

Nghiên cứu

Chuẩn hoá quy trình nhuộm von Kossa trong chẩn đoán bệnh Malakoplakia

Đặng Ngọc Khánh¹, Đặng Hoàng Minh¹, Bùi Thị Huyền Thương¹, Phạm Quốc Thắng¹,
Nguyễn Ngọc Minh Tâm², Nhan Thị Hiếu², Bùi Thị Thanh Tâm¹, Đặng Trần Quân^{1*}

¹Trường Y - Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Giải phẫu bệnh - Bệnh viện Bình Dân, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): Đặng Trần Quân; Email: dangtranquan@ump.edu.vn

Ngày nhận bài (Received): 02/05/2026; Ngày duyệt đăng (Accepted): 09/06/2026; Ngày xuất bản (Published): 10/08/2026

DOI:10.34071/jmp.2026.S-2.20

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Kỹ thuật nhuộm von Kossa là một phương pháp quan trọng trong giải phẫu bệnh và mô phôi học nhằm phát hiện sự hiện diện của canxi trong các mô cơ thể. Kỹ thuật này hỗ trợ chẩn đoán một số bệnh lý, trong đó có Malakoplakia - một thể bệnh viêm hiếm gặp có thể nhầm lẫn với các bệnh lý khác. Việc chuẩn hoá quy trình nhuộm von Kossa giúp ích cho thực hành.

Mục tiêu: Chuẩn hoá quy trình nhuộm von Kossa

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Thực nghiệm mô tả trên ca bệnh chẩn đoán xác định Malakoplakia, mẫu mô được cắt mỏng ở các độ dày là 3, 4, 5 và 6 µm với thời gian ủ bạc nitrate 5% lần lượt ở các mốc 15, 30, 45 và 60 phút. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần và đánh giá hiệu quả qua sự biểu hiện thể Michaelis-Gutmann (M-G).

Kết quả: Phương pháp nhuộm làm nổi bật thể M-G dạng “hình bia” màu đen. Kết quả phụ thuộc vào độ dày lát cắt và thời gian ủ bạc nitrate 5%. Thời gian ngắn 15 phút, hầu hết các mẫu bắt màu nâu nhạt đến nâu đen, chưa đạt độ tương phản cần thiết. Với mốc 30 - 45 phút, thể M-G trên lát cắt 4 µm và 5 µm có dạng hình bia đặc trưng và màu đen đồng nhất. Thời gian ủ 60 phút tất cả mẫu đều bắt màu đen đậm, nhưng lại gây hiện tượng quá nhuộm trên các lát mỏng, làm che lấp hình thái.

Kết luận: Chuẩn hóa quy trình khuyến cáo lát cắt mỏng 4 µm và thời gian ủ bạc nitrate 5% khoảng 45 phút cho biểu hiện tốt nhất.

Từ khóa: von Kossa; Malakoplakia; thể Michaelis-Gutmann.

Standardization of von Kossa staining protocol for the diagnosis of Malakoplakia

Đặng Ngọc Khanh¹, Đặng Hoàng Minh¹, Bùi Thị Huyền Thương¹, Phạm Quốc Thắng¹,
Nguyễn Ngọc Minh Tâm², Nhan Thị Hiếu², Bùi Thị Thanh Tâm¹, Đặng Trần Quân^{1*}

¹University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City - School of Medicine, Viet Nam

²Department of Pathology, Binh Dan Hospital, Ho Chi Minh City, Viet Nam

Abstract

Background: The von Kossa staining technique is an important method in pathology and histology, used to detect the presence of calcium in body tissues. This technique supports the diagnosis of several pathological conditions, including Malakoplakia - a rare inflammatory disease that may be confused with other conditions. Standardizing the von Kossa staining protocol is therefore beneficial for practical application.

Objective: To standardize an effective von Kossa staining protocol.

Materials and methods: This is a descriptive experimental study performed on the confirmed case of Malakoplakia. Tissue samples were sectioned at thicknesses of 3, 4, 5, and 6 µm, with incubation in 5% silver nitrate for 15, 30, 45, and 60 minutes, respectively. Each experiment was repeated three times and staining effectiveness was evaluated based on the demonstration of Michaelis-Gutmann bodies.

Results: The staining method highlighted Michaelis-Gutmann bodies as black “target-like” structures. The results depended on both section thickness and incubation time in 5% silver nitrate. With a short incubation time of 15 minutes, most samples showed light brown to dark brown staining and did not achieve the required contrast. At 30 - 45 minutes, the M-G bodies in 4 µm and 5 µm sections showed the characteristic target-like appearance with uniform black staining. After 60 minutes of incubation, all sections stained intensely black;

however, overstaining occurred in thinner sections, obscuring morphological details.

Conclusion: The standardized protocol recommends a section thickness of 4 μm and incubation in 5% silver nitrate for approximately 45 minutes to achieve the best staining results.

Keywords: von Kossa; malakoplakia; Michaelis-Gutmann bodies.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kỹ thuật nhuộm von Kossa được Julius von Kossa phát triển với mục đích phát hiện các khoáng chất lắng đọng trong mô động vật, kỹ thuật này nhanh chóng được điều chỉnh và cải tiến đã trở thành phương pháp tiêu chuẩn để nhuộm xương và các mô khoáng hoá khác nhau. Phản ứng von Kossa có hai bước, trong đó bước đầu tiên là phản ứng của các cation bạc với các thành phần bên trong các lắng đọng canxi. Bước thứ hai liên quan đến việc khử bạc liên kết thành bạc kim loại có màu đen [1]. Kỹ thuật sử dụng dung dịch bạc nitrate vào các phần mô dưới ánh sáng trong thời gian nhất định để phát hiện thành phần canxi trong mô. Theo một số khuyến cáo, mảnh mô được cắt lát mỏng 4 - 6 μm ủ trong dung dịch bạc nitrate 1 - 5% dưới ánh sáng mặt trời hoặc đèn trong thời gian 10 - 60 phút [1, 2, 3, 4]. Từ đây, ở mỗi điều kiện lát cắt dày/mỏng khác nhau và thời gian tiếp xúc với dung dịch dưới ánh sáng khác nhau có thể dẫn đến hiệu quả nhuộm màu không đồng nhất.

Liên quan đến bệnh Malakoplakia, được mô tả lần đầu bởi Michaelis-Gutmann, biết đến là bệnh do khiếm khuyết trong khả năng diệt khuẩn của đại thực bào. Bệnh ảnh hưởng đến hầu hết cơ quan, trong đó đa phần là hệ tiết niệu [5]. Mô học đặc trưng của bệnh là sự hiện diện của 2 thành phần chính, tế bào von Hanseman và thể Michaelis-Gutmann - thể vùi có kích thước 5 - 15 μm trong bào tương có hình tròn, cấu trúc dạng lớp, đồng tâm dạng “hình bia”, ưa bazo, được cho là sự đại diện của sự tích tụ các thể thực bào, lắng đọng muối canxi và sắt [5,6]. Cấu trúc đặc trưng này có thể được làm nổi bật thông qua các phép nhuộm như von Kossa, Prussian blue, PAS [6]. Thông qua đó, đối với các trường hợp khó phân biệt với các bệnh lý khác như ung thư biểu mô niệu mạc thể giống tương bào, melanoma, lymphoma, một số ung thư biểu mô... [7, 8] có thể dùng các phép nhuộm trên để xác định bệnh.

Hiện nay tại Việt Nam chưa có quy trình chuẩn về phương pháp nhuộm von Kossa cũng như báo cáo hiệu quả trên chẩn đoán bệnh Malakoplakia. Do vậy chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm chuẩn hoá quy trình kỹ thuật nhuộm von Kossa để ứng dụng trong thực hành giải phẫu bệnh.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Ca bệnh được chẩn đoán xác định mắc Malakoplakia.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Thực nghiệm mô tả, 1 block mô đại diện và lặp lại kỹ thuật 3 lần.

2.2.2. Phương pháp thực hiện [1, 2, 3, 4]

Mẫu mô: mô được cố định bằng formalin đậm trung tính 10%, cắt mỏng ở các độ dày 3, 4, 5, 6 μm .

Chuẩn bị thuốc nhuộm:

5% Silver Nitrate (1.01512)

Silver nitrate 25 g

Nước cất 500 ml

5% Sodium Thiosulfate (1.06516)

Sodium thiosulfate 5 g

Nước cất 100 ml

0,1% Nuclear Fast Red (C.I. 60760)

Nuclear fast red 0,5 g

Aluminum sulfate 25 g

Nước cất 500 ml

Dung dịch sau khi pha sẽ được lưu trữ trong lọ đựng hóa chất và bảo quản ở điều kiện phòng thí nghiệm bình thường. Dung dịch ổn định trong khoảng 1 năm. Dung dịch sẽ được lọc bỏ cặn lắng trước khi tiến hành sử dụng.

Các bước tiến hành:

Bước 1: Clear Rite 3 5 phút.

Bước 2: Clear Rite 3 5 phút.

Bước 3: Clear Rite 3 5 phút.

Bước 4: Clear Rite 3 5 phút.

Bước 5: Ethanol 99,5 độ 1 phút.

Bước 6: Ethanol 96 độ 1 phút.

Bước 7: Ethanol 90 độ 1 phút.

Bước 8: Nước 1 phút.

Bước 9: Thấm ráo nước, ủ ở dung dịch bạc Nitrate 5% dưới bóng đèn 60W (đèn cách mặt lame 5 cm) trong thời gian 15, 30, 45 và 60 phút.

Bước 10: Rửa lại bằng nước cất.

Bước 11: Ủ với dung dịch sodium thiosulfate 5% trong 5 phút.

Bước 12: Rửa kỹ bằng nước cất.

Bước 13: Ủ với dung dịch nuclear fast red 0,1% trong 5 phút.

Bước 14: Rửa lại bằng nước máy
 Bước 15: Để khô. Dán lamelle.
 Các mẫu sau khi nhuộm thử nghiệm 3 lần sẽ được đánh giá chất lượng bởi bác sĩ giải phẫu bệnh.

Kết quả:

Muối canxi: đen (đen hoàn toàn, đồng nhất dưới vật kính 20 x hoặc 40 x)

Nhân: đỏ

Bào tương: hồng

2.3. Xử lý số liệu

Các mẫu nhuộm được đánh giá và mô tả bởi bác sĩ giải phẫu bệnh.

2.4. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng Đạo

đức trong nghiên cứu Y sinh học Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, số 4797/HĐĐĐ - ĐHYD ngày 24/11/2025.

3. KẾT QUẢ

Sự khác biệt giữa các mẫu thử quy trình nhuộm

Kỹ thuật nhuộm von Kossa làm nổi bật thể Michaelis-Gutmann (M-G) với dạng hình bia đặc trưng có màu đen do sự lắng đọng khoáng hoá. Qua 3 lần lặp lại quy trình với ca bệnh được chẩn đoán xác định Malakoplakia, kết quả thực nghiệm cho thấy biểu hiện của thể Michaelis-Gutmann có sự tương tác rõ rệt giữa độ dày mô và thời gian tiếp xúc với hóa chất được mô tả ở Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1. Biểu hiện dạng hình bia của thể Michaelis-Gutmann

phút μm	3	4	5	6
15	3/3 lần	0/3 lần	0/3 lần	0/3 lần
30	3/3 lần	3/3 lần	2/3 lần	1/3 lần
45	2/3 lần	3/3 lần	3/3 lần	3/3 lần
60	0/3 lần	2/3 lần	2/3 lần	3/3 lần

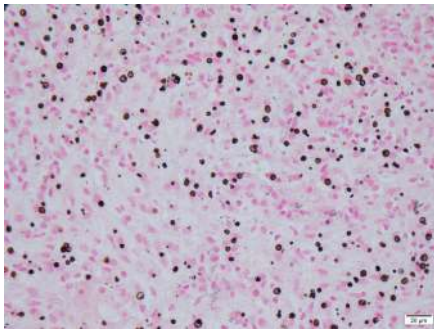
Bảng 2. Biểu hiện màu đen của thể Michaelis-Gutmann

phút μm	3	4	5	6
15	0/3 lần	0/3 lần	0/3 lần	0/3 lần
30	0/3 lần	1/3 lần	2/3 lần	0/3 lần
45	3/3 lần	3/3 lần	1/3 lần	0/3 lần
60	2/3 lần	3/3 lần	3/3 lần	3/3 lần

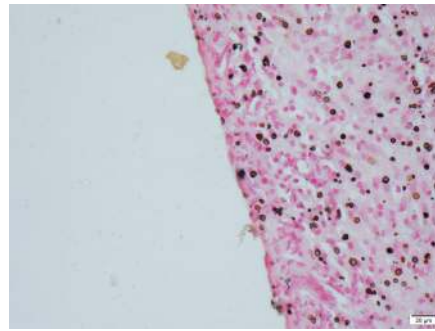
Quan sát ở độ phóng đại lớn (40x), nhìn chung hầu hết các mẫu thử nghiệm đều có thể thấy thể M-G có dạng hình tròn, đồng tâm, cấu trúc dạng lớp giống “hình bia” trên phép nhuộm von Kossa. Đặc điểm “hình bia” quan sát rõ nhất ở các lát cắt từ 3 - 5 μm với thời gian ủ trung bình. Tuy nhiên, cấu trúc này bị mờ nhạt hoặc mất đi trong các trường hợp các mẫu ở lát cắt 4 - 5 - 6 μm với thời gian ủ ngắn 15 phút (Hình 1B, 1C, 1D) và 3 μm với thời gian ủ 60 phút (Hình 4A) không còn thấy rõ hình dạng đồng tâm đặc trưng.

Ở thời gian ủ bạc nitrate 5% là 15 phút, hầu hết

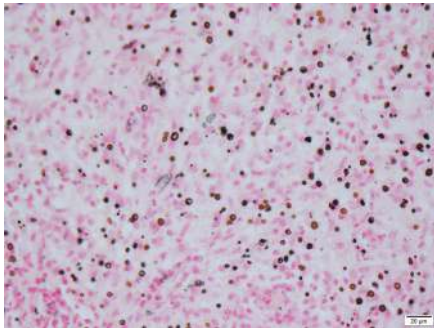
ở các lát cắt đều có hiện diện thể M-G màu nâu đen đến nâu nhạt (Hình 1). Ở thời gian ủ 30 phút, lát cắt mỏng 5 μm (Hình 2C) biểu hiện thể M-G bắt màu đen khá đồng nhất, trong khi các lát cắt khác phần nhiều vẫn hiện diện các thể M-G màu nâu đen đến nâu nhạt. Đối với thời gian ủ 45 phút, kết quả cho thấy các mẫu ở lát cắt 3 - 4 μm (Hình 3A, 3B) bắt màu đen, ở lát cắt dày hơn 5 - 6 μm (Hình 3C, 3D) vẫn còn hiện diện nhiều thể M-G bắt màu nâu đen đến nâu nhạt. Cuối cùng ở thời gian ủ 60 phút, hầu hết các lát cắt đều cho kết quả bắt màu đen khá đồng nhất (Hình 4).



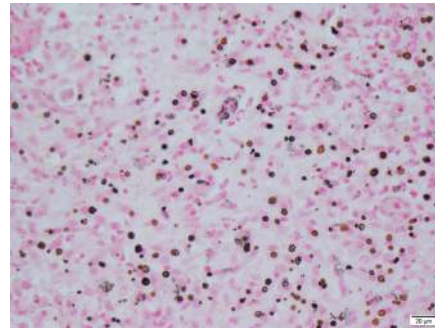
A. 3 μm



4 μm

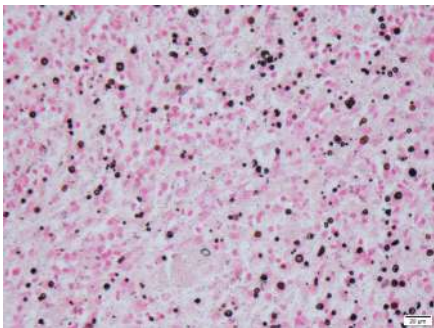


C. 5 μm

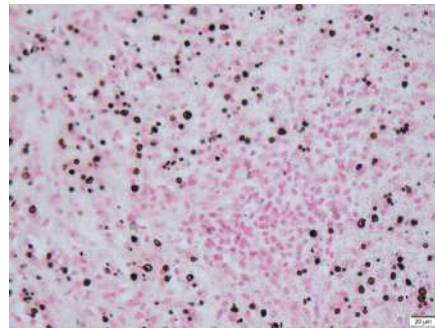


D. 6 μm

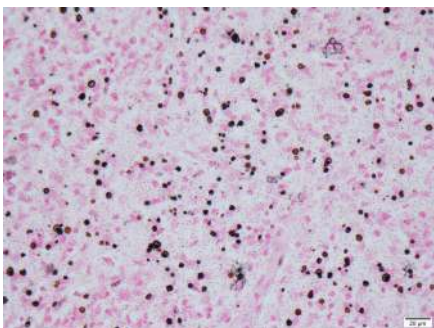
Hình 1. Hình ảnh thể Michaelis-Gutmann trên tiêu bản nhuộm von Kossa với thời gian ủ 15 phút (40x)



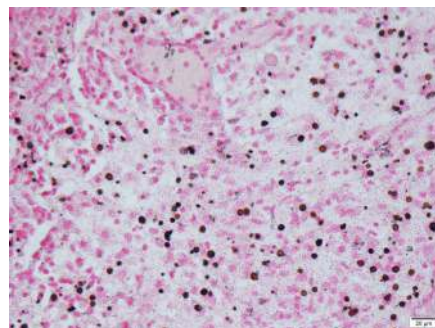
A. 3 μm



B. 4 μm

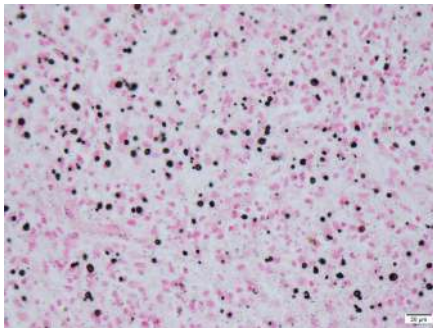


C. 5 μm

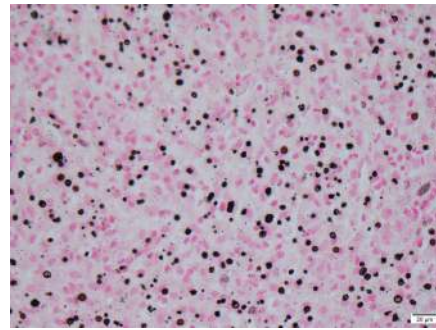


D. 6 μm

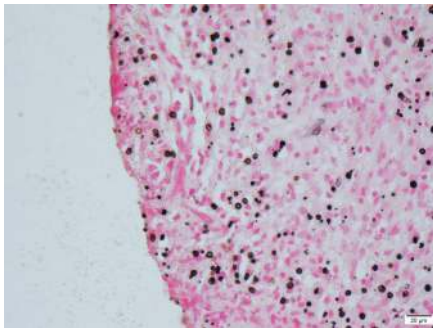
Hình 2. Hình ảnh thể Michaelis-Gutmann trên tiêu bản nhuộm von Kossa với thời gian ủ 30 phút (40x)



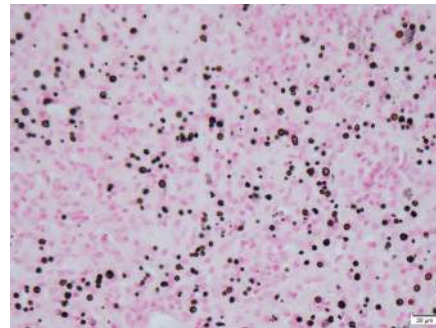
A. 3 μm



B. 4 μm

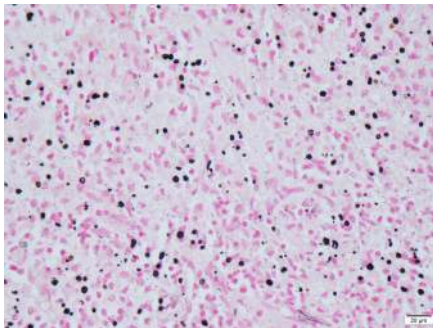


C. 5 μm

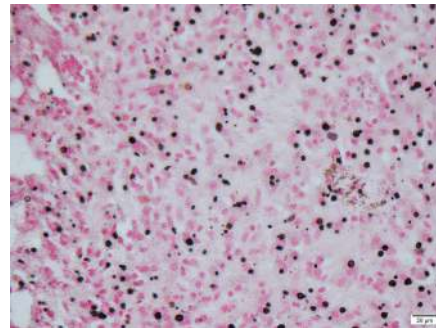


D. 6 μm

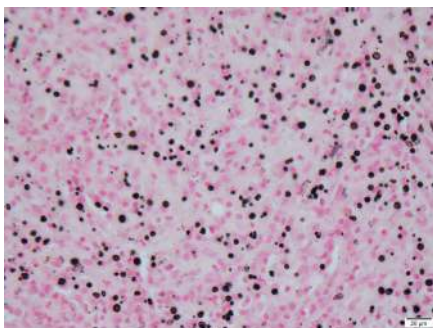
Hình 3. Hình ảnh thể Michaelis-Gutmann trên tiêu bản nhuộm von Kossa với thời gian ủ 45 phút (40x).



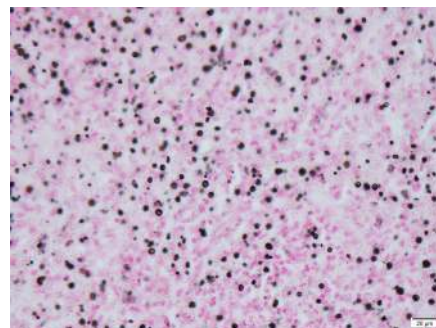
A. 3 μm



B. 4 μm



C. 5 μm



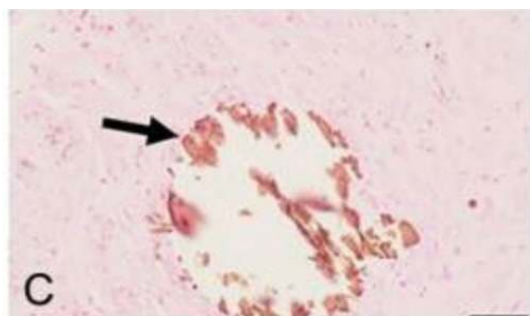
D. 6 μm

Hình 4. Hình ảnh thể Michaelis-Gutmann trên tiêu bản nhuộm von Kossa với thời gian ủ 60 phút (40x)

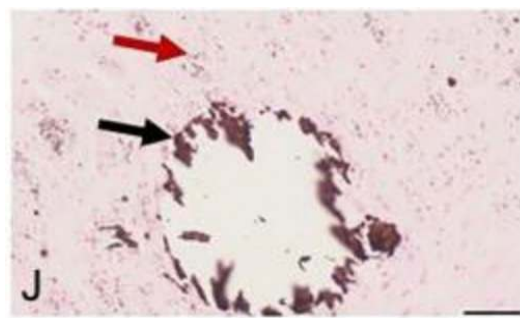
4. BÀN LUẬN

Cường độ ánh sáng (thường được xác định bởi công suất Watt của đèn) tăng lên hoặc nguồn sáng được đặt gần mẫu mô hơn, các lắng đọng canxi sẽ chuyển màu đen nhanh hơn. Ngược lại, nếu ánh sáng yếu thì quá trình chuyển màu diễn ra chậm hơn và màu sắc có thể chỉ dừng lại ở các sắc thái

nâu nhạt hoặc nâu trung bình thay vì đen hoàn toàn nếu không được ủ đủ lâu [2]. Trong nghiên cứu của tác giả Sheila Criswell thì biểu hiện màu sắc của cặn canxi cho kết quả màu sắc canxi thay đổi từ vàng/nâu nhạt (ủ trong tối hoặc ánh sáng yếu) đến đen sẫm (dưới ánh sáng mặt trời hoặc đèn LED 100W) [2].



A. LED/1 giờ



B. Ánh sáng mặt trời qua cửa kính trong/30 phút

Hình 5. Hình ảnh nhuộm von Kossa của tác giả Criswell ở điều kiện ủ bạc nitrate 5%

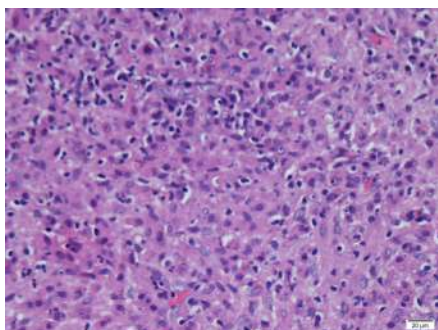
(A) Vùng vôi hóa có màu nâu nhạt đến trung bình sau khi ủ bạc 1 giờ với đèn LED 3,5 W

(B) Vùng vôi hóa có màu nâu đậm đến đen sau khi ủ bạc 30 phút dưới ánh nắng [2]

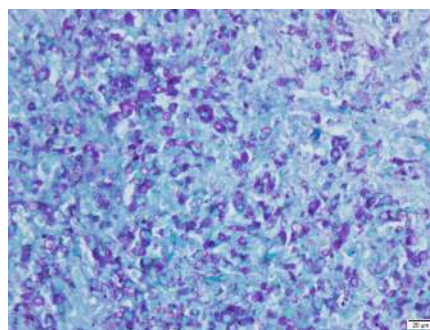
Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng bóng đèn 60W để không phải phụ thuộc vào điều kiện ánh sáng tự nhiên khó kiểm soát, qua đó giúp tối ưu với điều kiện phòng thí nghiệm. Với thời gian ủ bạc 15 phút, hầu hết các mẫu chỉ bắt màu nâu nhạt đến nâu đen, chưa đạt độ tương phản cần thiết. Mốc 30 - 45 phút, lát cắt 4 μ m và 5 μ m bắt đầu cho kết quả ổn định hơn. Đặc biệt ở 45 phút, lát cắt 4 μ m đạt sự đồng nhất tối ưu với 3/3 mẫu đạt màu đen tiêu chuẩn, tương đồng với màu nhuộm trong nghiên cứu của tác giả Criwell [2]. Bên cạnh đó, thể M-G cho hình thái đặc trưng được thấy rõ nét nhất ở lát cắt 3-4-5 μ m với thời gian ủ bạc

trung bình 30 - 45 phút.

Kết quả nghiên cứu cho thấy nếu lát cắt quá dày (6 μ m), các lớp cấu trúc đồng tâm của thể M-G chồng lấp lên nhau, kết hợp với việc bạc nitrate chưa kịp phản ứng hoàn toàn ở thời gian ngắn (15 - 30 phút), dẫn đến hình ảnh màu nâu mờ nhạt, gây khó khăn cho chẩn đoán. Ngược lại, thời gian ủ 60 phút dù giúp màu sắc đạt độ đen tối đa nhưng lại dễ gây ra hiện tượng lắng đọng bạc không đặc hiệu trên nền mô, làm giảm độ sạch của tiêu bản. Đặc biệt ở lát cắt 3 μ m, thời gian 60 phút khiến lượng bạc lắng đọng quá dày đặc, che lấp hoàn toàn cấu trúc hình bia đặc trưng.



A. HE



B. PAS

Hình 6. Hình ảnh thể Michaelis-Gutmann trên tiêu bản nhuộm HE (A) và PAS (B) với độ dày lát cắt 4 μ m (40x)

Do đó, việc kiểm soát độ thâm nhập của ion bạc phụ thuộc độ dày lát cắt và thời gian phản ứng là yếu tố then chốt quyết định chất lượng tiêu bản. Với độ dày 4 μm và thời gian ủ bạc 45 phút không chỉ đảm bảo độ xuyên thấu tối ưu của dung dịch bạc nitrate 5% mà còn giữ được khoảng hở vừa đủ giữa các lớp đồng tâm của thể M-G, giúp bác sĩ giải phẫu bệnh quan sát rõ ràng hình thái “hình bia” kinh điển hơn so với phương pháp nhuộm thường quy Hematoxylin và Eosin (HE) với nhuộm Periodic Acid-Schiff (PAS) (Hình 6). Đây là một bước cải tiến quan trọng giúp nâng cao tính chính xác và khả năng lặp lại của xét nghiệm trong điều kiện thực hành lâm sàng.

Hạn chế và kiến nghị

Đề tài bước đầu khảo sát quy trình chuẩn hoá của phương pháp nhuộm von Kossa, chưa bao quát hết mọi biến số có thể phát sinh trong điều kiện phòng thí nghiệm khác nhau. Đây là cơ sở để hoàn thiện hơn trong thực hành giải phẫu bệnh và là tiền đề mở rộng các nghiên cứu tiếp theo với quy mô mẫu lớn hơn.

Sử dụng quy trình đã được chuẩn hóa làm cơ sở để hoàn thiện các bước kỹ thuật trong chẩn đoán giải phẫu bệnh thường quy, đặc biệt là đối với các ca nghi ngờ Malakoplakia. Ngoài ra, có thể thử nghiệm quy trình đã chuẩn hóa này trên các mẫu mô khác cũng có hiện tượng lắng đọng canxi (như mô xương, u tuyến giáp thể nhú có thể cát, hoặc tổn thương lao vôi hóa) để đánh giá độ rộng và tính ứng dụng đa dạng của quy trình kỹ thuật.

5. KẾT LUẬN

Dựa trên sự đối chiếu giữa khả năng bảo tồn hình dạng đồng tâm và độ sắc nét của màu nhuộm, quy trình sử dụng lát cắt dày 4 μm với thời gian ủ bạc nitrate 5% trong 45 phút cho kết quả tối ưu và ổn định nhất qua các lần lặp lại.

Nguồn tài trợ

Bài nghiên cứu được sự hỗ trợ kinh phí đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí thực hiện đề tài theo Hợp đồng số 177/2026/HĐ-ĐHYD.

Xung đột lợi ích

Không có xung đột lợi ích tiềm ẩn nào liên quan đến bài viết này được báo cáo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Schneider MR. Von Kossa and his staining technique. *Histochem Cell Biol.* 2021;156(6):523-526.
2. Criswell S. Von Kossa calcium staining procedure revisited. *J Histochem Cytochem.* 2025;73(9-10):339-344.
3. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques.* 7th ed. Philadelphia (PA): Elsevier; 2013; p.342-343.
4. Bộ môn Mô phôi - Giải phẫu bệnh. *Sổ tay kỹ thuật giải phẫu bệnh [Tài liệu lưu hành nội bộ].* Thành phố Hồ Chí Minh: Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh; 2020.
5. Kwan E, Riley CA, Iqbal M, Robinson CA. Malakoplakia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 [cited 2026 Mar 30]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564348/>
6. Cieszyński K, Puderecki M, Wronecki L, Burdan F, Szumiło J. Malakoplakia of the urinary system. *Folia Med Cracov.* 2019;59(2):67-74.
7. Amin MB, Tickoo SK, Panel GP, Smith SC, Shen SS, Velazquez EF, et al. *Diagnostic Pathology: Genitourinary.* 3rd ed. Philadelphia (PA): Elsevier; 2022.
8. Joel K. Greenson, Gregory Y. Lauwers, Elizabeth A. Montgomery, Scott R. Owens, Alexandros D. Polydorides. *Diagnostic Pathology: Gastrointestinal.* 3rd ed. Philadelphia (PA): Elsevier; 2019. p. 468-469.