

CÁC LỖI KỸ THUẬT GIẢI PHẪU BỆNH THƯỜNG GẶP VÀ CÁCH GIẢI QUYẾT

Đặng Hoàng Minh

GIỚI THIỆU VỀ KỸ THUẬT GIẢI PHẪU BỆNH

Kỹ thuật giải phẫu bệnh (GPB) phát triển cùng với nhu cầu tìm hiểu sâu hơn về cơ thể con người, là tiền đề cho sự phát triển của ngành GPB hiện đại.

Kỹ thuật giải phẫu bệnh thường quy là một phần không thể thiếu trong ngành giải phẫu bệnh, đóng vai trò thiết yếu trong bất kỳ chẩn đoán giải phẫu bệnh nào. Không có bất kỳ kết quả giải phẫu bệnh nào có thể đến với bệnh nhân mà không sử dụng kỹ thuật GPB.

Kỹ thuật giải phẫu bệnh thường quy là một quá trình, kết hợp liên tục nhiều quy trình khác nhau để tạo thành tiêu bản. Chiếm gần 90% thời gian, công sức để tạo thành một chẩn đoán GPB.

Vì kỹ thuật giải phẫu bệnh là nền tảng cơ bản của mọi chẩn đoán giải phẫu bệnh nên các lỗi kỹ thuật sẽ ảnh hưởng ít hoặc nhiều đến kết quả GPB.

LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CỦA KỸ THUẬT GIẢI PHẪU BỆNH THƯỜNG QUY

Năm 1673, Anton van Leeuwenhoek phát minh ra kính hiển vi quang học.

Máy cắt mỏng được sử dụng lần đầu tiên trên mô động vật vào năm 1848, và tiếp tục được phát triển tới ngày nay với độ chính xác ngày càng cao. Việc vùi mô vào paraffin cũng được sử dụng cùng thời gian với việc sử dụng máy cắt mỏng.

Nhiều loại hóa chất khác nhau được sử dụng để cố định mẫu mô. Formalin được sử dụng lần đầu vào năm 1893 và phát triển rộng rãi tới nay.

Năm 1863, haematoxylin được sử dụng lần đầu tiên bởi nhà giải phẫu học người Đức Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-

Hartz với mục đích nhuộm nhiễm sắc chất nhuộm hiệu quả không cao.

Sau đó, năm 1865, Böhmer đã kết hợp haematoxylin với một muối kim loại cho kết quả nhuộm nhiễm sắc tốt hơn. Cùng thời gian này, Heinrich Caro, nhà hóa học người Ba Lan, đã tạo ra Eosin Y.

Tới năm 1875, Emil Fischer ứng dụng Eosin Y vào trong nhuộm mô học. Sau đó 1 năm, 1876, Wissowzky thiết lập thành công quy trình nhuộm haematoxylin and eosin.

CÁC QUY TRÌNH TRONG KỸ THUẬT GIẢI PHẪU BỆNH

Các quy trình kỹ thuật

Quy trình cố định mẫu

Quy trình cắt lọc

Quy trình xử lý mô

Quy trình vùi mô vào paraffin

Quy trình cắt mỏng

Quy trình nhuộm

Quy trình dán tiêu bản

Các quy trình hành chính

Quy trình nhận mẫu

Quy trình đổi chiếu mẫu khi cắt lọc

Quy trình đổi chiếu tiêu bản - mô tả đại thể

Quy trình báo cáo kết quả

Quy trình trả kết quả

Quy trình lưu trữ tiêu bản, block, kết quả

Quy trình hủy mẫu

Quy trình kiểm soát chất lượng

PHÂN LOẠI LỖI KỸ THUẬT

Phân loại lỗi kỹ thuật dựa trên khả năng ảnh hưởng đến kết quả của bệnh nhân và khả năng sửa chữa lỗi. Việc phân loại lỗi kỹ thuật giúp ta

nhìn thấy được những lỗi nào là cần thiết phải

giải quyết triệt để.

Bảng 1: Phân loại lỗi kỹ thuật bằng cách tính điểm:

Tình nghiêm trọng	Không ảnh hưởng kết quả (Không nghiêm trọng) (1 điểm)	Ít ảnh hưởng kết quả (ít nghiêm trọng) (3 điểm)	Ảnh hưởng kết quả (Nghiêm trọng) (9 điểm)
Sửa chữa lỗi	1 điểm	3 điểm	9 điểm
Có thể sửa chữa (1 điểm)	1 điểm	3 điểm	9 điểm
Không thể sửa chữa (3 điểm)	3 điểm	9 điểm	27 điểm

Cách xử lý:

1 điểm: Xử lý tại chỗ, khắc phục lỗi

3 điểm: Xử lý tại chỗ, khắc phục lỗi, nhắc nhở đổi với nhân viên gây lỗi.

9 điểm: Xử lý tại chỗ, khắc phục lỗi, nhắc nhở đổi với nhân viên gây lỗi, kiểm soát lại quy trình, tiến hành huấn luyện lai.

27 điểm: Xử lý tại chỗ, khắc phục lỗi, kiểm soát lại quy trình, tiến hành huấn luyện lại, thiết lập thêm các quy trình kiểm soát, các quy trình phòng ngừa.

Lỗi kỹ thuật có tính nghiêm trọng và không thể sửa chữa thường là những lỗi do quy trình làm việc có sai sót. Sai sót do con người nên là yếu tố sau cùng được xem xét tới.

CÁCH TRUY TÌM NGUYÊN NHÂN GÂY LỖI

Kỹ thuật Giải phẫu bệnh là sự tổng hợp của rất nhiều quy trình khác nhau nên việc truy tìm nguyên nhân gây lỗi thường rất khó khăn, đòi hỏi người đánh giá phải có nhiều năm kinh nghiệm. Vì vậy, vấn đề truy tìm nguyên nhân gây lỗi và khắc phục gần như là một vấn đề thiết yếu của phòng Giải Phẫu Bệnh. Việc truy tìm và



Sơ đồ 1: Phân tích nguyên nhân nhân viên không áp dụng phương pháp mới đã được đào tạo (Nguồn: <http://hoasenjobs.com/news/hr-news/bieu-do-xuong-ca-cong-cu-phan-tich-nguyen-nhan-va-giai-phap-chocac-van-de-35a523e9.htm>)

Có thể thấy, một vấn đề xảy ra là sự kết hợp của rất nhiều những yếu tố ảnh hưởng. Vì vậy, không thể xem xét 1 việc trên những gì xảy ra trước mắt được, người kỹ thuật viên cần phải hiểu được công việc của mình để tìm được nguyên nhân xảy ra lỗi.

CÁC LỖI KỸ THUẬT THƯỜNG GẶP VÀ CÁCH GIẢI QUYẾT

Lỗi do cố định

Biểu hiện

Mẫu sau khi xử lý mềm, còn ú động rất nhiều nước, bóp nhẹ vào mô gây lõm. Cắt mỏng không được, nếu được thì mô rất nhăn, dễ tan khi cho vào bể tái. Nhuộm H&E dễ trôi.

Nguyên nhân

Mẫu bệnh phẩm không đủ formol buffer 10% hoặc không đủ thời gian để thấm. Formol buffer 10% cần thời gian để xuyên qua mô.

Cách giải quyết

Trước hết, đối với mẫu lỗi, loại Paraffin từ block khỏi mô bằng cơ học (không dùng nhiệt, hóa chất), sau đó cho mẫu vào formol buffer 10% để cố định lại mẫu, rồi xử lý mẫu lại như mẫu bình thường. Đó là xử lý tại chỗ. Xử lý phòng ngừa gồm có: quy trình để người cắt lọc cắt bệnh phẩm thành nhiều lát cắt $0,5 \rightarrow 1\text{cm}$, bổ sung thêm formol buffer 10% vào mẫu bệnh phẩm và để mẫu bệnh phẩm lại cho đủ thời gian. Cung cấp đầy đủ formol buffer 10% cho nơi giữ mẫu nhằm đảm bảo mẫu luôn được cố định tốt nhất. Lưu ý rằng: Mẫu được xử lý không tốt, xử lý lại sẽ ảnh hưởng đến hình thái tế bào và cấu trúc phân tử của các thành phần trong tế bào, nên nhuộm HMMD trên mẫu xử lý lại thường cho kết quả không đáng tin cậy.

Lỗi do xử lý

Biểu hiện

Mẫu cứng, giòn, cắt mỏng dễ gây bể block, hư dao, tiêu bản H&E cho thấy hình ảnh nhân dày đặc, bào tương ít, lát cắt có chỗ dày chỗ

mỏng dạng lượn sóng, không thể hiện được hết mặt cắt.

Nguyên nhân

Quy trình xử lý không đúng, không phù hợp với từng loại mô. Không tuân thủ đúng thời gian của các bước trong quy trình xử lý mẫu.



Hình 1: Mẫu XX được xử lý tại một bệnh viện tỉnh. Mẫu mô cứng, bào tương gần như biến mất. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)



Hình 2: Mẫu block XX được gởi lên hội chẩn tại khoa Giải Phẫu Bệnh, Bệnh viện Đại học Y Dược. Mẫu xử lý không tốt nên cắt mỏng lại không thành công, hội chẩn thất bại. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)

Cách giải quyết

Đây là một lỗi nghiêm trọng, ảnh hưởng đến kết quả bệnh nhân cũng như cơ hội được làm những xét nghiệm cao cấp nhằm phục vụ điều trị. Không có cách khắc phục cho những mẫu đã mắc lỗi này. Phòng ngừa lỗi bằng cách

tuân thủ đúng quy trình xử lý mẫu. Nếu quy trình sai, cần phải thay đổi cho phù hợp (Tốt nhất là làm theo quy trình chuẩn được khuyến cáo bởi WHO). Kiểm tra hóa chất của quy trình xử lý mẫu, nhiệt độ paraffin có phù hợp hay không. Đổi với mẫu nhòe, mẫu sinh thiết nội soi cần có 1 quy trình xử lý riêng với thời gian ngắn hơn so với thường quy.



Hình 3: Mẫu sinh thiết nội soi được xử lý theo quy trình xé lát mẫu lớn, cấu trúc ở bề mặt niêm mạc hoàn toàn hư hỏng (Nguồn: Brown RW. Histologic preparations: common problems and their solutions)^[1].

Lỗi do cắt lọc

Biểu hiện

Cắt lọc không đúng tổn thương, mô không thẩm hóa chất.

Nguyên nhân

Người cắt lọc không đủ năng lực, ánh sáng phòng cắt lọc không tốt, tệp chất che lấp tổn thương. Lát cắt quá dày, quá lớn.

Cách giải quyết

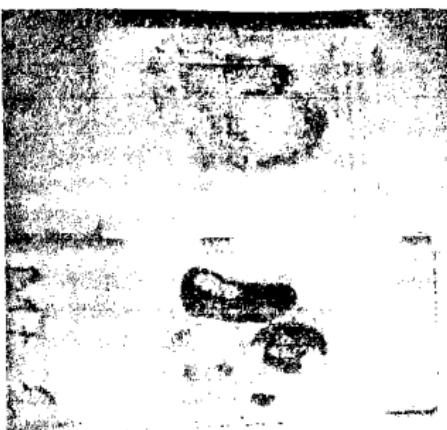
Cắt lọc lại đối với mẫu lớn. Đào tạo người cắt lọc, quy định lát cắt không dày quá 3mm, kích thước lát cắt phải nhỏ hơn cassette và mỗi cạnh cách mép cassette ít nhất từ 2-3mm. Cài tạo điều

kiện làm việc phòng cắt lọc. Thiết lập vòi nước để rửa tệp chất.

Lỗi do vùi mô

Biểu hiện

Các mẫu mô không biểu hiện hết trên tiêu bản.



This tissue was not flattened during embedding

Hình 4: (a), (b)Một phần của mẫu mô không được thêu luân hồi trên tiêu bản (Nguồn: (a) Bộ môn Giải phẫu bệnh – Đại học Y Dược TP HCM. (b): Brown RW. Histologic preparations: common problems and their solutions)^[1]

Nguyên nhân

Mẫu mô bị biến dạng cong, vênh sau khi xử lý nên không thể vùi trên cùng một thiết diện. Vùi trên bàn lạnh nên nhiều mẫu mô nhỏ không kịp xuống đáy khuôn.

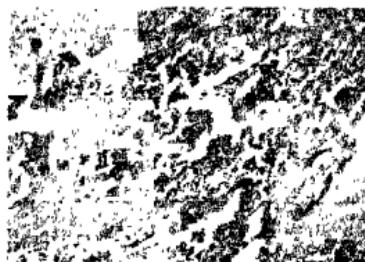
Cách giải quyết

Đối với mẫu mô lớn, có thể cắt sâu thêm hoặc thay đổi góc nghiên của block. Đối với mẫu mô nhỏ, cần đúc lại mẫu bằng cách để trên bàn nóng và chờ tới khi các mẫu đều xuống đáy khuôn thì mới để sang bàn lạnh. Cần kiểm tra lại quy trình xử lý mẫu vì mẫu bị cong vênh nhiều cho thấy quy trình xử lý mẫu không phù hợp.

Lỗi do cắt mỏng

Biểu hiện

Tiêu bản có hình ảnh gợn sóng hoặc lát cắt dày, bung block trong khi cắt mỏng. Có vết trầy trên tiêu bản. Có hiện tượng tan mô. Cắt mỏng chưa đủ sâu.



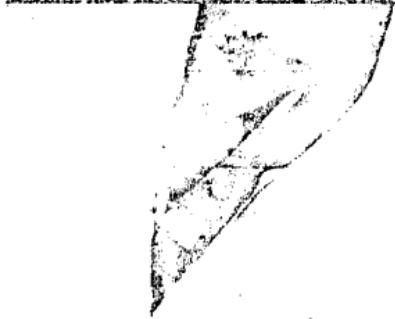
Hình 5: Bề mặt mô quá nóng làm cho các thành phần của mô bị phân tách, tạo thành các khoang (giả ảnh) (Nguồn: Brown RW. Histologic preparations: common problems and their solutions) ⁽¹⁾.



Hình 6: Tốc độ cắt mỏng quá cao tạo nên những vết nứt trầy. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)

Nguyên nhân

Có nhiều nguyên nhân khác nhau gây ra các lỗi này. Tan mô do bể tái mô quá nóng, nên dưới 56°C. Vết nứt trầy ở niêm mạc tiêu hóa do tốc độ quay tay cắt mỏng quá nhanh. Gấp mô do block chưa lạnh, cắt dồn mô và người vót mô không thể tách được. Vết cắt lượn sóng (đã loại trừ lý do xử lý mẫu) hoặc bung block do siết ốc không chặt, mẫu xơ hóa và quay tay cắt mỏng nhanh. Lát cắt quá dày do lỗi máy cắt hoặc người cắt không kiểm tra độ dày của lát cắt. Cắt mỏng không tới mô.



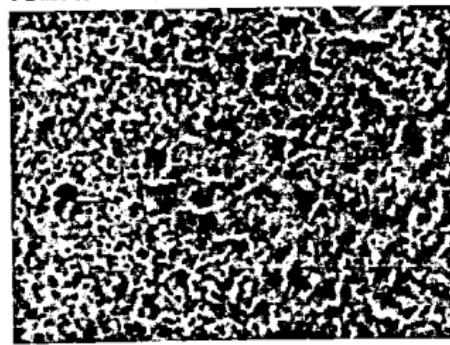
Hình 7: Việc căng mô không thành công, cắt mỏng nhăn tạo nên những nếp gấp. Không thể đánh giá vùng mô có nếp gấp. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)



Hình 8: Siết ốc của máy cắt mỏng không chắc, làm dao cắt mỏng không được cố định, tạo thành những lát cắt đứt đoạn. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)



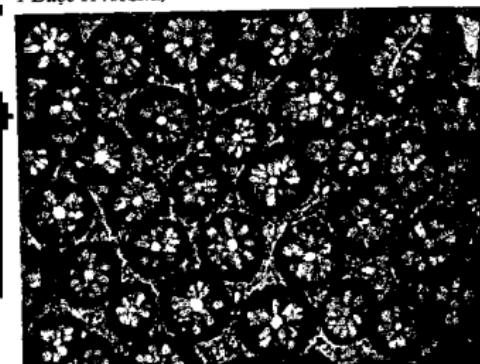
Hình 9: Hình ảnh này thường xuất hiện trên mô xo, góc nghiêng của dao quá đe dọa (dưới 10 độ), làm nhân tế bào bị đứt. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)



Hình 10: Lát cắt quá dày (trên 4 μm) khiến các nhân nằm chồng chất lên nhau. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)



Hình 11: Mẫu Y17-301x, cắt mỏng lần đầu chưa biểu hiện hết mô. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)



Hình 12: Mẫu Y17-301x, cắt mỏng lần sau. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)

Lỗi do nhuộm

Biểu hiện

Nhuộm Hematoxylin quá đậm hoặc quá nhạt, nhuộm không bắt màu.

Nguyên nhân

Nhuộm quá đậm hoặc nhạt thường là do không tuân thủ thời gian của quy trình nhuộm, không kiểm tra hóa chất trước khi nhuộm. Nhuộm không bắt màu thường là do paraffin không được khử hết trước khi vào hematoxylin.

Cách giải quyết

Khắc phục ngay đối với nhuộm quá đậm là cho đi qua acid cồn 0,5% để giảm độ đậm. Đối với nhuộm nhạt thì nhuộm lại với hemat, oxylin. Nếu không bắt màu Hematoxylin thì nên để khô tiêu bản rồi mới khử paraffin và nhuộm lại. Nhằm phòng ngừa việc không ổn định khi nhuộm, cần một quy trình nhuộm rõ ràng, đồng hồ bấm giờ là vô cùng cần thiết. Ngoài ra, cần có quy trình kiểm tra và thay hóa chất thường xuyên, tuân thủ độ pH lý tưởng của các phẩm nhuộm nếu tự pha.

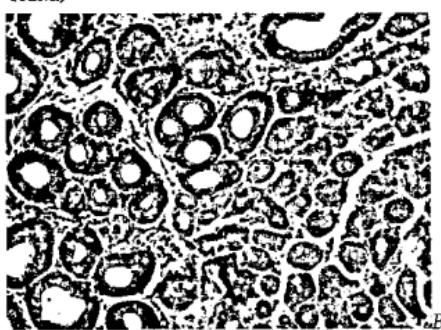


Hình 14 (a) Mẫu B17-xxxx chưa sấy khô nước và khử hết paraffin.

(Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)



Hình 13: Mẫu mô chưa khử hết paraffin trước khi cho vào phẩm nhuộm. Nhân mờ ám, không bắt màu Hematoxylin, bào tương cũng không bắt màu eosin. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)



Hình 14 (b) Mẫu B17-xxxx sau khi sấy khô và khử paraffin lại.

(Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)

Lỗi do dán tiêu bản

Biểu hiện

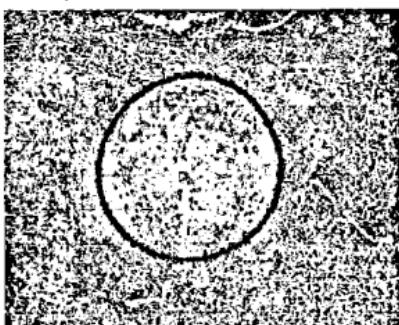
Có nhiều bọt khí sau khi dán tiêu bản.

Nguyên nhân

Keo dán quá loãng. Dán tiêu bản không đúng kỹ thuật. Có hiện diện nhiều bụi, mẫu mỏ vụn (thường xuất hiện trong mô giáp, mô nhiều máu).

Cách giải quyết

Có thể dùng kẹp để loại bỏ bọt khí do keo loãng hoặc do không dán đúng kỹ thuật. Đối với mẫu có bụi, mẫu mỏ vụn thì nên loại bỏ trước khi dán.



Hình 15: Bọt khí khi dán do keo loãng hoặc kỹ thuật dán không đúng (Nguồn: Brown RW. Histologic preparations: common problems and their solutions) ⁽¹⁾.



Hình 16: Mảng mô thiếu keo do bụi hoặc mủ vun. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)

Lỗi do các quy trình kiểm soát

Biểu hiện

Có sự không phù hợp giữa giấy chỉ định và mẫu gửi, giữa lâm sàng và kết quả giải phẫu bệnh.

Nguyên nhân

Sai sót tại nơi gửi mẫu, có sự nhầm lẫn trong quá trình cho mả cắt lọc (cùng tên, cùng tuổi, mẫu sinh thiết...), cắt lọc nhầm mẫu, đúc nhầm mả, viết mả nhầm tiêu bản, bác sỹ đọc nhầm tiêu bản, báo cáo nhầm kết quả, trả kết quả nhầm.

Cách giải quyết

Tùy vào mỗi nguyên nhân khác nhau mà ta có cách xử lý tình huống cho phù hợp nhầm

giảm thiểu tối đa thiệt hại có thể xảy ra. Để đảm bảo các lỗi này xảy ra ít nhất và được kiểm soát chặt chẽ, phòng Giải phẫu Bệnh cần có những quy trình kiểm soát cho mỗi khâu có thể xảy ra sai sót. Ví dụ: quy trình trả mẫu, quy trình kiểm mẫu, quy trình cho mả cắt lọc, quy trình kiểm tiêu bản trước khi bác sỹ đọc tiêu bản....

CÁC TRƯỜNG HỢP LỖI NGHIÊM TRỌNG VÀ CÁCH GIẢI QUYẾT

Trường hợp 1

Cúp điện trong lúc xử lý mẫu, máy hư khi đang xử lý

Cúp điện hoặc máy hư trong các bước xử lý mẫu, nếu ta biết thời gian cúp điện, chương trình tạm dừng, ta có thể tính toán thời gian để đảm bảo mẫu có thể xử lý tiếp tục. Đối với xử lý mẫu bằng máy qua đêm, chúng ta không biết rằng cúp điện trong bao lâu, máy xử lý đang tới bước nào, trong bao lâu. Bất kỳ một bước nào trong quy trình xử lý không đạt đều ảnh hưởng nhiều hay ít tới chất lượng tiêu bản sau đó.

Cách giải quyết

Chúng ta có thể tiếp tục chạy chương trình xử lý mẫu sau khi có điện hoặc sau sửa chữa, hoặc chuyển sang chạy tay nếu có người trực máy. Biện pháp phòng ngừa là mua máy lưu điện cho các máy xử lý mô. Có chương trình bảo trì máy thường xuyên và có máy xử lý mô dự phòng. Ngoài ra, cần phải có 1 quy trình chuyển mẫu sang cơ sở khác có máy xử lý mẫu.

Trường hợp 2: Bỏ mẫu sau khi cắt lọc vào paraffin

Đây là một lỗi do bất cẩn trong khi làm việc (thường xảy ra ở các máy xử lý cơ). Lỗi này gây hậu quả ít nghiêm trọng nếu được xử lý đúng chỉ trong thời gian xử lý và vật tư tiêu hao. Thời gian mẫu nằm trong paraffin tăng thì tính nghiêm trọng sẽ tăng lên.

Cách giải quyết

Lấy toàn bộ cassette chứa mẫu ra khỏi paraffin ngay lập tức, sau đó cho vào nước lạnh

trong 5 phút. Lấy từng cassette ra, từ từ dùng kẹp loại paraffin ra, gấp mô sang 1 cassette mới có cùng mã giải phẫu bệnh, rồi hủy cassette cũ. Trong quá trình xử lý này cần tuyệt đối cẩn thận, tránh nhầm lẫn mẫu.

Trường hợp 3: Mẫu xử lý không tốt

Mẫu xử lý không tốt là một vấn đề nghiêm trọng, ảnh hưởng tới bệnh nhân. Thường xảy ra đối với mẫu có nhiều mô mỡ như mô vú, mô mỡ, mô hạch có mô xung quanh.

Cách giải quyết

Xử lý lại mẫu. Đây là một giải pháp tinh huống. Phòng ngừa bằng cách: thiết lập một máy dành riêng cho những loại mô này với thời gian xử lý dài hơn, cắt lọc những mô này thành những lát mỏng 1-2mm, đối với mô mỡ xung quanh nếu không cần thiết thì nên loại bỏ trước khi xử lý.

Trường hợp 4

Mẫu nhỏ, mẫu nội soi có vấn đề

Cách giải quyết



Hình 18: Mẫu không thấm hóa chất tạo hiện tượng sương mù trên tiêu bản. (Nguồn: Bộ môn Giải Phẫu Bệnh – Đại Học Y Dược TP. HCM.)

KẾT LUẬN

Kỹ thuật GPB đóng vai trò quan trọng trong chẩn đoán GPB. Kỹ thuật GPB gồm rất nhiều quy trình, dễ xảy ra nhiều lỗi khác nhau làm ảnh hưởng đến chất lượng tiêu bản, gây khó khăn

Không có giải quyết tinh huống trong trường hợp này, chỉ có giải pháp phòng ngừa.

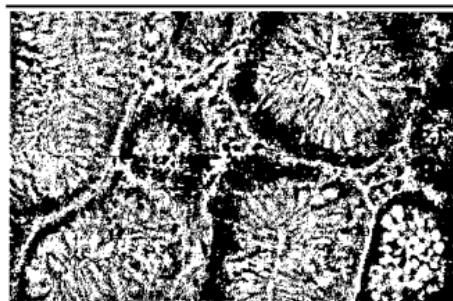
Xây dựng một quy trình xử lý riêng cho mô nhỏ.

Cassette lỗ nhỏ nên được thay thường xuyên, dùng cho mỗi mẫu riêng, không nên tái sử dụng.

Sấy tiêu bản thật khô trước khi bắt đầu quy trình nhuộm H&E.



Hình 17: Mẫu giòn, cứng khi chạy cùng quy trình với mẫu lớn (Nguồn: Brown RW. Histologic preparations: common problems and their solutions) [1]



cho việc chẩn đoán. Do đó, người kỹ thuật viên ngoài việc nắm vững và thực hành tốt các quy trình Giải Phẫu Bệnh, còn cần có khả năng nhận biết và xử lý các lỗi kỹ thuật thường gặp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1 Brown RW (2009). *Histologic preparations: common problems and their solutions*. Northfield, IL: College of American Pathologists;
- 2 <http://hoosierjobs.com/news/hr-news/bieu-do-xuong-ca-cong-cu-phan-tich-nguyen-nhan-va-giai-phap-chocac-van-de.35a523e9/en>. Accessed July 19, 2017. Biểu đồ Xương Cá – Công cụ phân tích nguyên nhân và giải pháp cho các vấn đề. HOA SEN GROUP.

3 Tiford M (2006). A Short History of Histopathology Technique. *Journal of Histotechnology*; 29(2):99-110. doi:10.1179/his.2006.29.2.99.

Ngày nhận bài báo:

15/05/2017

Ngày phản biện đánh giá bài báo:

28/05/2017

Ngày bài báo được đăng:

30/06/2017