ràng, chính xác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là sáng chế đề cập đến kit nhuộm lipid tế bào và phương pháp nhuộm lipid tế bào bằng kit này. Kit và phương

pháp theo sáng chế hữu ích dùng trong chẩn đoán bệnh về máu và nhuộm phát hiện ung thư tế bào mỡ.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kit nhuộm lipid tế bào bao gồm dung dịch cố định tiêu bản và dung dịch nhuộm, trong đó:

a) Dung dịch cố định tiêu bản bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % thể tích thể tích như sau:

- Formol 37%:	7,0 - 9,0
- Axeton 99,5%:	30 - 34,0
- Đệm xitrat nồng độ 0,35 - 0,4 M, pH=5,2-5,4:	57 - 63, và

b) Dung dịch nhuộm bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % thể tích như sau:

- Sudan Black B:	0,007 - 0,012
- Diethylen Glycol (DEG):	1,0 - 2,0
- Etanol:	40,0 - 48,0
- Na ₂ HPO ₄ :	0,09 - 0,15
- Phenol:	5,0 - 6,0
- Dung dịch Giemsa:	7,0 - 11,0
- Nước cất 2 lần:	37,0 - 45,0

Theo một phương án ưu tiên, trong đó dung dịch nhuộm bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % thể tích như sau:

- Sudan Black B:	0,008
- Diethylen Glycol (DEG):	1,5
- Etanol:	43,0
- Na ₂ HPO ₄ :	0,1
- Phenol:	5,4
- Dung dịch Giemsa:	9,0
- Nước cất 2 lần:	40,992

Theo một phương án ưu tiên, trong đó dung dịch nhuộm bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % thể tích như sau:

- Sudan Black B:	0,01
- Diethylen Glycol (DEG):	1,7
- Etanol:	45,0

- Na ₂ HPO ₄ :	0,12
- Phenol:	5,6
- Dung dịch Giemsa:	10,0
- Nước cất 2 lần:	37,57

Theo một phương án ưu tiên, trong đó kit này được bao gói ở dạng hai thành phần dung dịch riêng biệt và kèm theo hướng dẫn sử dụng.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến phương pháp nhuộm lipid tế bào bằng kit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó phương pháp nhuộm này bao gồm hai bước:

a) cố định tế bào lên tiêu bản bằng cách trải mẫu bệnh phẩm lên lam kính và phủ dung dịch cố định tiêu bản lên toàn bộ vùng bệnh phẩm trong thời gian từ 5 đến 10 giây và rửa bằng nước cất trong thời gian 1 phút; và

b) nhuộm lipid tế bào bằng cách phủ lên vùng bệnh phẩm trên tiêu bản sau khi đã được cố định dung dịch nhuộm và để trong 10 phút, sau đó rửa bằng nước cất trong thời gian 1 phút, sau khi để khô tiêu bản và đọc kết quả nhuộm lipid trên kính hiển vi.

Theo một phương án ưu tiên, phương pháp nhuộm lipid tế bào theo sáng chế sau khi cố định tế bào, tiến hành nhuộm lipid tế bào ngay mà không cần phải để khô tiêu bản.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp kết quả nhuộm lipid tế bào bạch cầu mẫu máu người bình thường trên kính hiển vi quang học có độ phóng đại 1000 lần. Hình 1A là ảnh nhuộm lipid bạch cầu bằng kit theo sáng chế. Hình 1B là ảnh nhuộm lipid bạch cầu theo kỹ thuật nhuộm SBB của Hayhoe. Các tổ chức lipid trên tế bào bạch cầu bình thường bắt màu từ xanh đến đen.

Hình 2 là ảnh chụp bạch cầu máu trong tủy sinh máu bệnh nhân bạch cầu cấp thể M4 nhuộm lipid bằng SBB được soi dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 1.000 lần. Hình 2A là kết quả nhuộm bằng kit theo sản xuất, hình 2B là kết quả nhuộm bằng kỹ thuật nhuộm của Hayhoe. Các tổ chức lipid trên bạch cầu ung thư bắt màu xanh đến đen.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án thực hiện cụ thể, các phương án

này chỉ nhằm mục đích bộc lộ sáng chế chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Trong tủy sinh máu bình thường có bốn dòng tế bào chính là: bạch cầu dòng tủy, lympho, mono, hồng cầu và tiểu cầu. Khi bị ung thư còn gọi là bạch cầu cấp thì dòng nào cũng có thể bị ung thư đơn độc hoặc hỗn hợp 2 dòng tế bào cùng lúc tạo ra các bệnh cảnh khác nhau và được Hiệp hội các nhà khoa học Anh - Pháp - Mỹ (tiêu chuẩn FAB) phân ra thành 7 thể bệnh từ M0 đến M7 và từ L1 đến L3. Mỗi thể bệnh được mô tả bởi triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng và thậm chí sử dụng thuốc điều trị khác nhau nhất là các thuốc hướng đích.

Để phân biệt được dòng tế bào thường dựa trên tổ hợp kết quả của ba phương pháp hình thái học - hóa học tế bào, miễn dịch và di truyền.

Nhuộm Sudan là một trong 5 kỹ thuật của phương pháp nhuộm hóa học tế bào và tương đối đặc hiệu cho dòng tủy. Bạch cầu dòng tủy có chứa nhiều bào quan và màng của các bào quan thường cấu tạo màng lipid kép lên dương tính mạnh, các dòng tế bào mono dương tính yếu; các dòng tế bào khác: hồng cầu, tiểu cầu và bạch cầu lympho âm tính.

Sáng chế đề cập đến kit nhuộm lipid tế bào và phương pháp nhuộm lipid tế bào bằng kit này. Kit và phương pháp theo sáng chế hữu ích dùng trong chẩn đoán bệnh về máu và nhuộm phát hiện ung thư tế bào mỡ.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến kit nhuộm lipid tế bào dựa trên nền tảng là quy trình nhuộm theo phương pháp Hayhoe, trong đó kit nhuộm này bao gồm dung dịch cố định tiêu bản và dung dịch nhuộm, trong đó dung dịch cố định tiêu bản bao gồm các thành phần formol, etanol, axeton và đệm xitrat 0,35-0,4M và dung dịch nhuộm bao gồm các thành phần Sudan Black B, dietylen glycol (DEG), etanol, Na_2HPO_4 , phenol, nước cất và dung dịch Giemsa.

Kit nhuộm lipid tế bào bao gồm dung dịch cố định tiêu bản và dung dịch nhuộm, trong đó:

Dung dịch cố định tiêu bản: nhằm để cố định tế bào trên lam kính, tránh bị rửa trôi khi nhuộm. Các thành phần dung dịch nhuộm tiêu bản, các thành phần formol, etanol, axeton và đệm citrat 0,35-0,4M là các dung dịch chuẩn có thể mua được ngoài thị trường.

Công thức pha chế theo tỷ lệ % thể tích cụ thể như sau:

- Formol 37%: 7,0 - 9,0
- Axeton 99,5%: 30 - 34,0
- Đệm Citrat nồng độ 0,35 - 0,4 M, pH=5,2-5,4: 57 - 63

Etanol được biết đến như một chất cố định tiêu bản máu ngoại vi phổ biến nhất vì tính ít độc hại. Nồng độ thường sử dụng từ 70-100%, có đặc tính dễ bay hơi và háo nước mạnh. Dựa vào tính chất này, các ancol dùng trong cố định sẽ rút nước trong các mô và tế bào từ đó cố định bệnh phẩm theo cơ chế gây đông tụ các protein. Yếu điểm của dung dịch etanol là do quá trình rút nước mạnh nên dễ gây co tế bào.

Formol hay còn gọi là formaldehyt, dễ bay hơi, nhưng là một chất độc đối với cơ thể sống do tác động mạnh vào protein. Cơ chế của quá trình cố định là formol phản ứng với các protein hình thành các liên kết chéo tạo ra một bộ khung mới đảm bảo giết chết tế bào đồng thời giữ nguyên hình thái, cấu trúc cũng như thành phần hóa học của tế bào. Đây là một chất cố định tốt và phổ biến nhất dùng cho mục đích cố định các loại bệnh phẩm. Kỹ thuật sử dụng dạng tinh khiết thường là dùng dạng bay hơi. Điều cần lưu ý khi sử dụng aldehyt để cố định cần phải rửa kỹ vì gốc -CHO có khả năng hoạt động mạnh nên dễ gây ra các phản ứng dương tính giả khi nhuộm.

Axeton với đặc tính là dễ bay hơi, tốc độ thấm vào thành tế bào và các tổ chức nhanh làm giảm thời gian cố định. Nhược điểm của axeton là có khả năng hòa tan tốt các lipoprotein làm mất đi các cấu trúc hóa học tế bào như khi còn sống.

Tuy vậy, khi kết hợp etanol - formandehyt - axeton trong môi trường đệm sẽ tạo thành một dung dịch cố định theo cả ba nguyên lý: đông tụ, tạo áo nước và tạo liên kết chéo. Khả năng thấm sâu nhanh cho phép rút ngắn thời gian cố định.

Dung dịch nhuộm lipit để nhuộm tế bào sau khi được cố định trên lam kính, theo sáng chế, dung dịch nhuộm bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % thể tích như sau:

- Sudan Black B: 0,007 - 0,012
- Diethylen Glycol (DEG): 1,0 - 2,0
- Etanol: 40,0 - 48,0
- Na₂HPO₄: 0,09 - 0,15
- Phenol: 5,0 - 6,0
- Dung dịch Giemsa: 7,0 - 11,0
- Nước cất 2 lần: 37,0 - 45,0

Để tạo thành dung dịch nhuộm ổn định, tiến hành phối trộn thành phần Sudan Black B, Diethylen Glycol (DEG), etanol tạo thành dung dịch đồng nhất (dung dịch A). Phối trộn các thành phần Na_2HPO_4 , phenol và nước cất tạo thành dung dịch đồng nhất (dung dịch B). Sau đó trộn hai dung dịch này với nhau rồi bổ sung dung dịch Giemsa và khuấy trộn đều cho đến khi thu được dung dịch đồng nhất, bền màu. Dung dịch Giemsa theo sáng chế là dung dịch đậm đặc.

Cơ chế của phản ứng nhuộm Sudan rất khác nhau, bao gồm khuếch tán vật lý đơn thuần và liên kết hóa học trực tiếp. Về mặt kỹ thuật, Chayen (1968) cho rằng, mức độ bắt màu chọn lọc của các thuốc nhuộm đối với lipid phụ thuộc rất nhiều vào bản chất lipid, đặc tính của thuốc nhuộm, thuốc điều trị và điều kiện tiến hành nhuộm. Trong các loại thuốc nhuộm, Sudan đen là một nhóm phẩm nhuộm cho kết quả nhuộm rõ ràng nhất do tính chất hòa tan mạnh trong lipid và màu đen thuần khiết. Dựa vào tính chất này có thể phát hiện thành phần lipid có trong tế bào.

Phản ứng nhuộm Sudan Black B theo cơ chế khuếch tán vật lý và liên kết hóa học nên thành phần dung dịch pha chế Sudan Black B có vai trò quan trọng. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nhuộm bao gồm:

Tương quan các nhóm chức kỵ nước và ưa nước: Nếu tỷ lệ nhóm kỵ nước/ưa nước cao thì SBB sẽ không khuếch tán vào trong các tổ chức lipid (có chứa chủ yếu là nhóm kỵ nước) và ngược lại. Vì vậy, cần phải điều chỉnh nồng độ các chất có trong dung dịch để tối ưu hóa nhằm làm tăng quá trình khuếch tán của Sudan Black B vào lipid;

Nồng độ ion và Sudan Black B có trong dung dịch có vai trò thúc đẩy thuốc nhuộm này khuếch tán từ nơi có nồng độ cao đến nơi có nồng độ thấp vào các tổ chức có hàm lượng lipid cao như các hạt đặc hiệu của các tế bào dòng tủy và tế bào mỡ.

Ở các quy trình đã biết, các tác giả khác đều sử dụng nồng độ Sudan Black B ở mức bão hòa hoặc gần bão hòa để thuốc nhuộm này dễ dàng khuếch tán vào tổ chức lipid, nhưng bất lợi ở chỗ nó cũng hấp phụ trên bề mặt các tế bào sống khác (hồng cầu, tiểu cầu, lympho...) do bản chất màng các tế bào này cũng được cấu tạo từ lớp màng kép phospholipid. Khi hấp phụ như vậy sẽ dẫn đến dương tính giả nên để tránh kết quả nhuộm bị sai, nên cần có bước tẩy rửa Sudan Black B bằng chính các dung môi pha chế với nồng độ thấp hơn (nhằm không lấy đi SBB hấp thụ trong các tổ chức lipid). Chính vì vậy, bước rửa này thường rất khó kiểm soát chất lượng do tính chất khác nhau về cấu trúc lipid của các tế bào trên từng tiêu bản nhuộm mà có thể gây dương

tính giả nếu tẩy không hết hoặc âm tính giả nếu tẩy quá mức. Việc tối ưu hóa nồng độ ion và SBB có trong dung dịch sẽ vừa thúc đẩy Sudan Black B khuếch tán vào tổ chức có chứa hàm lượng lipit cao (tế bào mỡ, các bào quan của bạch cầu dòng tủy, mono...) mà không hấp phụ trên các màng kép có chứa phospholipit sẽ giúp cho việc loại bỏ bước tẩy SBB thừa do hấp phụ trên bề mặt tế bào.

Điều chỉnh pH tối ưu nhằm thúc đẩy phản ứng gắn kết giữa Sudan Black B với tổ chức lipit có trong tế bào nhằm chuyển thành các liên kết chính thức bền vững hơn so với liên kết hấp thụ do khuếch tán vật lý đơn thuần. Khi chuyển từ quá trình hấp thụ sang liên kết hóa học còn giúp cho phẩm màu đen của Sudan Black B không bị tan trong dầu soi kính hiển vi và có thể hội chẩn được nhiều lần làm tăng đồng nhất kết quả chẩn đoán của kỹ thuật nhuộm giữa các tuyến khám chữa bệnh. Ngoài ra, việc điều chỉnh pH phù hợp nằm trong khoảng 6,5 - 7,5 còn giúp cho quá trình nhuộm nhân và hồng cầu bằng giemsa bắt màu rõ ràng hơn từ đó bỏ được bước nhuộm nhân.

Chính vì vậy, tác giả đã nghiên cứu và bất ngờ phát hiện ra, với nồng độ thành phần dung dịch nhuộm lipit theo sáng chế, cụ thể là nồng độ Sudan Black B từ 0,007 đến 0,012% trong dung dịch nhuộm lipit theo sáng chế cho phép nhuộm nhân, nhưng không nhuộm màng tế bào, nghĩa là bỏ qua được bước rửa tiêu bản để tẩy màu màng tế bào. Dung dịch nhuộm theo sáng chế còn cho phép kết hợp với dung dịch nhuộm Giemsa tạo thành dung dịch ổn định, bền và cho phép nhuộm đồng thời Sudan Black B và Giemsa trong một bước nhuộm duy nhất.

Theo một phương án ưu tiên, kit nhuộm lipit tế bào theo sáng chế có dung dịch nhuộm bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % thể tích như sau:

- Sudan Black B:	0,008
- Diethylen Glycol (DEG):	1,5
- Etanol:	43,0
- Na ₂ HPO ₄ :	0,1
- Phenol:	5,4
- Dung dịch Giemsa:	9,0
- Nước cất:	40,992.

Theo một phương án ưu tiên, kit nhuộm lipit tế bào theo sáng chế có dung dịch nhuộm bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % thể tích như sau:

- Sudan Black B:	0,01
------------------	------

- Diethylen Glycol (DEG):	1,7
- Etanol:	45,0
- Na ₂ HPO ₄ :	0,12
- Phenol:	5,6
- Dung dịch Giemsa:	10,0
- Nước cất 2 lần:	37,57.

Theo một phương án ưu tiên, kit theo sáng chế được bao gói ở dạng hai thành phần dung dịch riêng biệt và kèm theo hướng dẫn sử dụng. Cụ thể, mỗi dung dịch của kit được đóng gói trong chai nhỏ giọt, bằng thủ tinh màu nâu để tránh ánh sáng, có đầu nhỏ giọt. Chai này đảm bảo khi nhỏ giọt bằng cách úp ngược theo chiều thẳng đứng thì sẽ nhỏ giọt và mỗi giọt có thể tích là 25 - 50 ul.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến phương pháp nhuộm lipit tế bào bằng kit theo sáng chế, trong đó phương pháp nhuộm này bao gồm hai bước: a) cố định tế bào lên tiêu bản; và b) nhuộm lipit tế bào.

Trong bước cố định tế bào lên tiêu bản, tiến hành trải mẫu bệnh phẩm lên lam kính và phủ dung dịch cố định tiêu bản lên toàn bộ vùng bệnh phẩm trong thời gian từ 5 đến 10 giây và rửa bằng nước cất trong thời gian 1 phút.

Trong bước nhuộm lipit tế bào, tiến hành phủ lên vùng bệnh phẩm trên tiêu bản sau khi đã được cố định dung dịch nhuộm và để trong 10 phút, sau đó rửa bằng nước cất trong thời gian 1 phút. Sau khi để khô tiêu bản, tiến hành đọc kết quả nhuộm lipit trên kính hiển vi.

Theo một khía cạnh ưu tiên, phương pháp nhuộm lipit tế bào theo sáng chế sau khi cố định tế bào, tiến hành nhuộm lipit tế bào ngay mà không cần phải để khô tiêu bản.

Để khô tiêu bản trong không khí và đọc tiêu bản ở vật kính dầu với độ phóng đại 1.000 lần. Kết quả thu được:

Phản ứng dương tính: Nếu có lipit trên nguyên sinh chất của tế bào thì sẽ xuất hiện màu từ xanh đen đến đen do Sudan black B khuếch tán vào các tổ chức lipit của tế bào. Nguyên sinh chất của tế bào không có lipit bắt màu xanh và nhân các tế bào có nhân bắt màu đỏ tím.

Phản ứng âm tính: Tức là không có lipit trong tế bào thì nguyên sinh chất bắt màu xanh và nhân bắt màu đỏ tím.

Theo một phương án ưu tiên, quy trình theo sáng chế có 2 bước nhuộm, thời gian

nhuộm trong 10 phút 10 giây và không cần bước tẩy màu.

Theo một phương án ưu tiên, nhuộm đồng thời lipit bằng Sudan Black B và nền tiêu bản (nhân, hồng cầu) bằng Giemsa trong cùng một dung dịch.

Theo một phương án ưu tiên, kit được ứng dụng để nhuộm tế bào bạch cầu dùng trong phân loại thể bệnh trong bệnh bạch cầu cấp; tế bào mỡ ung thư trong ngành giải phẫu bệnh và tế bào.

Kết quả nhuộm được đánh giá theo bảng tiêu chuẩn FAB, đây là một tiêu chuẩn được dùng để đánh giá dòng tế bào bạch cầu và là đã biết đối với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Bảng tiêu chuẩn FAB có thể được tìm thấy trong các tài liệu kỹ thuật chung trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sản xuất kit nhuộm lipit tế bào

a) Sản xuất dung dịch cố định:

Để pha chế 20 ml dung dịch cố định tế bào, chuẩn bị các thành phần bao gồm formol 37%, etanol, axeton và đệm citrat 0,35 - 0,40 M, pH = 5,2 - 5,4 với lượng như sau:

- Formol 37%: 1,6 ml;
- Axeton 99,5%: 6,4 ml;
- Đệm citrat nồng độ 0,35 - 0,4 M, pH=5,2 - 5,4: 12,0 ml.

Trong một lọ thủy tinh màu nâu có thể tích 20 ml, dùng pipet tự động hút cho lần lượt các dung dịch ở trên vào, lắc đều, đóng bằng nút nhựa màu trắng có nắp nhỏ giọt.

In nhãn ghi rõ tên thuốc thử: Dung dịch cố định; Thể tích 20ml; Lô sản xuất: là ngày pha chế; Hạn sử dụng: 12 tháng; Kí hiệu lọ thuốc thử là R1 và nhãn QR code.

b) Thuốc thử R2: Dung dịch SBB 0,008%

Để pha chế 50 ml dung dịch SBB 0,008%, chuẩn bị các hóa chất như sau:

Cân 4 mg Sudan Black B cho vào 1 lọ thủy tinh màu nâu thể tích 50ml, bổ sung 0,75 ml DEG (hàm lượng 99,9%) bằng pipet tự động. Lắc kỹ để tan hoàn toàn. Thêm 22,5 ml etanol tuyệt đối, tiếp tục lắc sẽ thu được dung dịch đồng nhất màu xanh nhạt.

Cân 50 mg Na_2HPO_4 và 2,7 g phenol tinh khiết, khan cho vào 1 cốc thủy tinh sạch có mỏ 50 ml, bổ sung thêm 22,25 ml nước cất hai lần bằng pipet tự động. Lắc kỹ cho tan hoàn toàn, khi đó dung dịch có thể ở dạng nhũ tương và trong suốt.

Đổ toàn bộ dung dịch pha chế trong cốc thủy tinh vào trong lọ thủy tinh màu ở

trên, lắc kỹ khi đó thu được hỗn dịch đồng nhất hoàn toàn màu xanh nhạt. Tiếp tục bổ sung thêm 4,5 ml Giemsa đậm đặc (còn gọi là giemsa mẹ) vào lọ thủy tinh khi đó thu được dung dịch R2 với thể tích là 50 ml. Lắc đều và đóng bằng nút nhựa màu đen có nắp nhỏ giọt.

In nhãn ghi rõ tên thuốc thử: Dung dịch Sudan Black B 0,008%; Thể tích 20ml; Lô sản xuất: là ngày pha chế; Hạn sử dụng: 12 tháng; Kí hiệu lọ thuốc thử là R2 và nhãn QR code.

Đóng gói 2 lọ thuốc thử vừa pha vào trong một hộp carton có tấm lót bẽ và cắt ô tròn vừa với đường kính của hai lọ thuốc thử R1 và R2. In nhãn hộp với các thông tin: Kit nhuộm lipit bằng Sudan Back B; Thành phần hộp kit: Gồm 2 lọ R1 thể tích 20 ml và R2 thể tích 50 ml; Lô sản xuất: là ngày pha chế; Hạn sử dụng: 12 tháng; Kí hiệu thuốc thử là R2, nhãn QR code và Hướng dẫn sử dụng.

Ví dụ 2. Thử nghiệm đánh giá hiệu quả nhuộm tế bào của kit theo sáng chế

Chất lượng của kit được đánh giá dựa trên 2 tiêu chí: Độ nhạy và độ đặc hiệu của kit sáng chế và kit thương mại nhuộm theo quy trình của Hayhoe.

a) Đánh giá độ nhạy:

Tiến hành nhuộm lipit bạch cầu máu ngoại vi của 30 mẫu máu của người hiến tự nguyện khỏe mạnh, thu được kết quả như sau:

Bảng 1: Kết quả đánh giá độ nhạy

Loại bạch cầu	Kết quả chạy máy tổng phân tích	Điểm nhuộm lí thuyết theo phân độ	Điểm lí thuyết	Điểm nhuộm SBB theo quy trình Hayhoe	Điểm nhuộm kit SBB cải tiến
Trung tính	60,00±0,89	4	240±3,66	220,8	223,4
Ưa axit	3,84±0,29	2	7,68±0,58	7,06	7,15
Ưa bazơ	0,21±0,03	1	0,21±0,03	0,19	0,19
Tế bào lympho	29,04±0,84	0	0	0	0
Tế bào đơn nhân	6,91±0,14	2	13,82±0,28	12,71	12,85
Tổng cộng			261,7±4,53	240,9	243,4
Hiệu suất			100%	92,3%	93,1%

Xử lý thống kê cho thấy hai giá trị trung bình là không khác nhau ($p>0,95$). Như vậy kĩ thuật nhuộm SBB cải tiến cho kết quả nhuộm tương đương với kĩ thuật của Hayhoe. Ảnh nhuộm lipit của hai bộ kit được thể hiện trên hình 1a và 1b.

b) Đánh giá độ đặc hiệu của kit

Nhuộm đồng thời cả hai bộ kit sáng chế và kit theo quy trình của Hayhoe trên 30 mẫu tủy của bệnh nhân, thu được kết quả: cả hai kỹ thuật nhuộm đều dương tính trên các tế bào dòng tủy từ tiền tủy bào đến các tế bào trưởng thành, còn dòng monocyte chỉ dương tính nhẹ ở tế bào trưởng thành. Các dòng tế bào khác đều âm tính. Ảnh nhuộm lipit của hai bộ kit được thể hiện trên hình 2a và 2b.

Kết luận: Độ đặc hiệu của kit sáng chế tương đương với kit nhuộm theo quy trình của Hayhoe.

Ví dụ 3. Đánh giá tính phù hợp trong chẩn đoán dòng bệnh bạch cầu cấp theo tiêu chuẩn FAB

Nhuộm 30 mẫu tủy lấy từ tủy sinh máu của bệnh nhân bạch cầu cấp đã được phân loại theo tiêu chuẩn FAB bằng tổ hợp kết quả của ba phương pháp hình thái học-hóa học tế bào, miễn dịch và di truyền. Kết quả so sánh phân loại dòng tế bào theo tiêu chuẩn FAB thể hiện ở bảng:

Bảng 2: Kết quả phân loại thể dòng tế bào bệnh

Thể dòng	Kết quả kỹ thuật SBB cải tiến		Chẩn đoán xác định theo tiêu chuẩn FAB		Mức độ phù hợp	
	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Dòng tủy	19	63,33	21	70	19	63,33
Dòng lympho	9	30,00	9	30	9	30
Không xác định	2	6,67	0	0	0	0
Tổng cộng	30	100	30	100	28	93,33

Kết quả cho thấy có sự phù hợp 28/30 (93,33%) bệnh nhân.

Kết luận: Kit sáng chế có thể giúp phân loại đúng 93,33% dòng tế bào theo tiêu chuẩn FAB. 6,67% trường hợp thuộc thể M0 là thể bệnh mà tế bào bạch cầu ung thư còn chưa biệt hóa nên không xuất hiện các bào quan có chứa lipit nên cho phản ứng âm tính. Đối với thể bệnh này phải dùng kỹ thuật marker để tiếp tục phân loại dòng tế bào nhưng giá thành đắt gấp khoảng 10 lần so với kỹ thuật nhuộm hóa học tế bào. Tỷ lệ này cũng cũng phù hợp với Marie-Christine Béné (2002) cho rằng chỉ có dưới 3% các tế bào blast trong mẫu tủy của bệnh nhân thể M0 cho kết quả dương tính với phương pháp nhuộm peroxidaza hoặc sudan B.

Ví dụ 4. Đánh giá thời gian ổn định của kit

Tiến hành sản xuất kit với 100 lần nhuộm bảo quản ở nhiệt độ phòng thí nghiệm. Để đánh giá mức độ ổn định của kit, các thành phần của kit được pha chế bảo quản theo yêu cầu và tiến hành thử nghiệm trên 36 mẫu tiêu bản. Mỗi tháng tiến hành nhuộm lặp 3 tiêu bản vào cùng một ngày trong tháng. Sau đó đánh giá kết quả dương tính bằng phương pháp phân độ tính điểm để thu được điểm trung bình của ba tiêu bản. Kết quả thu được thời gian ổn định của kit là 12 tháng.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Kit nhuộm lipit theo sáng chế trên cơ sở kết hợp nhuộm Sudan Black B và Giemsa cải tiến đã khắc phục được tất cả các hạn chế của các quy trình nhuộm của các tác giả khác. Cụ thể như sau:

Kit chỉ còn 2 thuốc thử R1, R2 đóng gói sẵn dùng ổn định trong thời gian 1 năm thuận lợi cho người sử dụng và tránh phải đổ đi phần dung dịch nhuộm gây ô nhiễm môi trường.

Quy trình nhuộm chỉ còn 2 bước, sử dụng đơn giản như một test nhanh, rút ngắn thời gian. Quy trình không cần bước tẩy cặn hoặc propylen glycol giúp cho kết quả xét nghiệm không những có độ lặp lại cao hơn còn loại trừ được âm tính và dương tính giả do bước này gây ra.

Kit có thể ứng dụng để nhuộm chẩn đoán dòng tế bào trong phân loại thể bệnh bạch cầu cấp theo tiêu chuẩn FAB đạt độ nhạy 93,33% và độ đặc hiệu tương đương với các kỹ thuật kinh điển. Triển khai kit này sẽ góp phần tích cực vào việc chẩn đoán và điều trị cho các bệnh nhân mắc bệnh về máu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kit nhuộm lipid tế bào bao gồm dung dịch cố định tiêu bản và dung dịch nhuộm, trong đó:

a) Dung dịch cố định tiêu bản bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % thể tích như sau:

- Formol 37%:	7,0 - 9,0
- Axeton 99,5%:	30 - 34,0
- Đệm xitrat nồng độ 0,35 - 0,4 M, pH=5,2-5,4:	57 - 63, và

b) Dung dịch nhuộm bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % thể tích như sau:

- Sudan Black B:	0,007 - 0,012
- Diethylen Glycol (DEG):	1,0 - 2,0
- Etanol:	40,0 - 48,0
- Na ₂ HPO ₄ :	0,09 - 0,15
- Phenol:	5,0 - 6,0
- Dung dịch Giemsa:	7,0 - 11,0
- Nước cất 2 lần:	37,0 - 45,0.

2. Kit nhuộm lipid tế bào theo điểm 1, trong đó dung dịch nhuộm bao gồm các thành phần theo tỷ lệ % thể tích như sau:

- Sudan Black B:	0,008
- Diethylen Glycol (DEG):	1,5
- Etanol:	43,0
- Na ₂ HPO ₄ :	0,1
- Phenol:	5,4
- Dung dịch Giemsa:	9,0
- Nước cất 2 lần:	40,992.

3. Kit nhuộm lipid tế bào theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-2, trong đó kit này được bao gói ở dạng hai thành phần dung dịch riêng biệt và kèm theo hướng dẫn sử dụng.

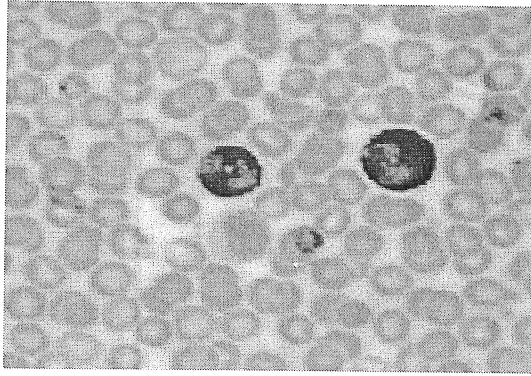
4. Phương pháp nhuộm lipid tế bào bằng kit theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 2, trong đó phương pháp nhuộm này bao gồm hai bước:

a) cố định tế bào lên tiêu bản bằng cách trải mẫu bệnh phẩm lên lam kính và phủ dung dịch cố định tiêu bản lên toàn bộ vùng bệnh phẩm trong thời gian từ 5 đến 10 giây và rửa bằng nước cất trong thời gian 1 phút; và

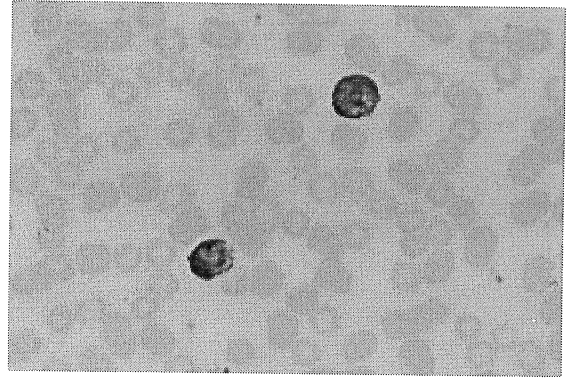
b) nhuộm lipit tế bào bằng cách phủ lên vùng bệnh phẩm trên tiêu bản sau khi đã được cố định dung dịch nhuộm và để trong 10 phút, sau đó rửa bằng nước cất trong thời gian 1 phút, sau khi để khô tiêu bản và đọc kết quả nhuộm lipit trên kính hiển vi.

5. Phương pháp nhuộm lipit tế bào theo điểm 4, trong đó sau khi cố định tế bào, tiến hành nhuộm lipit tế bào ngay mà không cần phải để khô tiêu bản.

HÌNH 1

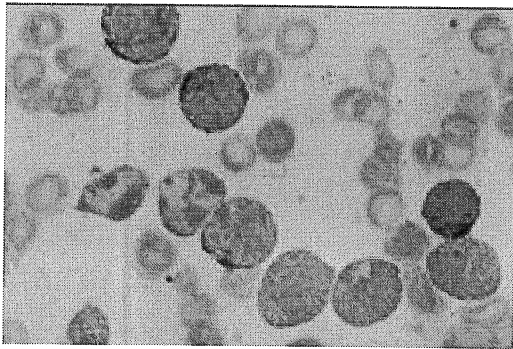


(A)

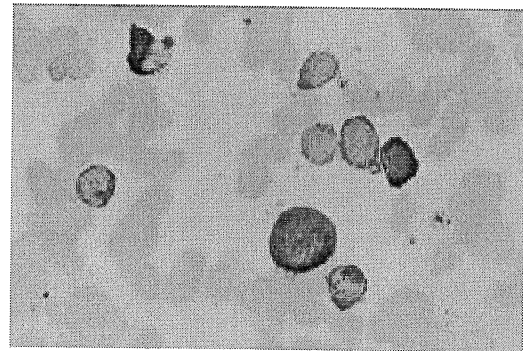


(B)

HÌNH 2



(A)



(B)