



HÓA MÔ MIỄN
DỊCH VÀ CÁC
KỸ THUẬT
LIÊN QUAN

Ths. BS Lưu Nguyễn Anh
Thư

Nội dung

Lịch sử

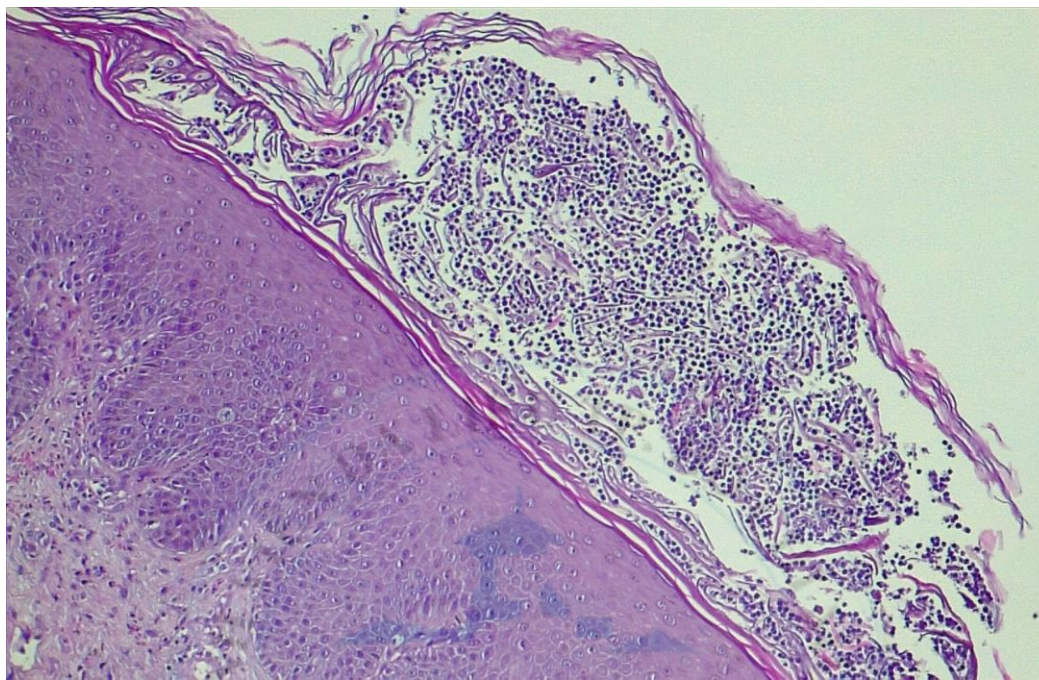
Nguyên lý cơ bản

Kỹ thuật

Kết quả

Tương lai của HMMD và MDHQ

HMMD thường dùng trong Da liễu



primary antibody:
rabbit antibody
directed against
antigen A

secondary antibodies:
marker-coupled antibodies
directed against rabbit
antibodies



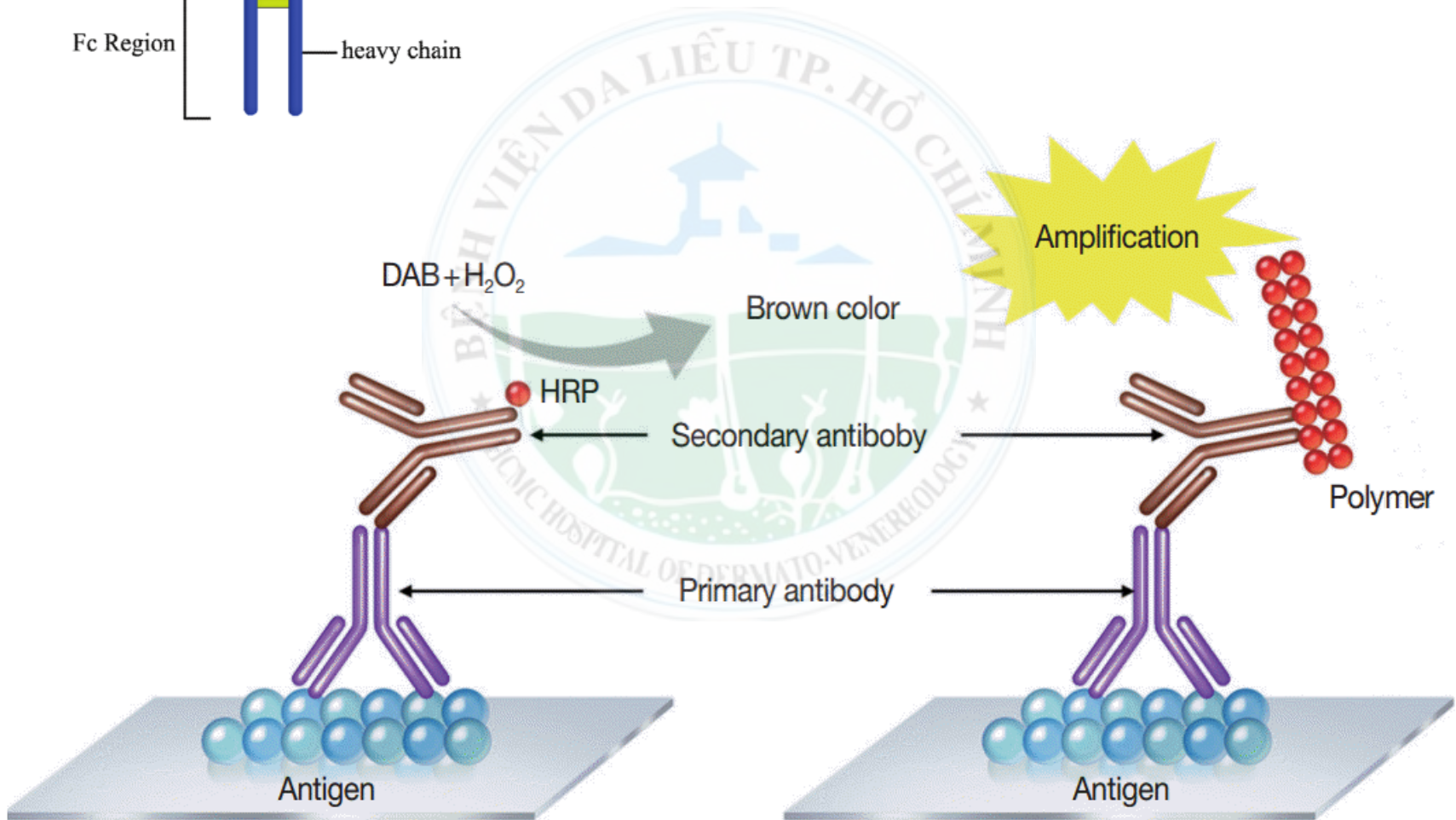
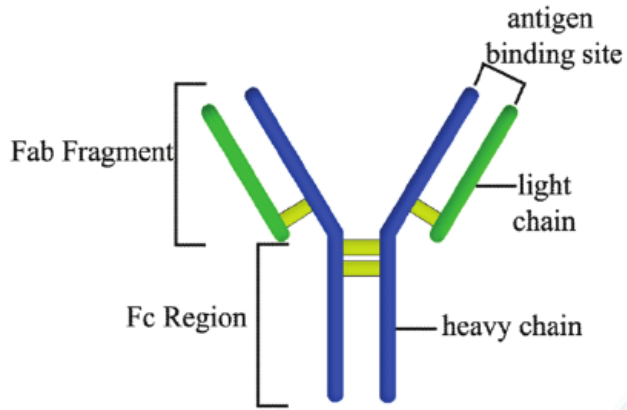
Figure 9-16. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

I. Lịch sử

Năm 1941, Albert Coons và cs phát triển phương pháp MDHQ gián tiếp trên mô cắt lạnh (KHV huỳnh quang).

Cải tiến quan trọng nhất là của Avrameas và cs (1966). Dùng kỹ thuật đánh dấu men và hệ thống các chất chỉ thị màu → xác định phức hợp KN-KT bằng **KHV quang học**.

- Năm 1974, Heitzman và Richards sử dụng KT cầu nối avidin-biotin làm phóng đại hệ thống nhận biết phức hợp lên nhiều lần → tăng độ nhạy và độ đặc hiệu.
- Năm 1974, Taylor và cs bộc lộ thành công kháng nguyên trên mô cố định bằng formol 10% và vùi nén (**FFPE**).
- 1992: máy nhuộm HMMD



II. Nguyên lý cơ bản

Kết hợp phản ứng MD và hóa chất để làm hiện rõ các **KN** hiện diện trong tế bào (bào tương, màng tế bào, nhân)

Sử dụng hệ thống nhận biết cho KN-KT

1/ KT (primary antibody):

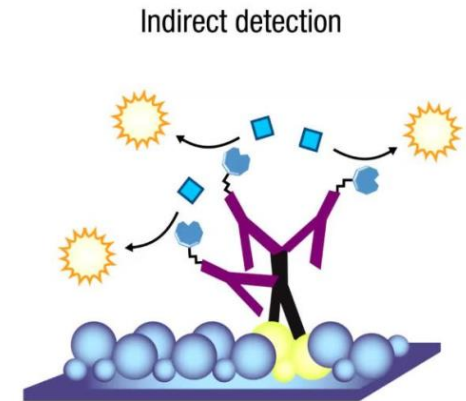
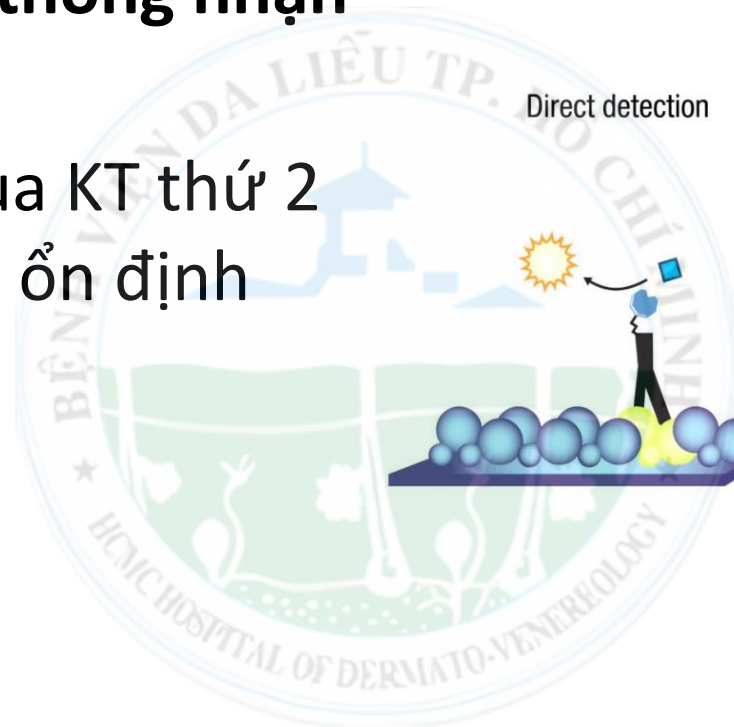
- Chuỗi nặng của KT là không thay đổi.
- **Chuỗi nhẹ thay đổi, là nơi gắn với KN.**
- KT đơn dòng: bắt duy nhất 1 epitope (đặc hiệu cao nhưng nhạy thấp).
- KT đa dòng: nhạy hơn nhưng kém đặc hiệu, dễ nhuộm nền.

2/ KN:

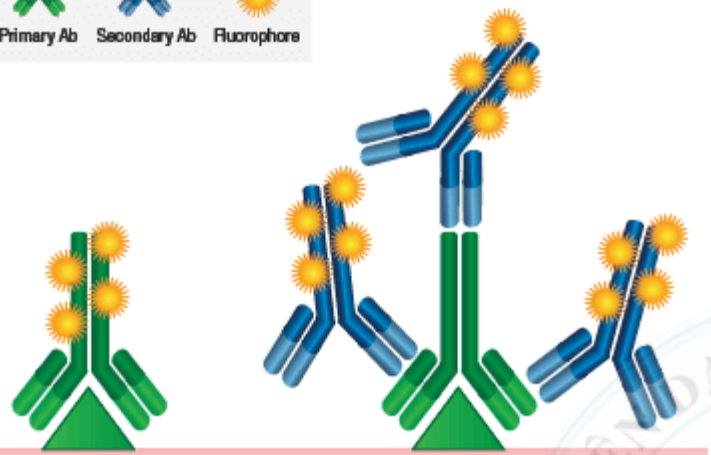
- Protein, carbohydrate
- 1 hoặc nhiều epitope (quyết định KN)

3/ Hệ thống nhận biết:

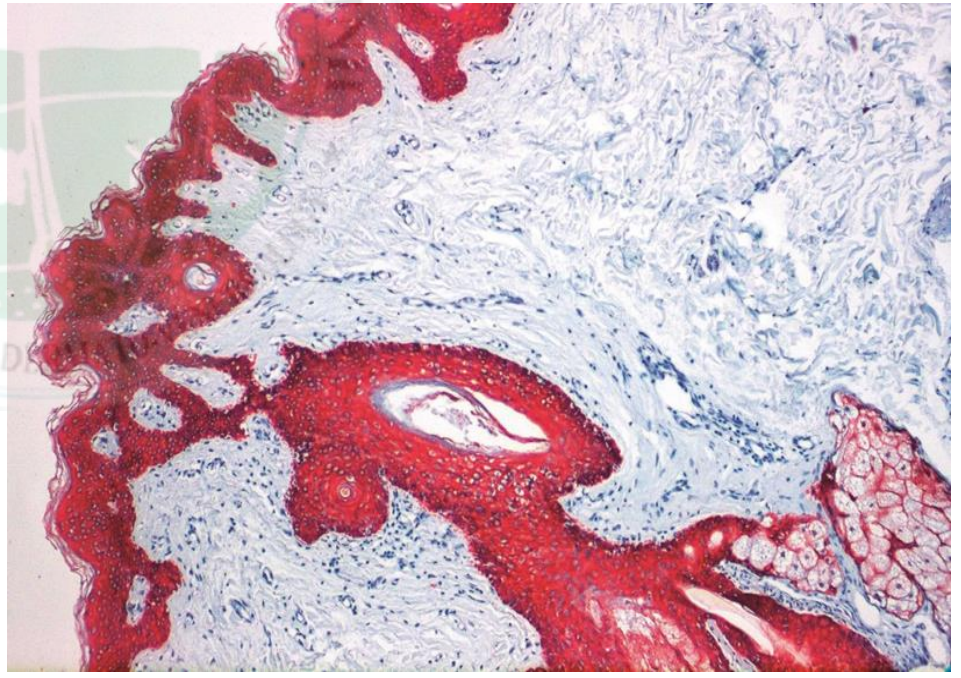
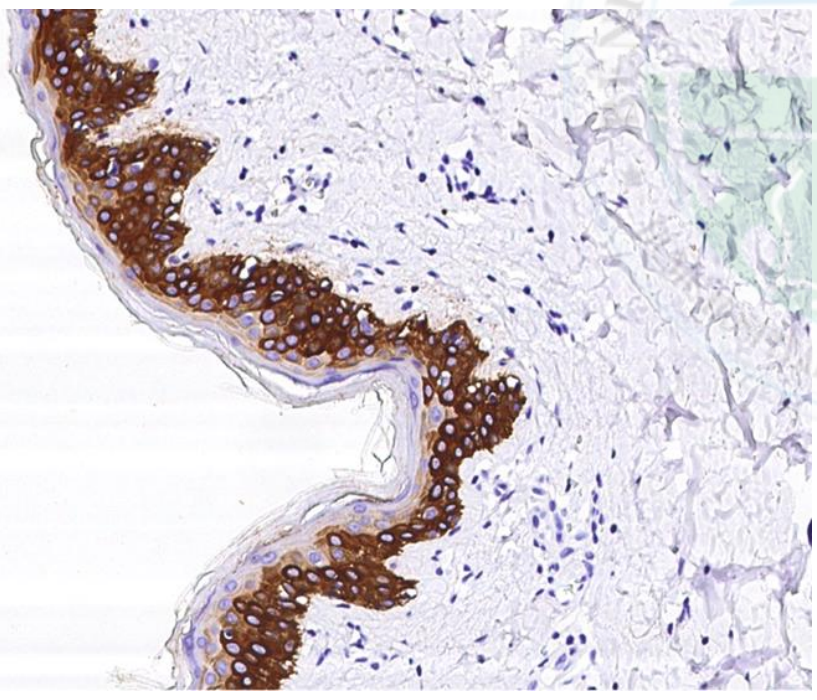
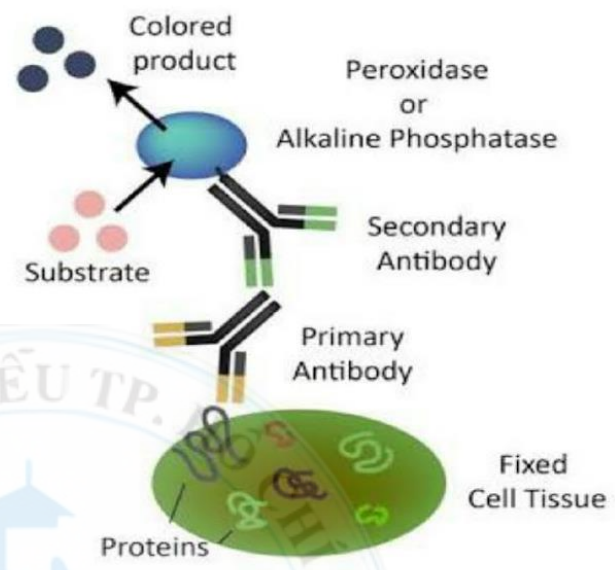
- Gồm 2 phần: **KT thứ 2** (hay KT bắc cầu, secondary antibody) và **hệ thống nhận biết phức hợp**.
- Vùng thay đổi của KT thứ 2 liên kết với vùng ổn định của KT thứ nhất.



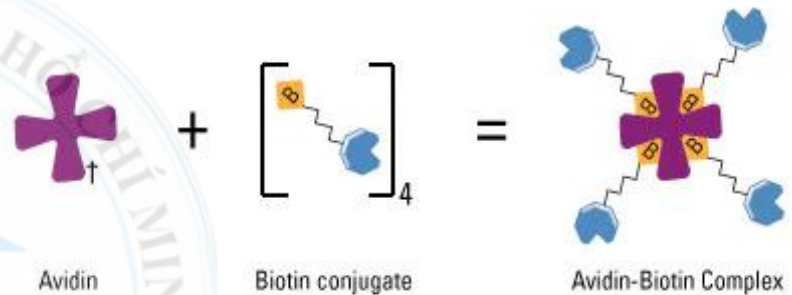
- Có 2 kỹ thuật: MDHQ và HMMD men.
- MDHQ: chất phát huỳnh quang (FITC), quan sát dưới KHV huỳnh quang.
- MD men: KN-KT gắn men (peroxidase; alkaline phosphatase) và gắn chất màu (chromogen), quan sát dưới KHV quang học.
- Chromogen: **DAB** (màu nâu, bền, gây ung thư mạnh hơn, phải đeo găng và mang khẩu trang), AEC (màu đỏ, kém bền, ít gây ung thư hơn DAB)
- MD men trực tiếp: chỉ cần KT thứ nhất và phổ phát quang.
- MD men gián tiếp: thêm nhiều KT thứ 2 giúp tăng độ nhạy.



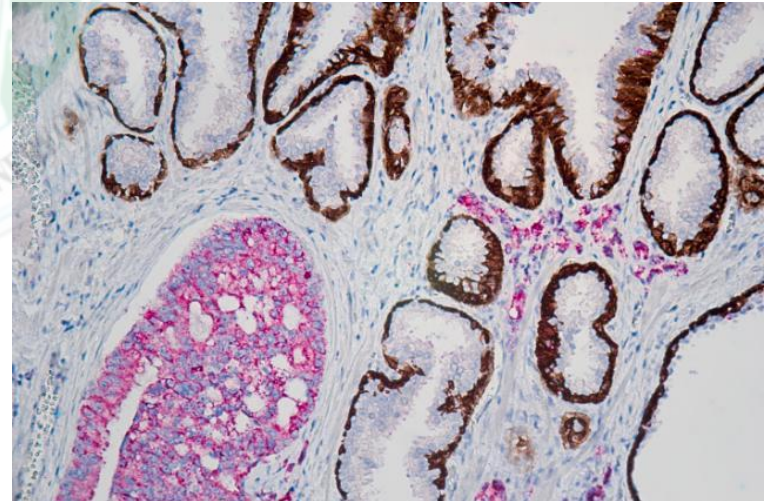
Tissue



- Phương pháp không đánh dấu KT: **cầu nối Biotin-Streptavidin** (phổ biến nhất vì độ nhạy và đặc hiệu cao, 1 phân tử avidin có 4 vị trí gắn men peroxidase nên HT nhận biết được phóng đại lên 4 lần)



- **HMMD đa màu, đa mồi: 2** hay nhiều KN trên cùng một mẫu mô, cùng một tiêu bản. VD: DAB + fast red.



III. KỸ THUẬT NHUỘM HMMD

1/ Cố định: formol buffer 10% trung tính, từ 6-48 giờ và trong vòng 30 phút sau khi lấy ra khỏi cơ thể.

2/ Xử lý mô: 12 bước. Đối với mẫu nhỏ có thể ít bước hơn hoặc thời gian ngắn hơn.

3/ Chuẩn bị mẫu mô:

Chọn mẫu chứng phù hợp với từng loại KT.

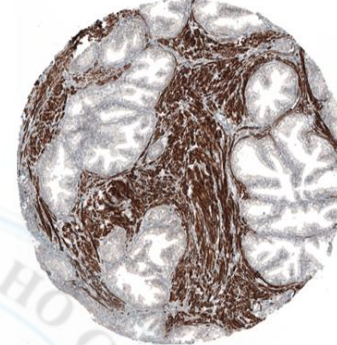
Cắt mỏng đẹp, vớt lên tiêu bản đã có chứng.

Sấy tiêu bản ở 56-60 độ C trong 3 giờ hoặc ủ 37 độ C qua đêm

4/ Bộc lộ KN mô (antigen retrieval):

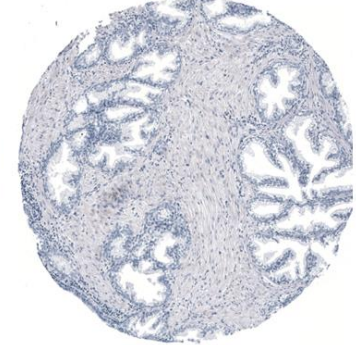
- Nhà sản xuất KT sẽ có cách bộc lộ KN khác nhau cho từng loại KT.
- Thường có 4 loại chất bộc lộ KN: pH cao, pH thấp, dung dịch citrate buffer, protease.

HIER High pH
Tris-EDTA pH 8.8



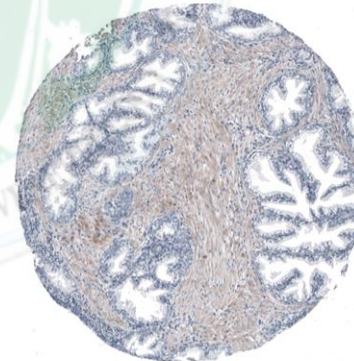
Optimal staining

TIER
Trypsin



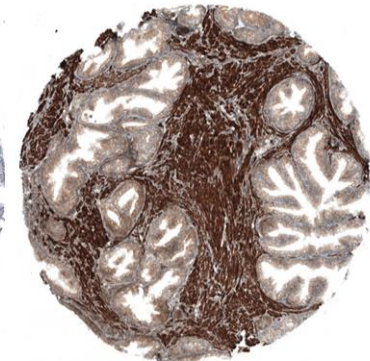
Negative staining

No Antigen Retrieval



Weak/absent staining

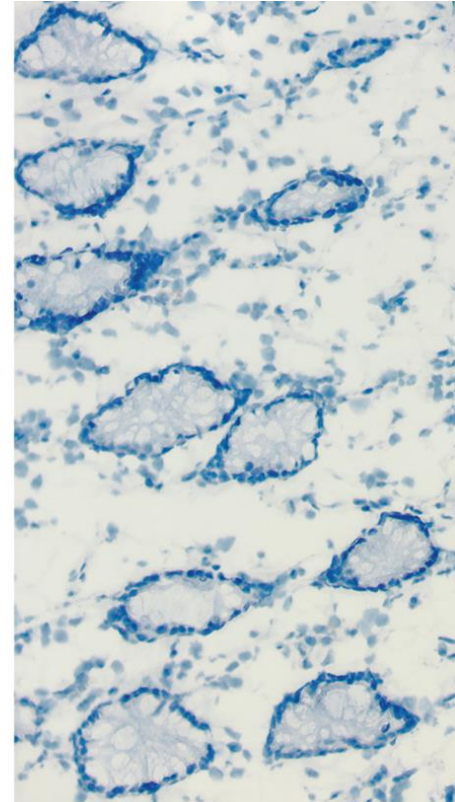
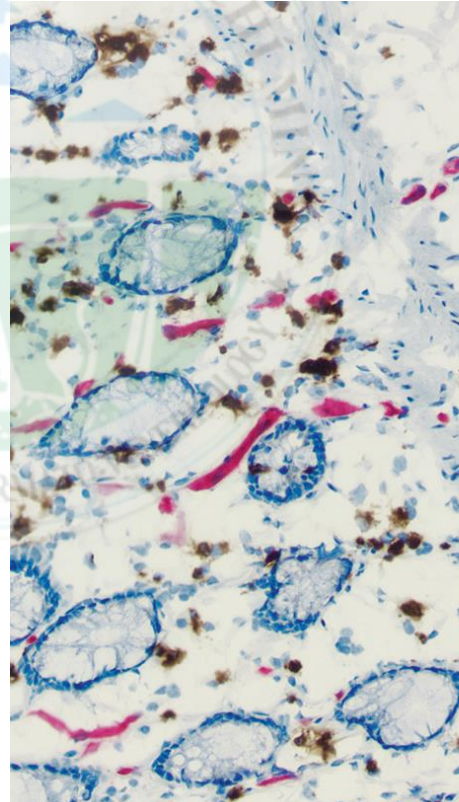
HIER Low pH
Citrate pH 6.0

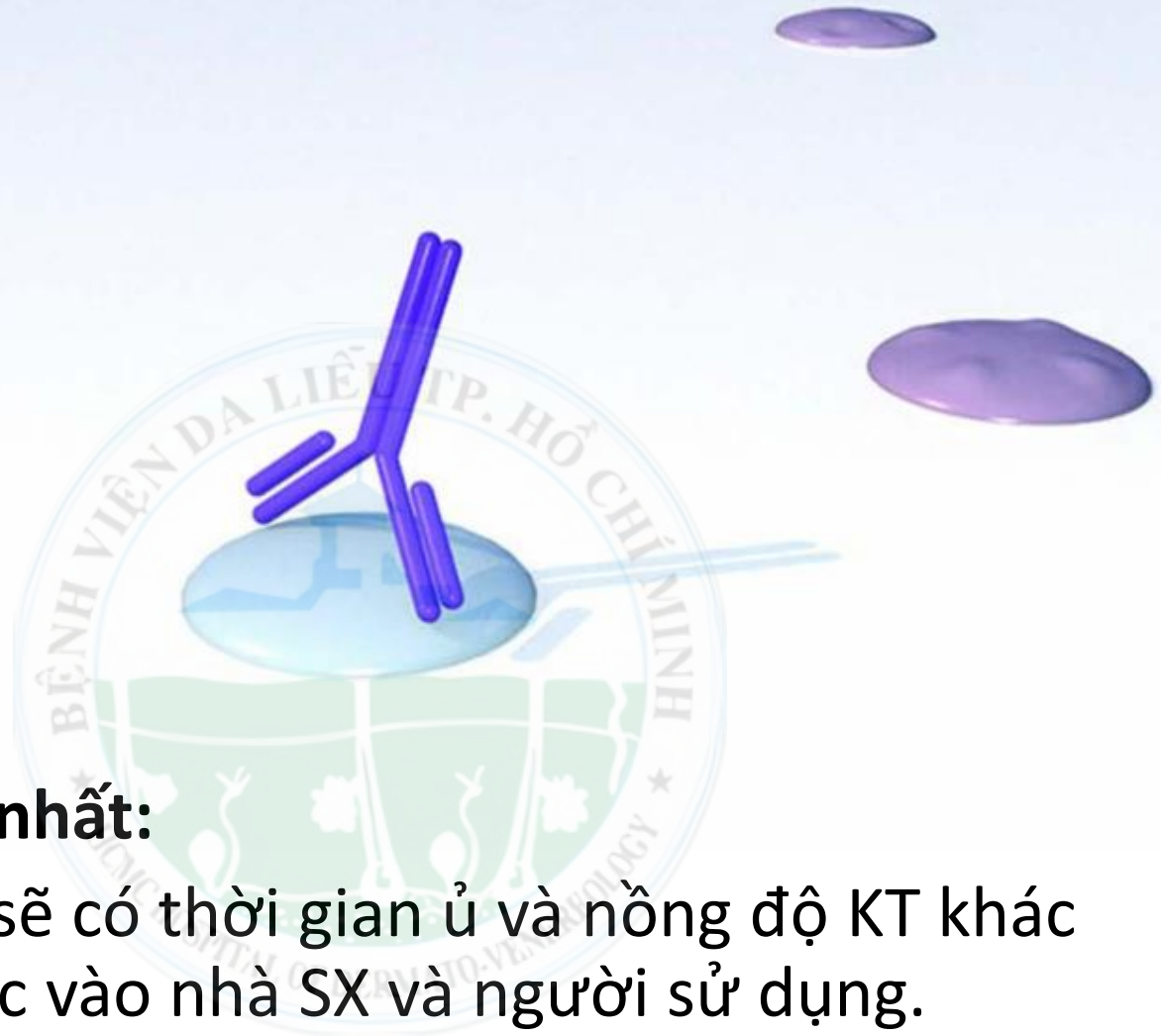


Unspecific staining

5/ Ức chế men peroxidase và biotin nội sinh:

- Cần thiết để **tránh nhuộm không đặc hiệu và nhuộm nền.**
- Hóa chất thường sử dụng là oxy già 3%, protein block.

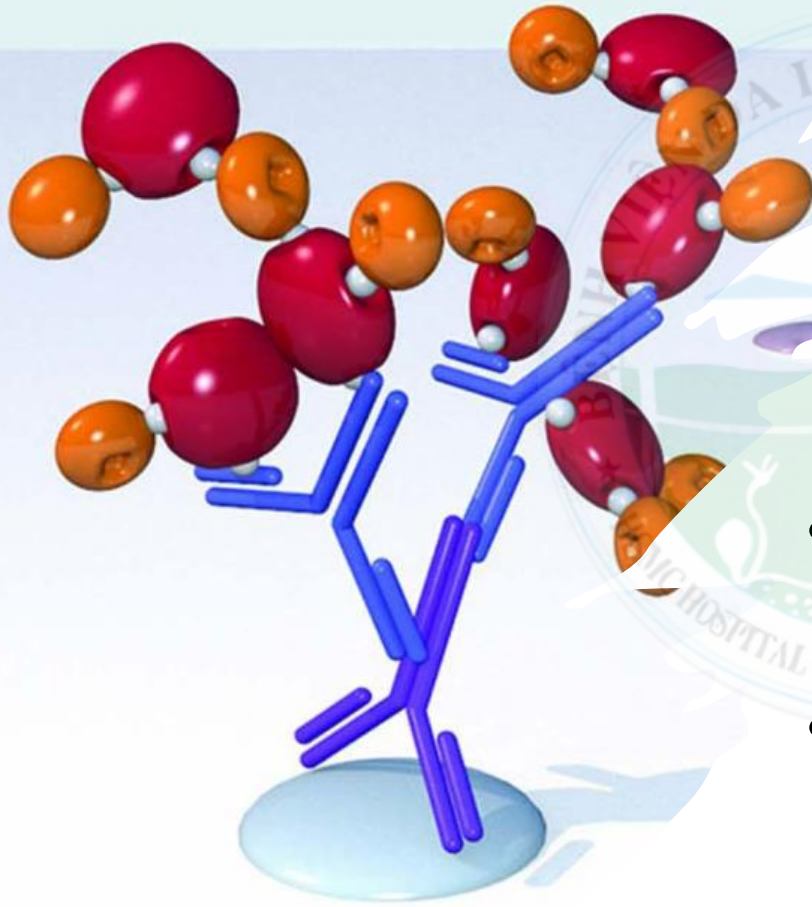




6/ Ủ với KT thứ nhất:

- KT khác nhau sẽ có thời gian ủ và nồng độ KT khác nhau tùy thuộc vào nhà SX và người sử dụng.
- Ủ ở 37 độ C và trong môi trường độ ẩm cao nhằm tạo điều kiện hoạt động tốt nhất cho KT tránh bốc hơi.

7/ Hệ thống nhận biết phức hợp:



- Đối với mỗi nhà SX sẽ có HDSD cho bộ kit của hãng.
- Cần lưu ý với các thành phần của bộ kit vì có khả năng **gây ung thư rất cao**, đặc biệt là chromogen.

8/ Nhuộm nhân – nhuộm tương phản:



- Phủ cơ chất (peroxidase) và màu (DAB)

Công dụng của các hóa chất dùng trên máy

Bộ DAB Kit:

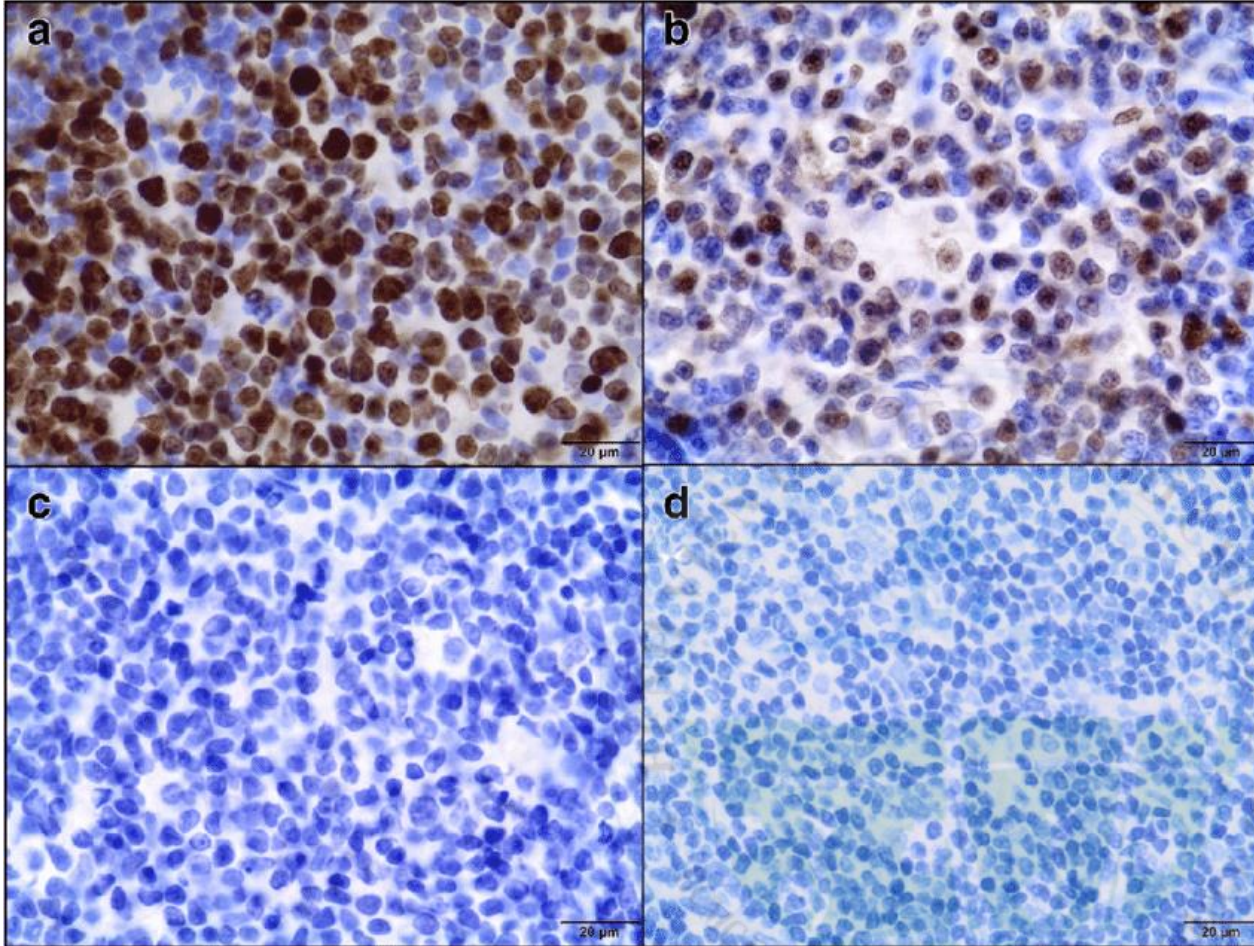
1. DAB inhibitor (3% H₂O₂): ức chế men peroxidase và biotin nội sinh. Nhỏ vào mô trước khi nhỏ KT thứ nhất.
2. HRP Multimer (<50 microgam/mL): KT thứ 2.
3. DAB chromogen (0,2% DAB): chất chỉ thị màu
4. DAB H₂O₂ (0,04% H₂O₂): oxy hóa chất chỉ thị màu
5. DAB Copper (CuSo₄ 5g/L): chất bảo quản màu

Frequency

Pattern

IV. Kết quả

- Âm tính: chỉ có màu xanh tím.
- Dương tính: màu nâu (DAB).
- Tăng/giảm tín hiệu. VỊ TRÍ.
- Điều kiện đọc KQ: phải có tiêu bản chứng âm và chứng dương; phải đối chiếu với tiêu bản nhuộm thường quy để biết vùng cần đọc KQ; biết rõ vị trí KN cần xác định ở nhân, bào tương hay màng bào tương.

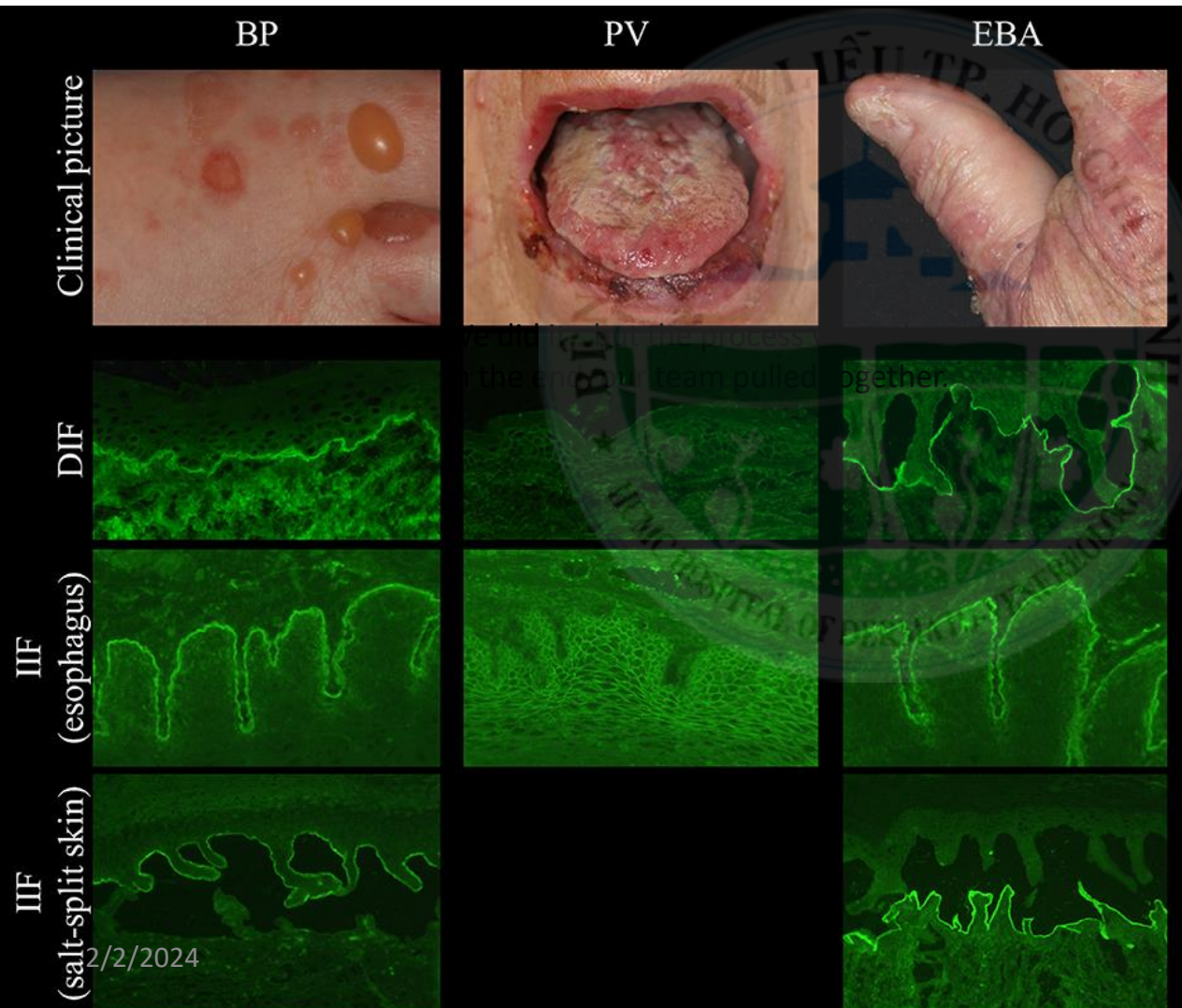


Lam tích
điện
Chứng
Bệnh





V. HMMD vs MDHQ

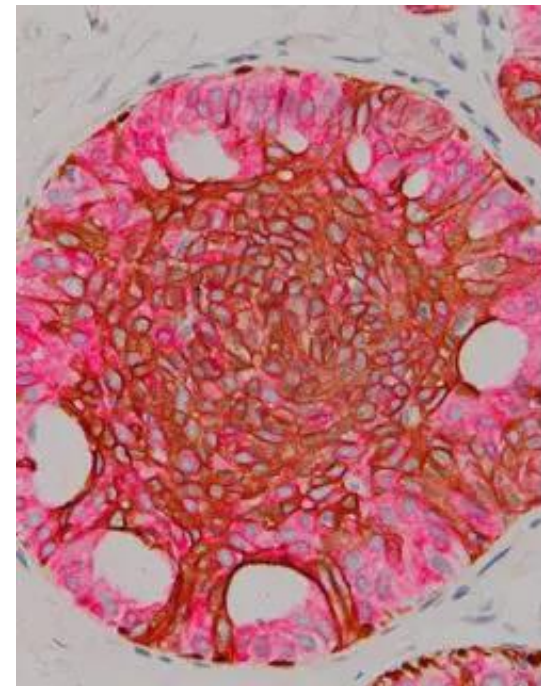


We did it...but the process was exhausting.

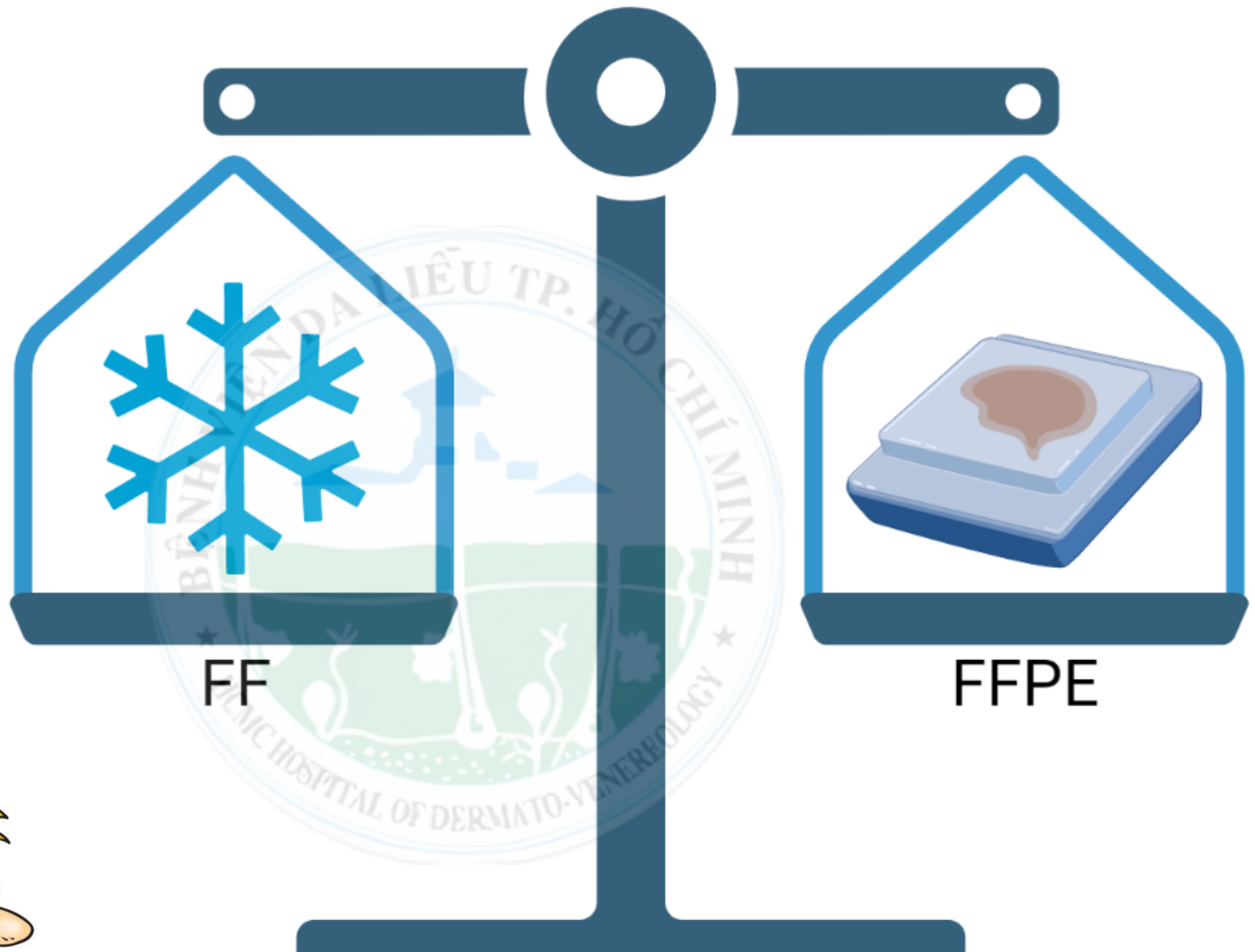
Front. Med. 2018 (5)
Sec. Dermatology

Cải tiến theo thời gian

- Immunofluorescence Technique
- Immunoperoxidase Methodology
- Diagnostic Immunohistochemistry
- Automated Immunohistochemistry
- Predictive Immunohistochemistry
- Multiplex Computational Immunohistochemistry







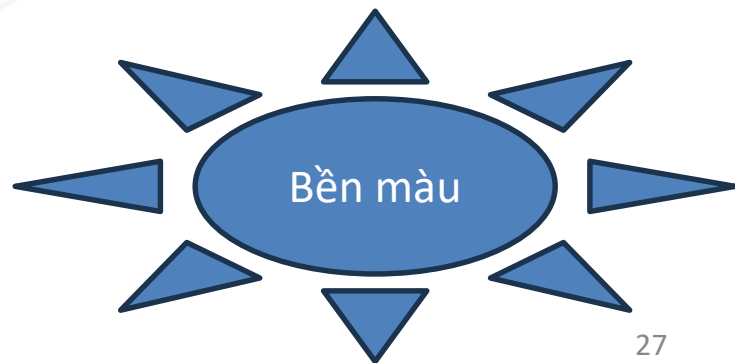
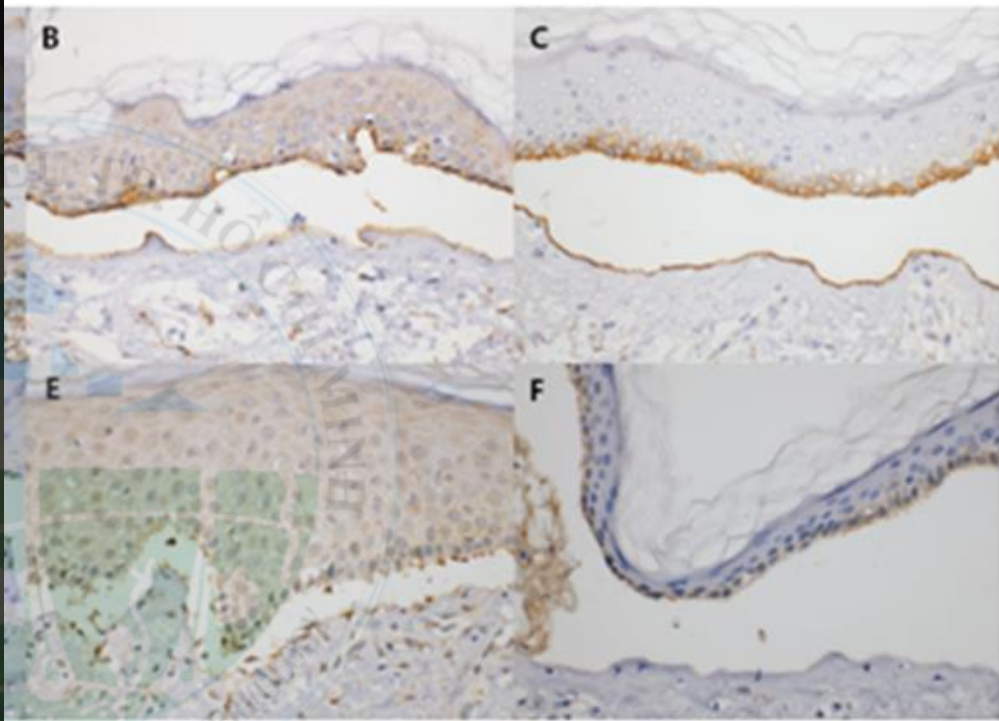
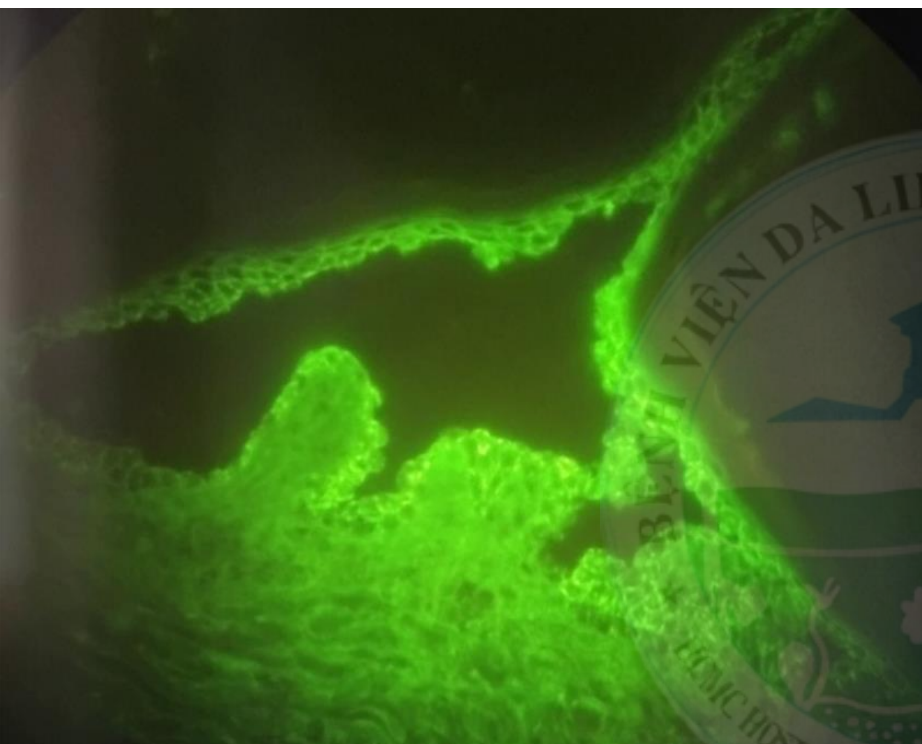
To Freeze or Fix: Deciding between fresh-frozen or formalin-fixed paraffin embedded sample preservation

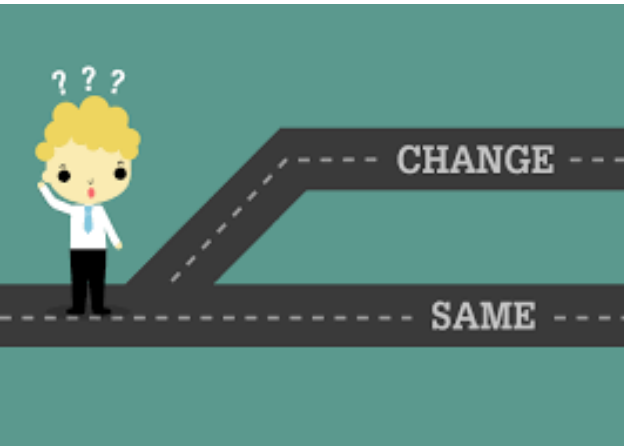
MDHQ

- Mô cắt lạnh
- Trang bị phòng lab
- Chi phí cao
- Khó bảo quản
- Skill của KTV và bs GPB.

HMMD

- Có giá trị CĐ trong các bệnh da viêm.
- Dễ quan sát và diễn giải kết quả
- Dễ bảo quản mẫu và lưu trữ





Tác giả	Năm	Cỡ mẫu	Dấu ấn	Độ nhạy (so MDHQ)	Độ đặc hiệu (so MDHQ)
Kamyab ²²	2019	30 (có 30 chứng)	C4d	90%	86,7%
Akbari ²⁰	2015	134	C3d và C4d	93%	
Wang ¹²	2020	51	C3d	74,1%	95,8%
Glauser ¹⁶	2016	38	C3d	37%	80%
Pfaltz ¹⁸	2010	32	C3d	97%	
Magro ¹⁷	2008	17	C3d	100%	
Abrèu-Velez ²⁴	2013	30	Nhiều dấu ấn	98%	
Oh H ²⁷	2022	88	C3d, C4d, Ig	86%	75,6%
Kwon E.J ²⁸	2013	12 ca BP và 31 ca BP thai, khác	C4d	83,3%	
Shimanovich I. ²⁹	2018	50 (pemphigoid niêm mạc)	C3d C4d C3d±C4d	46-53% 52%-59% 56-68%	
Mohammed E. ³⁰	2019	30 ca BNTM	C4d	96,7%	100%

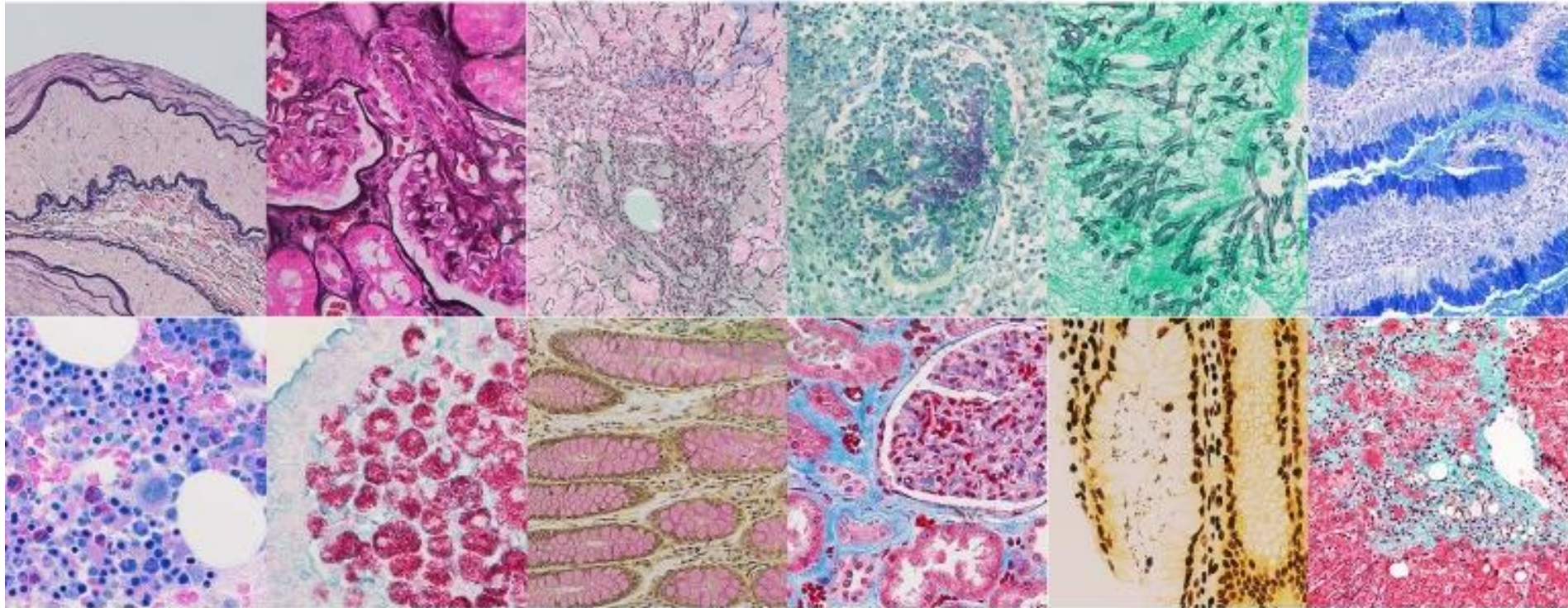
2/23/2024

How to cite this article: Oryani MA, Tayebi-Meybodi N, Nahidi Y, Sabi MS, Aghaei MA. Immunohistochemical evaluation of C4d and C3d markers in bullous pemphigoid as a substitute for direct immunofluorescence technique. Indian J Dermatol 2023;68:541-5.

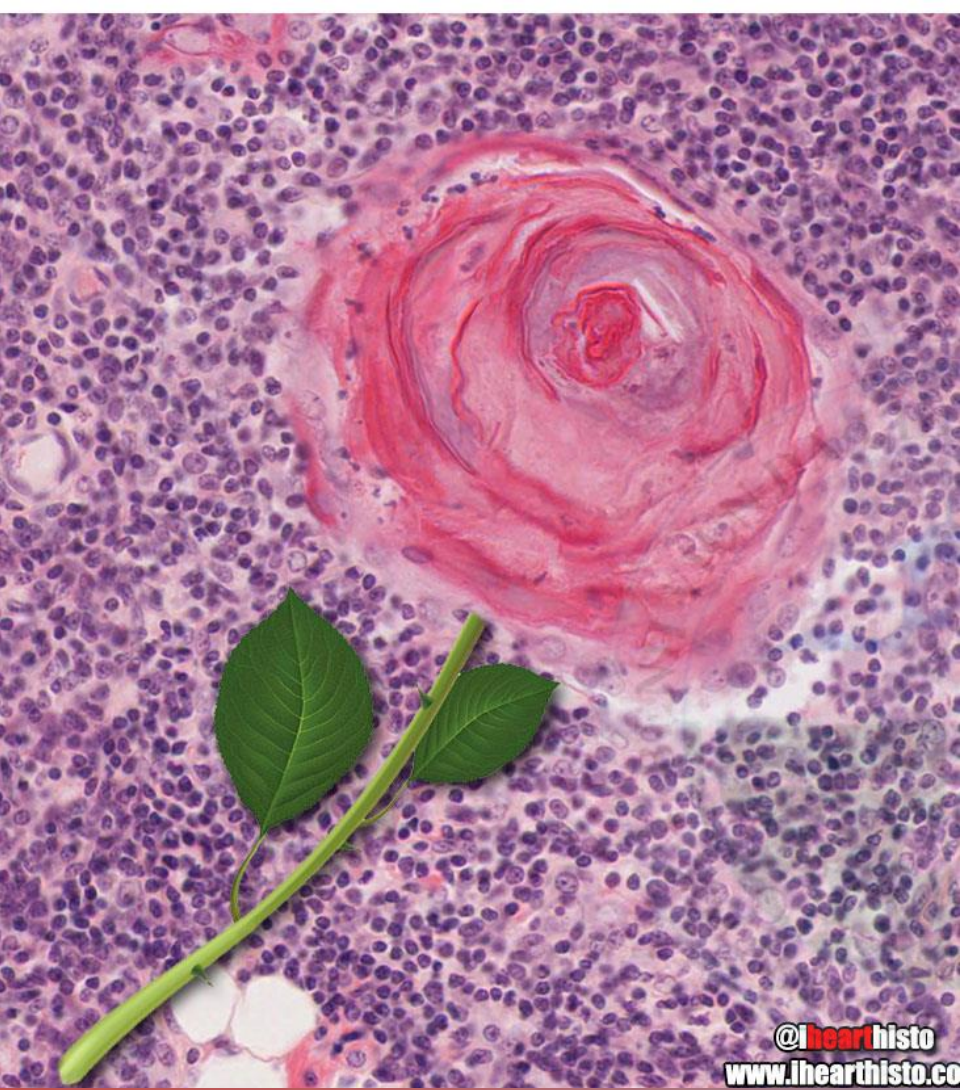
VI. HMMD thường dùng trong Da liễu

- Biểu mô: CEA, EMA, CK,...
- Trung mô: desmin, vimentin, CD117,...
- Sợi: CD34. Mạch máu: CD31, D2-40.
- Thần kinh, thần kinh nội tiết: S100, NSE, Synaptophysin, chromogranin...
- Mô bào: CD68, CD1a, ... Huyết học: LCA, CD117...
- Melanoma: MART-1/melan A, HMB45, S100
- Lymphoma: CD3, CD20, CD2, CD5, CD4, CD8, CD56...
- Khác: Ki67, p53, p16

NHUỘM ĐẶC BIỆT: PAS, Alcian Blue, GMS , Trichrome, AFB, Giemsa, CongoRed, elastin



Nhân sự	Quy trình	Trang bị Phòng ốc	Cost-benefit (kinh tế)
<p>2 bác sỹ</p> <p>2 kỹ thuật viên</p> <p>(thư ký)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Quy trình GPB thường quy ✓ Nhuộm máy ✓ Nhuộm tay ✓ Chuyên gia 		



@Ihearthisto
www.Ihearthisto.co



Xin chân thành cảm ơn!

2/2/2024

- Hóa mô miễn dịch và miễn dịch huỳnh quang là những kỹ thuật giải phẫu bệnh nâng cao, được chỉ định khi cần tiếp nối thêm những thông tin chẩn đoán hoặc tiên lượng vượt quá khả năng kết luận của kỹ thuật thường quy.
- Được phát triển và cải tiến xuyên suốt từ nửa sau thế kỷ 20 đến nay, hóa mô miễn dịch ngày càng phổ biến trên toàn thế giới, mở rộng vai trò trong chọn lựa phương pháp và thuốc điều trị, có tiềm năng thay thế miễn dịch huỳnh quang vốn là kỹ thuật ra đời trước nhưng có nhiều điểm hạn chế.
- Trong chuyên khoa da liễu, hóa mô miễn dịch có vai trò quan trọng trong chẩn đoán bệnh, nhằm xác định bản chất của tế bào và cấu trúc mô học phục vụ trong chẩn đoán ung thư da và phần phụ da, bệnh da nhiễm trùng, bệnh huyết học ở da, bệnh mạch máu,...
- Để triển khai kỹ thuật này, trước tiên cần đảm bảo quy trình, tay nghề kinh nghiệm và cơ sở vật chất của kỹ thuật thường quy; sau đó cần lựa chọn dấu ấn hóa mô phổ biến và phù hợp cho nhu cầu tại bệnh viện Da liễu như S100, HMB45, p16, p63, CD3, CD20, CD117...