



ОСНОВЫ

ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА В ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ТЕХНИКЕ

Под редакцией
П.Г.Малькова и Г.А.Франка





РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

ОСНОВЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА В ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ТЕХНИКЕ

РУКОВОДСТВО

*Под редакцией
П.Г.Малькова и Г.А.Франка*

Москва, 2011

УДК 616-091.3;616-93;616-71
ББК 28.3
М211

М211 **Основы обеспечения качества в гистологической лабораторной технике: Руководство** / Под ред. П.Г.Малькова, Г.А.Франка / П.Г.Мальков, Г.А.Франк, Л.В.Москвина, Н.В.Данилова, Л.Э.Завалишина. – М., 2011. – 108 с.

Руководство по лабораторной технике в гистологии, иммуноморфологии, in situ гибридизации и цитологии. Издание предназначено для специалистов в области гистологической технологии, микроскопической техники, врачей-патологоанатомов. Рекомендовано к использованию в качестве руководства для подготовки лаборантов, фельдшеров-лаборантов и медицинских лабораторных техников (технологов) патоморфологических лабораторий. Книга будет полезна также для врачей-патологоанатомов и руководителей патоморфологических лабораторий.

Рекомендовано к изданию Советом Российской медицинской академии последипломного образования, протокол №1 от 25 января 2011 г.

ISBN 978-5-91366-251-4
ISBN 978-5-7249-1516-8

© П.Г.Мальков, Г.А.Франк, Л.В.Москвина, Н.В.Данилова, Л.Э.Завалишина, 2011

ПРЕДИСЛОВИЕ

Специалистам хорошо известно, что успех работы в гистологической технике в значительной мере определяется личным опытом специалистов, накопленным эмпирическим путем и во многом продиктованном профессиональной интуицией. У каждого опытного лаборанта имеется множество секретов, которые до сих пор должным образом не систематизированы.

Серьезную проблему в гистологической и цитологической технике представляют артефакты, прежде всего с позиций их влияния на интерпретацию микроскопической картины и формулировку патоморфологических заключений. Артефакты снижают качество микропрепаратов, и нередко могут быть источниками диагностических ошибок. Потому предотвращение дефектов гистологической и цитологической обработки материала является серьезной технологической задачей, с которой постоянно приходится сталкиваться в любой патоморфологической лаборатории. Артефакты следует уметь распознавать и владеть приемами их оценки предупреждения и устранения.

Систематический контроль качества препаратов – важнейшая задача любой патоморфологической лаборатории. От исполнения этой задачи не следует уклоняться ни руководителю лаборатории, ни ординарным врачам, ни лаборантам. Всякий раз, когда случается сталкиваться с дефектами препаратов, особенно если такое явление становится массовым, восприниматься это должно как чрезвычайное производственное происшествие. Следует скрупулезно разбираться в технологии процесса, пошагово выясняя возможные причины дефектов.

Если этого не делать, лаборанты, чувствуя бесконтрольность, вообще перестают заботиться о качестве, допускают систематические погрешности в технологии, пренебрегают некоторыми важными правилами с целью сократить время и трудозатраты.

Нередко мы, в ответ на вопрос о возможных причинах выявленных дефектов, слышим от лаборантов «не знаю, почему так получилось, все делаю как всегда» – причем это говорят дипломированные специалисты со специальным образованием, сертификатом, а зачастую и с высокими квалификационными категориями. По существу такой подход отражает непонимание сути используемой лабораторной технологии, механическое и бездумное исполнение своей работы. Каждый лаборант должен глубоко понимать суть химических и физических процессов, используемых в гистологической технике, осознанно и грамотно, а не механически или интуитивно, принимать решения о необходимости изменений протокола – только при таких условиях труд его будет действительно квалифицированным и качественным.

Высок уровень ответственности руководителей патоморфологических лабораторий и врачей-патологоанатомов за качество диагностической работы, потому не следует принимать для диагностики препараты плохого качества, фактически покрывая дефекты работы лаборантов.

В этом смысле очень важно, чтобы каждый врач-патологоанатом, каждый руководитель патоморфологической лаборатории в достаточной степени сами лично владели и теорией, и практикой гистологических лабораторных технологий. Иногда лаборанту требуется объяснить, иногда надо научить, иногда – строго спросить.

Важно так организовать работу в лаборатории, чтобы молчаливая подача врачу некачественных препаратов, считалась невозможной, и повседневно требовать от лаборантов проявления определенной настойчивости в плане получения препаратов высокого качества.

Эта книга обобщает опыт авторов в области гисто- и цитотехнологии и содержит ценные советы, ранее не публиковавшиеся ни в одном из известных классических руководств по гистологической (микроскопической) технике.

Книга будет полезна как для опытных специалистов, так и в качестве пособия для подготовки молодых лаборантов.

Франк Георгий Авраамович

*член-корреспондент РАМН, Заслуженный деятель науки РФ
доктор медицинских наук, профессор*

Мальков Павел Георгиевич

кандидат медицинских наук, доцент

СОДЕРЖАНИЕ

СБОР И ТРАНСПОРТИРОВКА ОБРАЗЦОВ	7
ВЫРЕЗКА	12
ПРЕФИКСАЦИОННЫЕ АРТЕФАКТЫ	16
ФИКСАЦИЯ	22
АРТЕФАКТЫ ФИКСАЦИИ	25
ПРОВОДКА	27
АРТЕФАКТЫ ПРОВОДКИ	33
ЗАЛИВКА	35
АРТЕФАКТЫ ЗАЛИВКИ	38
МИКРОТОМИЯ	40
АРТЕФАКТЫ МИКРОТОМИИ	44
РАСПРАВЛЕНИЕ СРЕЗОВ	47
ВЫСУШИВАНИЕ СРЕЗОВ	51
ОБЗОРНАЯ ОКРАСКА	52
АРТЕФАКТЫ ОКРАСКИ	57
СПЕЦИАЛЬНЫЕ ОКРАСКИ	59
ИММУНОГИСТОХИМИЯ	61
ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU	65
АРТЕФАКТЫ СПЕЦИАЛЬНЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ	68

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ПОД ПОКРОВНОЕ СТЕКЛО	70
АРТЕФАКТЫ ХРАНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ	73
АРТЕФАКТЫ КОСТНОЙ И ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ.....	75
АРТЕФАКТЫ КРИОСТАТНЫХ СРЕЗОВ	77
АРТЕФАКТЫ ПОЛУТОНКИХ СРЕЗОВ	79
АРТЕФАКТЫ ПРОЧИЕ	82
АРТЕФАКТЫ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.....	84
ЭЛЕМЕНТЫ УНИФИКАЦИИ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ	86
ПРИЁМ И РЕГИСТРАЦИЯ МАТЕРИАЛА	96
УКАЗАТЕЛЬ.....	101
ЛИТЕРАТУРА	106

СБОР И ТРАНСПОРТИРОВКА ОБРАЗЦОВ

Механическое повреждение образца

Ткань необходимо извлекать осторожно без раздавливания или разрыва образца. Это требование необходимо соблюдать и при хирургической операции и во время гистологической вырезки. При любых манипуляциях с образцом кусочек рекомендуется придерживать пинцетом только за самый край и только в одном и том же месте, иссечение и рассечение следует производить исключительно острыми лезвиями.

При несоблюдении этих требований возможны тяжелые механические повреждения ткани, нередко исключаящие возможность качественного морфологического исследования.

Высыхание образца

Не следует допускать высыхания ткани перед фиксацией, не следует оставлять образец на абсорбирующей поверхности на некоторое время перед фиксацией. Если немедленная фиксация невозможна – образец необходимо обернуть марлей увлажненной изотоническим раствором для предотвращения его высыхания – но это только исключение, которое ни при каких обстоятельствах не должно стать правилом.

В операционных и манипуляционных кабинетах всегда должно иметься подготовленные для взятия биопсийного материала флаконы с фиксирующей жидкостью и этикеткой для записи.

Нагревание образца

Воздействие локальной температуры на образец следует предотвращать настолько, насколько это возможно, кроме некоторых неизбежных повреждений, вызванных, например, электрокоагуляцией во время биопсии, но и в этих случаях рекомендуется выбирать такие уровни мощности электроножа, которые позволят свести к возможному минимуму термические повреждения ткани.

Любое воздействие высокой температуры на образец может вызвать его повреждение. Свежие (нефиксированные) образцы особенно чувствительны к действию высоких температур.

Охлаждение образца

Воздействие низких температур на образец необходимо предотвращать настолько это возможно. Не следует оставлять нефиксированный образец в холодильнике, а тем более его замораживать. Свежие (нефиксированные) образцы особенно чувствительны к действию низких температур – при медленном замораживании тканевая жидкость кристаллизуется, разрывает клетки и прочие тканевые структуры, что существенно снижает качество последующей гистологической обработки тканей.

Фиксацию образцов должно осуществлять при комнатной температуре. Пониженные температуры существенно замедляют проникновение фиксирующего агента в ткани и, таким образом замедляют процесс фиксации – особенно это критично при крупных размерах образцов. Допускается хранение в холодильниках лишь флаконов с хорошо фиксированными образцами, и то – при температурах не ниже 4°C.

Химическое повреждение образца

Необходимо предотвращать попадание посторонних химических агентов на образцы тканей. Не следует использовать для фиксации материала посуду, содержащую остатки посторонних веществ – например, инъекционные флаконы и прочую случайную посуду. Не следует также производить расфасовку фиксирующей жидкости во время операции (манипуляции) – в условиях спешки во флаконы с биопсийным материалом не редко случайно наливаются иные жидкости – такие как спирт, перекись водорода, уксусная кислота, дезинфицирующие средства.

В операционных и манипуляционных кабинетах желательно иметь заранее заготовленные флаконы разных объемов с расфасованной фиксирующей жидкостью. Флаконы с фиксирующей жидкостью должны быть соответствующим образом маркированы.

Маркировка образцов

Каждый флакон с образцами должен быть правильно и полно маркирован сразу после взятия биопсийного материала. Заготовленные флаконы (контейнеры) должны быть снабжены этикеткой для записи. Данные, размещаемые на этикетке флакона должны четко соответствовать данным направления на исследование, чтобы исключить ошибки в идентификации флаконов в лаборатории.

Откладывание маркировки образца может привести к утрате информации и неполной маркировке и перепутыванию флаконов.

Качество фиксации образца

Образец необходимо помещать в фиксирующий раствор немедленно после взятия. Важно, чтобы кусочки оставались незафиксированными возможно более короткое время. Флаконы с материалом следует содержать при температуре не менее 4°C.

При отложенной фиксации дегенерация компонентов ткани начинается сразу после того, как ткань лишается кровоснабжения.

Объем фиксирующего раствора и размер контейнера

Соотношение объема фиксирующего агента и тканевого образца должно быть не менее, чем 20:1. Для этого необходимо правильно подбирать размер контейнера.

При использовании контейнеров неадекватно малого размера возможно механическое повреждение, деформация и недостаточная фиксация образца (снижение объема фиксирующей жидкости меньше, чем 20:1).

pH фиксирующего раствора

Оптимальным для фиксации является раствор формалина, забуференный при pH 6,8-7,0. Не рекомендуется использовать фиксирующие растворы с установленным pH. Кислый формалин приводит к образованию в ткани «формалинового пигмента», вследствие взаимодействия с гемоглобином. В качественных гистологических препаратах формалинового пигмента быть не должно.

Для лабораторного приготовления забуференного формалина рекомендуется использовать пропись R.D.Lillie¹⁹. Но наиболее предпочтительно использование стандартизованных готовых растворов формалина для гистологии, выпускаемых многими производителями (Merck, Sigma, Panreac, BioOptica и другие).

Ускорение фиксации крупного образца ткани

Большие образцы тканей следует как можно быстрее доставлять в лабораторию для вырезки более мелких кусочков и обеспечения правильной фиксации. В крупных образцах, оставленных в фиксирующем растворе на длительное время до вырезки центральная часть остается незафиксированной и может подвергаться значительным разрушениям.

Ускорить фиксацию крупных образцов тканей можно дополнительными разрезами. Это обусловлено тем, что средняя скорость проникновения формалина в

ткани равна 1 мм в час, и она замедляется по мере удаления от поверхности образца. Считается, что без ущерба для качества фиксации можно вырезать кусочки толщиной не более 5 мм.

Фиксация образцов, полученных при пункционной биопсии

При фиксации ткань уплотняется и деформируется. Особенно важно избегать деформации нежных столбиков ткани, полученных при пункционных биопсиях, а также любых малых и тонких объектов.

Для предотвращения фиксационной деформации столбики ткани рекомендуются до погружения в фиксирующую жидкость разместить на полоске плотной тонкой бумаги, плохо впитывающей жидкость, такой как, например, калька или специальная подложка. Излишки кальки можно обрезать на расстоянии 1.0-1.5 мм от края кусочка ткани, и в таком виде образец вместе с калькой погружается в фиксирующую жидкость. Подложка из кальки не позволяет кусочку деформироваться в процессе фиксации.

Нефиксированный кусочек хорошо прилипает к бумажной подложке. Кусочек, даже на короткое время помещенный в фиксирующую жидкость, к бумажной подложке не прилипнет. Потому процедуру эту следует выполнять непосредственно после получения образца ткани, и очень быстро, чтобы кусочки оставались незафиксированным возможно более короткое время.

Особенно важно при этом не допускать механических повреждений образца – кусочек рекомендуется придерживать пинцетом только за самый край и только в одном и том же месте.

Определенную трудность может представлять извлечение столбика ткани из канала пункционной иглы. Для наиболее бережного извлечения столбика ткани пункционную иглу следует полностью раскрыть, поместить мандрен с желобом, в котором находится образец, в каплю теплого физиологического раствора, расположенную на горизонтальной чистой поверхности, и осторожными движениями с помощью тонких препаровальных инструментов снять образец с иглы в каплю физиологического раствора. После этого столбик ткани легко может быть перемещен на бумажную подложку.

Этот прием удобно также использовать и при необходимости точной пространственной ориентировки кусочка при некоторых специальных видах исследования.

Транспортировка материала

Доставку материала в лабораторию следует осуществлять в максимально короткие сроки.

Для доставки биологического материала в лабораторию в пределах одного больничного здания (комплекса зданий) удобно использование пневматической почты. Для доставки материала в крупные централизованные лаборатории, обслуживающие определенные территории, следует организовывать специализированные медицинские курьерские службы, тщательно продумывать маршруты движения санитарного транспорта с тем, чтобы добиться максимально скорой доставки материала в лабораторию.

Задержка доставки образцов в лабораторию свидетельствует о плохой организованной системе транспортировки биоматериала.

Бережное обращение с тканевыми образцами

Все манипуляции с образцами – от взятия материала до транспортировки в лабораторию, необходимо осуществлять исключительно бережно, чтобы не допустить их механического, термического и химического повреждения.

О необходимости бережного обращения с образцами следует не только особо предупреждать, но и специально обучать персонал операционных и манипуляционных кабинетов, медицинских сестер, санитаров, курьеров. Персонал, имеющий отношение к взятию, фиксации и транспортировке материала должен отчетливо понимать, что любые неблагоприятные воздействия на тканевые образцы на долабораторном этапе способны существенно ухудшить качество последующей гистологической обработки тканей, что в некоторых случаях, определяет невозможность адекватной морфологической верификации диагноза.

Проверка качества предварительной фиксации

В процедуру проверки качества фиксации входит определение качества фиксирующей жидкости и оценка соблюдения общих правил фиксации в части размеров образцов, размеров контейнера и количества фиксирующей жидкости.

В первую очередь следует определить – какая жидкость залита в контейнер. Нередки случаи, когда вместо формалина в биопсийный контейнер заливаются другие бесцветные жидкости, не пригодные для целей фиксации тканей.

Во-вторых, следует помнить, что при фиксации образцов, содержащих большое количество жидкой крови или жировой ткани, фиксирующая жидкость быстро загрязняется посторонними примесями. В таких случаях фиксирующую жидкость следует сменить в течение нескольких часов после начала фиксации. Если доставка биопсийного материала в лабораторию откладывается на более длительный срок – эту процедуру следует осуществить на месте взятия материала.

Недостаточное внимание фиксации заведомо проблемных (крупных) образцов часто приводит к дефектам гистологической обработки тканей. Недостаточно фиксированные образцы не следует запускать в дальнейшую проводку.

Дефекты фиксации образцов обнаруживаются при вырезке. Как правило, в глубине больших кусочков, и отличаются от поверхностных слоев ткани красноватым оттенком окраски. Плохо, если такие участки захватывают область интереса – именно в них могут проявиться дефекты дальнейшей гистологической обработки, а при микроскопическом исследовании нередко обнаруживаются аутолитические изменения тканей.

Все отмеченные дефекты фиксации следует подробно описать в протоколе вырезки материала.

Размер вырезаемых образцов

Из крупного образца вырезаются более мелкие кусочки, толщиной не более 3-4 мм. Это особенно важно для плотных тканей. Приготовление образцов толщиной более 6 мм может быть причиной некачественной проводки ткани.

При вырезке следует помнить и то, что площадь кусочка в последующем может оказать влияние на толщину парафиновых срезов – зависимость здесь обратная пропорциональная – чем больше площадь среза, тем сложнее получить тонкий

срез. Идеальны для парафиновых блоков кусочки с площадкой среза, сторона которой не превышает 5-8 мм.

Для парафиновой заливки с использованием стандартных заливочных форм следует вырезать кусочки трех типоразмеров – до 5х5 мм, 5-10 мм и 10-20 мм.

При значительных размерах зоны интереса следует помнить, что предельный размер кусочков при заливке в стандартные биопсийные формы не может превышать 20 мм. В таких случаях можно для заливки вырезать несколько последовательно ориентированных кусочков, что позволит в дальнейшем реконструировать микроскопическую картину по микропрепаратам.

Форма вырезаемых образцов

Вырезку следует производить так, чтобы в итоге поверхность образца в области интереса, предназначенная для среза, была плоской и на ней должны быть представлены все слои ткани.

Неровные образцы требуют значительной обрезки при микротомии, что может привести к потере части ткани образца и повышенному износу микротомных лезвий.

Предотвращение повреждения образцов

Следует избегать повреждений тканей, в особенности не полностью профикированных – не давить, использовать только острые лезвия, разрезы производить плавными движениями в один рез. Грубое обращение с образцами, использование тупых лезвий или ножниц приводят к деформациям и повреждениям тканей.

Предотвращение загрязнения образцов

Каждый образец следует класть на чистую поверхность, чтобы исключить попадание на него мелких фрагментов тканей от другого образца. Поверхность, на которой производится вырезка, перед вырезкой каждого нового образца должна быть тщательно очищена влажной салфеткой.

При вырезке на неочищенной поверхности возможен перенос частичек злокачественной опухоли на образец с доброкачественными процессами. Особенно это важно в тех случаях, когда один за другим обрабатываются образцы одного типа.

То же касается и инструментов, используемых при вырезке. Всякий раз при переходе к вырезке нового образца инструменты следует тщательно очистить от остатков ткани предыдущего образца.

Использование гистологических прокладок

Свежие или не полностью зафиксированные ткани, а также малые биоптаты не следует плотно зажимать между губчатыми гистологическими прокладками. Маленькие, свежие или не полностью зафиксированные образцы, помещенные на губчатые гистологические прокладки, могут быть повреждены в результате сдавливания.

Выбор кассет

Для проводки ткани следует выбирать соответствующий тип кассет, чтобы избежать дополнительной деформации, сдавливания или утраты образцов. Во время проводки фрагменты ткани сжимаются и могут продавливаться через слишком большие отверстия кассеты в растворы для проводки или в другую кассету. Не следует исходить из принципа «один размер кассет подходит для любых образцов».

Размещение образцов в кассетах

Образцы в кассетах всегда следует размещать плоской поверхностью, предназначенной для среза, вниз. В последующем и при заливке образцы переносятся из кассет в заливочные формы этой же поверхностью вниз. Таким образом, поверхность, выбранная для среза врачом во время вырезки, всегда попадет на вершину парафинового блока.

Предотвращение переполнения кассеты

Кассеты не следует переполнять образцами – таким образом, обеспечивается наилучший доступ реагентов и предотвращается искажение формы образца. Если образец слишком велик – необходимо использовать вторую кассету. Если в кассеты кладется слишком большое количество образцов – это затрудняет доступ реагентов и приводит к деформации кусочков.

Маркировка кассет

Необходима четкая и разборчивая маркировка кассет, что важно для правильной идентификации образцов. Трудночитаемые номера недопустимы во избежание неоднозначного толкования маркировки.

Если в лаборатории нет специального гистологического принтера для кассет, то для ручной маркировки следует использовать простой грифельный карандаш средней твердости, обеспечивающий легкое нанесение маркировки. Если при маркировке кассеты допущена ошибка – не следует стирать надпись ластиком, лучше всего ошибочную надпись сцарапать лезвием скальпеля.

Маркировка кассеты должна быть максимально лаконична. Лучше всего ограничиться нанесением на кассету только индивидуального уникального номера кусочка. Любая избыточная маркировка затрудняет идентификацию надписи на последующих этапах гистологической обработки материала.

ПРЕФИКСАЦИОННЫЕ АРТЕФАКТЫ

В данную группу объединены артефакты, причины возникновения которых не связаны с лабораторной обработкой материала. Это могут быть, например, последствия хирургического вмешательства (ожог ткани от лазера или электрокоагуляции) или травмы, и различные предсуществовавшие экзогенные пигментации (татуировки).

Материал может быть загрязнен при хирургическом вмешательстве или при заборе материала.

Этих артефактов можно избежать и адекватно их оценивать только в том случае, если точно следовать методике взятия материала и учитывать клиническую историю пациента.

Термические повреждения материала

Термические повреждения материала, часто обнаруживаемые в биопсиях, проявляются в виде коагуляционного некроза тканей.

Термическое повреждение образца может быть следствием термического воздействия на любом этапе обработки, но наиболее часто – при термических воздействиях на нативную нефиксированную ткань, то есть при взятии материала вследствие ожога лазером, электрокоагулятором или при использовании других горячих инструментов.

Частой причиной сгорания тканевого образца бывает использование завышенных более необходимого мощностей электрохирургических инструментов, применяемое при иссечении тканей в целях снижения кровоточивости в краях хирургической раны.

Ширину зоны термического повреждения хирургического края образца должно отмечать в протоколе микроскопического исследования.

Попадание шовного материала

Шовные материалы могут быть представлены в препарате как отдельными фрагментами, так и цельными волокнами, срезанными поперечно, продольно или косо. Шелковые хирургические нити дают выраженное двойное лучепреломление в по-

ляризованном свете, что можно использовать как идентификационный признак данного вида материала.

Шовный материал в кусочке может повредить нож микротома, что приведет к образованию полос на срезе при микротомии, потому видимые инородные структуры необходимо удалять из кусочка по возможности во время вырезки и соответствующим образом описывать в протоколе макроскопического исследования.

Включения целлюлозы

При окраске гематоксилином и эозином целлюлоза определяется в виде плоских призматических растительных клеток с яркоокрашенной клеточной стенкой. Присутствие целлюлозы в препарате может привести к крошению материала при микротомии.

Целлюлоза часто встречается в биоптатах желудочно-кишечного тракта, если его не промыли перед диагностической процедурой.

Целлюлоза может попасть в тканевой образец и извне: обрывок бумаги, хлопковая нитка, кусочек деревянного заливочного блока, и др. В этих случаях посторонние объекты чаще располагаются на поверхности кусочка, хотя могут быть механически внесены и в толщу кусочка при вырезке.

Желатиновые включения

Содержащие желатин кровоостанавливающие средства, такие как Gelfilm или Gelfoam, часто применяемые при хирургических вмешательствах, обладают высокой адгезивной способностью к тканям. При окраске Н&Е желатиновая пена визуализируется в виде слабо базофильных сетчатых масс, окружающих тканевой образец снаружи, эти массы нередко включают в себя эритроциты, лейкоциты и иные тканевые элементы. Обычно данный материал не вызывает тканевых артефактов, но может быть адекватно оценен лишь при детальном изучении протокола операции (манипуляции).

Загрязнение крахмалом

Крахмал и тальк, используемые для обработки хирургических перчаток, могут остаться в ткани после операции или попасть на поверхность изъятых образцов.

В ряде случаев крахмальные зерна могут быть представлены в составе гранулам инородных тел, удаленных хирургически. Кроме того загрязнение образцов крахмалом может произойти в лаборатории, если новые перчатки не были промыты перед использованием.

Повреждения ткани катетером

Мягкие ткани могут быть легко повреждены при манипуляциях с использованием катетеров, или зондов как *in vivo*, так и на фиксированных тканевых образцах.

Размозжение ткани

Нефиксированные ткани (особенно лимфатические узлы) очень подвержены раздавливанию зажимами, пинцетами, другими инструментами или руками медицинского персонала. Такие артефакты чаще всего располагаются по краю образца, обычно имеют небольшой размер и четкие границы.

Следует помнить о необходимости минимизации любых механических воздействий на ткани как *in vivo*, так и на извлеченные тканевые образцы.

Некроз, обусловленный применением раствора Monsel

Раствор Monsel – наиболее часто применяемый гемостатический раствор при получении биопсии кожи или слизистых оболочек, наносится на рану и при контакте с тканями вызывает коагуляцию сосудов и некроз глубиной до 0,6 мм. В состав раствора входит сернокислая соль железа, которая диффузно распределяется в ткани и захватывается макрофагами³.

Не следует обрабатывать ткани раствором Monsel до взятия биопсии. В таких случаях при гистологическом исследовании в препаратах обнаруживается выраженная базофилия, фокусы десквамации, растрескивания и признаки некроза эпителия. Зона такого повреждения будет Perls-позитивна.

Улучшить качество препаратов поможет обработка материала 0,5% раствором соляной кислоты в 70% этиловом спирте в течение часа при 60°C⁴.

Экзогенные пигментации

В биоптатах кожи могут быть обнаружены нерастворимые экзогенные пигменты, используемые для нанесения татуировок.

Эти депозиты обычно инертны по отношению к гистохимическим тестам и не дают анизотропии в поляризованном свете. Однако же весьма желательно описывать наличие татуировок в протоколе операции и при макроскопическом исследовании нефиксированного операционного материала – это поможет избежать немалых затрат времени и ресурсов на выяснение природы пигментации в случаях когда это имеет решающее диагностическое значение.

Посмертные изменения

Дегенеративные изменения в тканях начинают развиваться сразу после прерывания кровотока. Аутолиз обусловлен воздействием гидролитических ферментов лизосом при нарушении внутренних мембран клеток.

Признаки аутолиза подробно описаны – это кариопикноз, кариорексис, кариолизис, вакуолизация цитоплазмы, дезинтеграция других тканевых структур. Эти признаки могут быть в разной степени представлены в различных тканях, обычно бывают более выражены в эпителиальных тканях, чем в мезенхимных, что связано с большей устойчивостью последних к гипоксическим повреждениям. Одним из ранних признаков аутолитических изменений может быть слущивание эпителия.

В некоторых органах, таких как поджелудочная железа, процессы посмертного аутолиза более выражены из-за обилия протеолитических ферментов.

В биопсийном материале, который обычно фиксируется немедленно, признаки аутолиза бывают менее выражены, чем в аутопсийном.

Избежать образования артефактов, связанных с аутолизом, позволяет быстрая фиксация материала. Затормозить процессы саморазрушения тканей трупа до вскрытия позволит охлаждение тела до 4°C. При любых обстоятельствах явления аутолиза трупного материала будут тем менее выражены, чем скорее будет произведено вскрытие, изъятие и фиксация тканевых образцов.

Раннее вскрытие позволяет идентифицировать прижизненные повреждения органов и тканей. При поздних вскрытиях отличить прижизненные повреждения и посмертный аутолиз органов и тканей весьма затруднительно.

Окрашивание при маркировке макропрепарата

В ряде случаев используют цветное маркирование хирургического края удаленного образца для его правильной ориентации в макропрепарате или для заливки в блоке.

Для маркировки обычно используются India ink, Silver nitrat, Alcian blue, Alcian green и многие патентованные составы различных цветов, которые окрашивают поверхность образца и могут проникать в ткань на различную глубину.

Сдавление биопсийными прокладками

Часто при размещении мелких образцов в кассетах для проводки используются гистологические прокладки. Если образец недостаточно фиксирован и при закрывании кассеты плотно зажимается биопсийными прокладками, он деформируется с образованием треугольных и ромбовидных дефектов, повторяющих губчатую структуру материала прокладок.

Для того, чтобы избежать этого артефакта, следует запускать в проводку только полностью зафиксированные образцы такой толщины, чтобы при закрывании кассеты кусочек не сдавливался (не более 3–4 мм).

Повреждения низкими температурами

Достаточно распространена ситуация, когда образцы тканей для срочного исследования после приготовления замороженных срезов оттаивают в фиксаторе для последующей заливки в парафин. В таких случаях в образцах тканей могут обнаруживаться повреждения кристаллами льда или изменения, характерные для оттаивания.

Например, в образце ткани, залитом в парафин после замораживания/оттаивания ядра часто бывают окружены светлой каймой цитоплазмы, хроматин менее конденсирован и интенсивно окрашен. Ядерные и цитоплазматические структуры хуже идентифицируются. Эти изменения необязательны, но вполне характерны.

Особенно выражены низкотемпературные повреждения тканей при медленном замораживании – при этом тканевая жидкость кристаллизуется, а вокруг кристаллов льда формируются микроскопические трещины и разрывы.

Для минимизации этих дефектов рекомендуется быстрое замораживание тканевых образцов при температуре не ниже -20°C , что позволяет тканевой жидкости застывать в аморфном состоянии, и использование специальных смесей для криомикротомов, способствующих равномерному охлаждению/замораживанию и медленному размораживанию кусочков в формалине. Но и при этом допускается только однократное замораживание/оттаивание образца, в противном случае качество гистологических препаратов будет прогрессивно снижаться прямо пропорционально числу циклов замораживания/оттаивания.

Загрязнение образца другим образцом

Попадание инородной ткани в исследуемый образец в большинстве случаев происходит при вырезке, например, когда нож или поверхность рабочего стола недостаточно очищаются после обработки предыдущего материала. Обработка скальпеля и рабочей поверхности водой или спиртовыми салфетками позволит избежать этой неприятности.

Важно помнить, что расходные материалы (например, биопсийные кассеты, гистологические прокладки, растворы для проводки), при их многократном использовании тоже могут служить источником загрязнения препарата.

При проводке материала, частички ткани могут задерживаться на кассетах или в многократно применяемых растворах. Для снижения риска загрязнения мате-

риала необходимо следить, чтобы биопсийные кассеты и полиуретановые прокладки использовались однократно. Следует также стремиться всегда использовать свежеприготовленные растворы.

Загрязнение образца инородной тканью может произойти и на других стадиях обработки материала:

- при расправлении срезов в водяной бане после микротомии (флотация), если с поверхности воды не были удалены фрагменты срезов с предыдущего блока или если на поверхности воды одновременно расправляются срезы с нескольких блоков;
- в результате применения грязных пинцетов, заливочных форм, парафина;
- при окраске материала, если фрагменты срезов слетевших со стекла, попадают в красящий раствор, а потом оседают на другом препарате.

В тех случаях, если возникают сомнения по поводу истинности наблюдаемых в образце изменений, необходимо провести повторное исследование, чтобы исключить возможность контаминации. Пренебрежение этим, в ряде случаев, может стать причиной диагностических ошибок.

ФИКСАЦИЯ

Качество фиксации образца

Образец необходимо помещать в фиксирующий раствор немедленно после взятия. Важно, чтобы кусочки оставались незафиксированным возможно более короткое время. Флаконы с материалом следует содержать при температуре не менее 4°C.

При отложенной фиксации аутолитические изменения ткани начинается сразу после того, как ткань лишается кровоснабжения.

Объем фиксирующего раствора и размер контейнера

Соотношение объема фиксирующего агента и тканевого образца должно быть не менее, чем 20:1. Для этого необходимо правильно подбирать размер контейнера.

При использовании контейнеров неадекватно малого размера образцы подвергаются механическому повреждению, деформации и не полностью фиксируются.

pH фиксирующего раствора

Для фиксации тканей в текущей гистологической практике для решения большинства диагностических задач оптимальным является раствор формалина, забуференный при pH 6,8-7,0. Не рекомендуется использовать фиксирующие растворы с неустановленным pH. Кислый формалин приводит к образованию в ткани так называемого «формалинового пигмента» бурого цвета. При решении некоторых диагностических задач требуется приложить дополнительных усилий для идентификации химической природы этого пигмента, что может привести к существенному удорожанию исследования.

В качественных гистологических препаратах формалинового пигмента быть не должно.

Для лабораторного приготовления забуференного формалина рекомендуется использовать пропись R.D.Lillie¹⁹. Но наиболее предпочтительно использование стандартизованных готовых растворов формалина для гистологии, выпускаемых многими производителями (Merck, Sigma, Panreac, BioOptica и другие). Использование готовых фиксирующих смесей позволяет стандартизовать процедуру и

варьировать лишь время экспозиции в зависимости от особенностей исследуемых образцов. Кроме того, использование стандартизованных фиксирующих смесей позволяет избежать многих артефактов фиксации.

В ряде случаев для выполнения специальных диагностических или исследовательских задач требуется использование иных фиксирующих агентов, которых известно множество¹⁹. При этом следует строго соблюдать протокол, предусмотренный оригинальной методикой.

К специальным методам фиксации не следует прибегать без особой нужды, когда эта необходимость диктуется особыми диагностическими или исследовательскими задачами. Во всех случаях традиционной гистологии рекомендуется использование стандартной фиксации материала забуференным формалином.

Использование любых методов ускоренной фиксации, или методов фиксации, позволяющих исключить из дальнейшей гистологической обработки этапы щадящей дегидратации (безводные фиксаторы), чреваты появлением грубых тканевых артефактов.

Ускорение фиксации крупного образца ткани

Большие образцы тканей следует как можно быстрее доставлять в лабораторию. В крупных образцах, оставленных в фиксирующем растворе на длительное время до вырезки центральная часть остается незафиксированной и может подвергаться значительным разрушениям.

Ускорить фиксацию крупных образцов тканей можно дополнительными разрезами чтобы получить пластины толщиной не более 5 мм. Это обусловлено тем, что средняя скорость проникновения формалина в ткани равна 1 мм в час, и она замедляется по мере удаления от поверхности образца. Без ущерба для качества фиксации рекомендуется вырезать кусочки толщиной не более 5 мм.

Окончательная фиксация

Окончательная фиксация тканевых образцов должна быть полной и адекватной. Забуференный формалин является оптимальной фиксирующей жидкостью, и превышение экспозиции в качественном и незагрязненном растворе на часы или даже сутки не оказывает негативного влияния на ткани (за исключением образцов, предназначенных для иммуногистохимических исследований). Излишнее стремление минимизировать время фиксации в формалине может привести к недостаточной фиксации тканевых образцов, вызвать появление дефектов при дальнейшей обработке материала.

В порядке оптимизации лабораторных работ можно рекомендовать уже на этапе вырезки разделять потоки разнородных материалов. При этом материал

эндоскопических и пункционных биопсий, соскобов эндометрия, биопсий кожи и шейки матки, операционного материала и проч. запускается в обработку отдельными сериями. Для каждой из этих серий материала желательно подобрать оптимальные условия фиксации. Это не сложно, ибо при использовании стандартизованных растворов фиксатора приходится варьировать лишь экспозицией, величина которой зависит от размеров кусочков и некоторых особенностей тканей (избыток жидкой крови, жира и проч.).

При аппаратных методах проводки всегда следует первым шагом устанавливать окончательную фиксацию материала продолжительностью не менее 2-3 час. независимо от того, насколько полноценно материал зафиксирован до загрузки в аппарат. Этого времени, при адекватных размерах кусочков, как правило, достаточно, чтобы нивелировать незамеченные недостатки предварительной фиксации материала.

Но и при этом, не следует помещать в одну корзину (реакционную емкость) кассеты со слишком разнородным материалом. Загрязняющие фиксирующую жидкость примеси крови от соскобов эндометрия или жира от жировой клетчатки и атером могут ухудшить качество фиксации других тканевых образцов, и, кроме того, будут способствовать увеличению расхода фиксирующей жидкости, которую придется менять перед каждым новым циклом проводки.

АРТЕФАКТЫ ФИКСАЦИИ

Фиксационные артефакты обусловлены, в первую очередь, несоблюдением условий фиксации, нарушением поступления фиксирующей жидкости в ткань, применением некачественных реактивов.

Неравномерная фиксация

Причиной неравномерной фиксации является медленное распределение фиксирующего раствора в ткани. Чаще всего это происходит из-за несоблюдения времени фиксации образца, фиксации слишком большого куска или использования некачественного фиксатора с низкой проникающей способностью.

Для наилучшей фиксации не следует вырезать большие кусочки, особенно тканей, быстро подвергающихся аутолизу, или характеризующихся высокой плотностью (кожа, фиброзная ткань, стенки кистозных образований и др.). Не следует также запускать в проводку не вскрытые инкапсулированные образования.

Формалиновый пигмент

Формалиновый пигмент проявляется в виде мелких четко очерченных гранул коричневого или черного цвета, ассоциированных с эритроцитами или лежащих в непосредственной близости от них. Чаще всего его можно обнаружить в тканях, богатых эритроцитами, например, селезенке, или в тканях, требующих длительной фиксации (большинство аутопсийных образцов). Пигмент образуется в результате взаимодействия кислого формалина и гемоглобина эритроцитов с образованием формальдегидкислого гематина.

С течением времени формалин разрушается с образованием муравьиной кислоты, потому незабуференный раствор формалина быстро закисляется. Следует учесть, что муравьиная кислота может образовываться даже в забуференном формалине, если буферная емкость раствора недостаточна.

Избежать этого артефакта позволяет обработка образца, фиксированного в кислом формалине, спиртовым раствором пикриновой кислоты перед проводкой. Но лучше всего использовать для фиксации только забуференный формалин.

Ртутный осадок

Фиксация в растворах, содержащих хлорид ртути, обуславливает появление темно-коричневого или черного осадка в тканях, удалить который можно, обработав материал раствором Lugol или спиртовым раствором йода с последующим обесцвечиванием тиосульфатом натрия.

В связи с высокой токсичностью, применение хлорида ртути для фиксации материала следует ограничить. Вместо соли ртути можно использовать нетоксичные соли цинка, не выпадающие в осадок в тканях.

Недостаточная (неполная) фиксация

В недостаточно фиксированных тканях продолжают развиваться аутолитические процессы, сохраняются остатки тканевой жидкости, препятствующие равномерному пропитыванию тканей парафином.

ПРОВОДКА

Использование правильной программы проводки

Программу проводки необходимо выбирать в зависимости от типа ткани и размеров образцов. Слишком длинная программа для маленьких (например, эндоскопических и пункционных) биопсий или слишком короткая для крупных образцов, особенно содержащих жировую ткань (молочная железа и др.), может привести к дефектам проводки материала.

Вариантов программ проводки может быть множество, и по большому счету не важно – какому из этих вариантов отдается предпочтение, важно конечное качество гистологических препаратов и какой ценой это достигается.

Всегда наиболее предпочтительно использовать надежную, апробированную программу проводки, в случае если она дает хороший и стабильно воспроизводимый результат. Модернизация программ может потребоваться, например, при решении задач увеличения производительности лаборатории. При этом изменения в привычную программу проводки рекомендуется вводить пошагово, четко документируя все нововведения, сколь незначительными они бы ни казались, со сравнительной оценкой получаемых результатов пробных проводок малых партий материала.

При переходе от ручных методов проводки к аппаратным начинать следует с программ, апробированных и рекомендованных фирмой-производителем, с последующей их коррекцией исходя из особенностей конкретного материала. Любые изменения в стандартную программу проводки рекомендуется вводить пошагово, четко документируя все нововведения.

Программы проводки следует подбирать исходя из конкретных технологических условий лаборатории, видов и объемов исследуемого материала. Не редко в лаборатории одновременно используется несколько программ проводки – например, для малых биопсий, для операционного материала, для аутопсийного материала. Кроме стандартной плановой программы проводки, в некоторых лабораториях требуется выполнять ускоренную проводку материала – в таких случаях полезны дополнительные технические возможности современных гистологических процессоров – такие как вакуум, давление, микроволновое облучение и др.

Подбор адекватной программы, с учетом пробных проводок, может занять достаточно продолжительное время, но потраченные усилия обеспечат стабильность работы лаборатории на длительную перспективу.

Дополнительная фиксация

Для оптимальной проводки и получения качественных микропрепаратов ткань должна быть хорошо зафиксирована. Если после неполной фиксации образцы ткани при проводке попадают в спирт, то возникает феномен зональной фиксации (формалиновая фиксация по периферии образца, спиртовая фиксация в центре).

При аппаратных методах проводки всегда следует первым шагом устанавливать окончательную фиксацию материала продолжительностью не менее 2-3 час. независимо от того, насколько полноценно материал зафиксирован до загрузки в аппарат. Этого времени, при адекватных размерах кусочков, как правило, достаточно, чтобы нивелировать незамеченные недостатки предварительной фиксации материала.

Но и при этом, не следует помещать в одну корзину (реакционную емкость) кассеты со слишком разнородным материалом. Загрязняющие фиксирующую жидкость примеси крови от соскобов эндометрия или жира от жировой клетчатки и атером могут ухудшить качество фиксации других тканевых образцов, и, кроме того, будут способствовать увеличению расхода фиксирующей жидкости, которую придется менять перед каждым новым циклом проводки.

Выбор реагентов

Для получения наилучших результатов при проводке материала необходимо использовать реагенты высокого качества.

Традиционно для дегидратации используется этиловый спирт (этанол). К сожалению, возможности использования в здравоохранении спирта этилового 96-98% в настоящее время практически отсутствуют, и лучшее что мы можем получить для лаборатории – это «спирт медицинский 95%». Широко использовавшиеся ранее методические приемы кустарного обезвоживания спирта в лабораторных условиях с помощью сульфата меди (медный купорос) – малопродуктивны и теперь уже почти не применяются. Выходов из этой ситуации три.

Первый – четко контролировать каждую поступающую партию спирта медицинского с помощью спиртометра и корректировать методику разведения спиртов в зависимости от концентрации исходного раствора. Из опыта можем отметить, что поступающий в лечебно-профилактические учреждения фармакопейный «спирт медицинский 95%» в реальности может иметь концентрацию основного вещества от 93,5% до 95,7%.

Второй – использовать для проводки только высококачественный ксилол квалификации не ниже «чда». Это тоже может оказаться проблемой, но вполне решаемой.

Третий – использовать для проводки высокоочищенный изопропиловый спирт (изопропанол) с концентрацией основного вещества не менее 99,5%, в котором

осуществляются все этапы дегидратации и пропитки до парафина – таким образом, из использования исключаются те только этанол, но и ксилол.

Для получения наилучших результатов при проводке и заливке материала необходимо использовать парафин высокого качества. В настоящее время предлагается множество марок специализированного гранулированного парафина для гистологии. Основные качественные характеристики – температура плавления 56°C (отсутствие легко- и тугоплавких фракций), гомогенность (поверхность разлома застывшего парафинового блока должна иметь равномерный мелкозернистый вид), пластичность (не растрескивается при замораживании до -20°C).

Контроль качества реагентов

Реагенты для проводки необходимо заменять в четком соответствии с протоколом. Предпочтительно использование системы контроля за реагентами, применяемой в современных гистологических процессорах. Использование загрязненных или разбавленных реагентов приводит к плохому качеству проводки материала.

Формалин, используемый для проводки, должен сохранять характерный резкий запах, быть прозрачным, допускается слегка желтоватый оттенок цвета. Следует заменить формалин перед проводкой новой партии образцов, если он загрязнен примесью крови (красно-бурый цвет), жира (опалесцирует или имеет хорошо различимые жировые капли), мелкими фрагментами тканевых образцов из предыдущей партии проводки, или если он имеет мутный вид и осадок.

Промывочную воду необходимо заменять на свежую перед проводкой каждой новой партии материала независимо от того, насколько чистой она кажется глазу.

Спирты, используемые для проводки должны сохранять характерный запах, быть прозрачными. Всегда следует заменить спирты перед проводкой новой партии образцов, если они имеют мутный вид. Быстрее загрязняется первая емкость с 70% спиртом, при больших объемах материала его приходится менять практически перед проводкой каждой новой партии образцов. Очень важно для адекватной дегидратации материала в последней спиртовой емкости всегда иметь чистый неразбавленный спирт – потому ее тоже надо заменять довольно часто (при использовании процессоров карусельного типа спиртовые емкости просто сдвигают на одну позицию назад).

Ксилол, используемый для проводки должен сохранять характерный запах, быть прозрачным. Следует заменить ксилол перед проводкой новой партии образцов, если он имеет мутный вид. Быстрее всего загрязняется первая емкость ксилола, следующая за спиртом, при больших объемах материала его приходится менять практически перед проводкой каждой новой партии образ-

цов. Очень важно для адекватной пропитки материала в последней ксилольной емкости всегда иметь чистый ксилол – потому ее тоже надо заменять довольно часто (при использовании процессоров карусельного типа ксилольные емкости сдвигают на одну позицию назад).

Парафин, используемый для проводки, должен быть полностью расплавленным при температуре, заданной протоколом, с легким, почти неуловимым запахом воска. Недопустимы примеси ксилола во второй и третьей парафиновых емкостях – парафин, загрязненный ксилолом, имеет резкий нехарактерный запах, более жидкую консистенцию при 56°C, так как температура его плавления много ниже (приближается к 37°C). Очень важно для адекватной пропитки материала в последней парафиновой емкости всегда иметь чистый парафин – потому ее тоже надо заменять довольно часто (при использовании процессоров карусельного типа парафиновые емкости сдвигают на одну позицию назад).

Отказ от использования опасных реагентов

По возможности рекомендуется применять методы проводки без использования ксилола (реализовано в некоторых современных гистологических процессорах – отказ от использования токсичных реагентов без потери качества проводки материала). Существенный недостаток – значительно бóльшая стоимость этих технологий.

Из наиболее доступных заменителей ксилола для гистологической проводки можно рекомендовать высокоочищенный изопропиловый спирт (изопропанол) с концентрацией основного вещества не менее 99,5%, в котором осуществляются все этапы дегидратации и пропитки до парафина – таким образом, из использования исключаются не только ксилол, но и этанол.

Из наиболее важных технологических особенностей использования изопропанола для гистологической проводки отметим необходимость существенного (до 1,5 раз) удлинения времени проводки материала.

Выбор оборудования для проводки

Тканевые процессоры предназначены для комплекса первичной лабораторной обработки тканей, включая фиксацию, промывку, обезвоживание и пропитку материала.

Традиционно в морфологических лабораториях широко используются тканевые процессоры карусельного типа. Наиболее распространены аппараты AT-4M (Россия), Leica TP1020 (Germany), Microm STP120/122 (Germany), Sakura Rotary (Japan) и Shandon Citadel 2000 (United Kingdom).

Это приборы относительно небольшой производительности и минимально защищенные от испарений. При этом в приборах Leica TP1020, Microm STP120/122 и Shandon Citadel 2000 имеется техническая возможность двойной загрузки, что обеспечивает увеличение их производительности соответственно до 220, 360 и 110 кассет за один цикл. Таким образом, наименьшей производительностью из сравниваемых приборов обладает Shandon Citadel 2000, наибольшей – Microm STP120/122. В качестве дополнительной опции для улучшения качества проводки материала в Leica TP1020 предлагается вакуумная пропитка. Следует также обратить внимание на удобство очистки приборов – у Leica TP1020, Microm STP120/122 и Sakura Rotary контейнеры съемные, тогда как в Shandon Citadel 2000 доступ к ним ограничен. Существенным отличием Leica TP1020 является возможность отсроченного старта программы проводки до 9 дней. Эта опция позволяет загружать материал в аппарат в последний рабочий день перед продолжительными (до 9 суток) выходными.

Среди высокотехнологичных тканевых процессоров, представленных на рынке, отметим Leica ASP300 (Germany), Microm STP420 (Germany), Sakura VIP5 (Japan) и Shandon Hypercenter XP (United Kingdom).

Общими признаками этой группы приборов являются высокая производительность (300 и более кассет за один цикл, исключение составляет лишь Shandon Hypercenter XP, производительность которого в два раза ниже) и схожие технологические решения – такие как закрытый контур, полная защита от испарений, автоматизация основных технологических операций, возможность внешнего удаленного контроля технологического процесса. При этом Leica ASP300 оснащен одной ретортой на 300 кассет, Microm STP420 двумя с такой же суммарной вместимостью, Sakura VIP5 оснащен одной ретортой вместимостью 360 кассет. Функция контроля уровня реагентов предусмотрена во всех образцах, кроме Microm STP420.

В технологии Leica ASP300 и Microm STP420 предусмотрено использование вакуума, причем в Microm STP420 имеется два фиксированных режима – 26КПа и 74КПа, а в Leica ASP300 уровень отрицательного давления регулируется автоматически.

Все приборы оснащены программами очистки – в Leica ASP300 имеется четыре стандартных программы различной продолжительности, в Sakura VIP5 – две стандартные программы, в Microm STP420 программа очистки устанавливается произвольно.

Объем емкостей для реагентов имеет значение для оценки и планирования их расхода – минимальные по объему емкости предлагаются в Sakura VIP5 (возможны комплектации с емкостями объемом либо 2,7 л, либо – 3,7 л), самыми большими емкостями (объемом 5 л) комплектуется Microm STP420.

Наиболее удобное в работе сенсорное управление использовано в Leica ASP300 и Microm STP420, напротив – Sakura VIP5 оснащается обычным жидкокристаллическим дисплеем и управляется с помощью внешней клавиатуры или ноутбука.

В приборах Leica ASP300 и Microm STP420 возможно использование любых реагентов, что обеспечивает определенную гибкость, возможность выбора, реализацию отдельных профессиональных предпочтений специалистов с учетом конкретных экономических условий деятельности лаборатории. Напротив – Sakura предлагает для своего прибора полную линейку стандартных готовых к употреблению реагентов, в том числе – неформалиновый фиксирующий агент и бесксилольную технологию пропитки.

Особое место в ряду тканевых процессоров занимает гистоконвейер Sakura Tissue-Tek Xpress (Japan). Прибор представляет собой новое в технологии тканевого процессинга техническое решение, основанное на поточном принципе с использованием мягкого микроволнового облучения. Sakura предлагает для своего прибора полную линейку стандартных готовых к употреблению реагентов, в том числе – неформалиновый фиксирующий агент и бесксилольную технологию пропитки.

АРТЕФАКТЫ ПРОВОДКИ

Ухудшение качества среза, утрата деталей архитектоники ткани и волокнистых структур следует отнести не только к плохой фиксации, но также могут быть связаны с дефектами проводки материала.

Некоторые артефакты проводки (такие, как сморщивание, деформация или вымывание растворимых веществ) являются неизбежными.

Вымывание растворимых веществ

Холестерол в препаратах определяется в виде вытянутых веретенообразных кристаллов в стенке сосудов и старых кровоизлияниях. Кристаллы холестерина растворяются в результате проводки образца, оставляя щели характерной веретеновидной формы.

Более частое проявление вымывания веществ из препарата в процессе проводки – растворение капель жира из адипоцитов с образованием оптически пустых каплевидных внутриклеточных включений.

При использовании фиксирующих растворов на водной основе (формалин) из клеток вымывается водорастворимый гликоген.

Эти данные следует иметь в виду при планировании стратегии гистохимических исследований.

Укорочение процедуры

Укорочение стандартной процедуры проводки возможно только с применением дополнительных методов физического воздействия на образцы, ускоряющих пропитывание ткани – таких как вакуум, давление, микроволновое облучение и др.

Произвольное укорочение времени дегидратации и пропитывания при обычных внешних условиях проводки (температура, давление и проч.) могут привести к резкому ухудшению качества пропитывания ткани.

Недостаточное отмывание формалина

Остатки формалина при недостаточном его отмывании способствуют задержке в тканях капель воды, не удаляемых при процедуре дегидратации – в этих участках не будет полноценного пропитывания парафином. Потому не следует произвольно укорачивать время отмывки после формалина, причем чем кусочки большего размера – тем время отмывания должно быть больше.

Недостаточная дегидратация

Недостаточная дегидратация ткани возможна при произвольном укорочении процедуры или при использовании загрязненных спиртовых растворов. Оставшиеся в тканях капли воды препятствуют полноценному пропитыванию образца парафином.

Высушивание образцов

Высушивание образцов возможно при использовании в процедуре проводки хлороформа вместо ксилола. Хлороформ очень летуч и потому быстро испаряется с поверхности кусочков, вызывая их высушивание и растрескивание. При использовании хлороформа в процедуре проводки следует насколько возможно сократить время пребывания кусочков на открытом воздухе при переносе между емкостями (при ручной проводке или при использовании процессоров карусельного типа).

Высушивание образцов возможно и при резком увеличении времени пребывания кусочков на открытом воздухе из последней спиртовой емкости в ксилол или между ксилольными емкостями. Однако, ксилол менее летуч, и потому при его использовании опасность высушивания кусочков много меньше.

Перегрев образцов

Перегрев образцов возможен при инкубации образцов в первой парафиновой емкости сильно загрязненной ксилолом при 56°C. Дело в том, что температура плавления ксилол-парафиновой смеси приближается к 37°C, а при 56°C смесь близка к кипению – в результате кусочки практически «свариваются» или «пережигаются».

Единственный способ избежать этого артефакта – своевременно менять первый парафин. Примеси ксилола во второй и третьей парафиновых емкостях вообще недопустимы.

ЗАЛИВКА

Подбор заливочных формочек

Заливочные формочки следует подбирать сообразно размерам тканевых образцов. Не следует использовать для всех образцов одинаковые заливочные формочки.

Предотвращение механических повреждений образцов

Все манипуляции с образцами следует выполнять аккуратно. При заливке образцы не рекомендуется с силой придавливать ко дну заливочной формочки – некоторые образцы, деформировавшиеся на предыдущих этапах обработки, при этом могут быть сломаны.

Размещение образцов в заливочных формах

Образцы переносятся из кассет в заливочные формы параллельно – то есть той же поверхностью вниз, как они лежат и в кассетах. Таким образом, поверхность, выбранная для среза врачом во время вырезки, всегда попадет на вершину парафинового блока.

Правильная ориентация образца

Если образец имеет вытянутую форму – его следует ориентировать по длинной оси заливочной формы, чтобы при микротомии срез приходился по малой стороне кусочка.

Предотвращение сильного нагрева инструментов

Щипцы, с помощью которых производится перенос материала из кассет и ориентация образцов в заливочной форме следует нагревать не более чем до темпе-

ратуры плавления парафина. Современные заливочные станции оснащены специальными гнездами для нагрева браншей пинцетов, причем температура нагрева в них соответствует температуре парафинового танка.

Перегрев инструментов при заливке возможен при использовании спиртовки, как это обычно бывает в процедуре ручной заливки. Если щипцы, с помощью которых производится заливка материала, нагреваются до температуры большей, чем температура плавления парафина – это может приводить к локальным термическим повреждениям ткани в области контакта с раскаленными щипцами.

Проверка температуры

Температуру горячей части заливочного комплекса и резервуара с парафином рекомендуется проверять регулярно.

Если температура горячей части заливочного комплекса и резервуара с парафином превышает температуру плавления парафина, то и на этой стадии обработки образец может быть поврежден воздействием высокой температуры.

Предотвращение переполнения формочки парафином

В заливочную формочку следует наливать ровно столько парафина, чтобы заполнить ее до краев. Избыточное количество парафина вызывает его затекание между кассетой и формой.

Потеки парафина вокруг блока требуют обрезания его по краям, кассеты не плотно фиксируются в микротоме, что приводит к неустойчивому положению блока и возможности повреждения образца и срезов при микротомии.

Выбор оборудования для заливки

Заливочные станции предназначены для заливки материала в парафин и изготовления парафиновых блоков. Это оборудование существенно облегчает технологию заливки, исключает использование спиртовок, существенно сокращает затраты рабочего времени. Все имеющиеся на рынке приборы характеризуются принципиально похожим техническим решением – оснащены емкостями для парафина, функцией автоматической подачи парафина, горячими камерами для содержания заливочных форм и кассет с материалом, горячими и охлаждаемыми рабочими поверхностями.

Основные представленные на рынке приборы – это Leica EG1160 (Germany), Microm EC350 (Germany), Sakura TEC5 (Japan) и Shandon Histocentre 3 (United Kingdom). При сравнении основных технологических параметров приборов существенных, с точки зрения пользователя, различий не обнаруживается.

Различия объемов отсеков для парафина от 3 л до 5 л, даже при больших заливках, не имеет особого значения, ибо чаще всего для одного сеанса работы хватает уже и 3 л.

В приборе Leica EG1160 для подачи парафина используется электромеханическая помпа, тогда как в сравниваемых образцах Microm EC350, Sakura TEC5 и Shandon Histocentre 3 подача парафина обеспечивается созданием избыточного давления в камере.

Различия вместимости охлаждающей панели также представляются нам не существенными. Единственное, пожалуй, принципиальное отличие технических решений Microm EC350, Sakura TEC5 и Shandon Histocentre 3 от Leica EG1160 состоит в применении двухмодульной конструкции, позволяющей модифицировать рабочее место по желанию пользователя.

АРТЕФАКТЫ ЗАЛИВКИ

Термические повреждения объектов

Локальные термические повреждения кусочков возможны при их контакте с раскаленными браншами щипцов с помощью которых производится заливка материала. Перегрев инструментов выше температуры плавления парафина при заливке возможен при использовании спиртовки, как это обычно бывает в процедуре ручной заливки.

Щипцы, с помощью которых производится перенос материала из кассет и ориентация образцов в заливочной форме следует нагревать не более чем до температуры плавления парафина. Современные заливочные станции оснащены специальными гнездами для нагрева браншей пинцетов, причем температура нагрева в них соответствует температуре парафинового танка.

Термические повреждения образцов возможны и за счет перегрева горячей части заливочного комплекса и резервуара с парафином выше температуры плавления парафина.

Переполнение формочки парафином

Избыточное количество парафина вызывает его затекание между кассетой и формой. Потечи парафина вокруг блока требуют обрезания его по краям, кассеты не плотно фиксируются в микротоме, что приводит к нестабильности блока и возможности повреждения образца при микротомии. Иногда при обрезании избытков парафина могут быть утрачены некоторые элементы маркировки блока.

Кроме того, обрезание излишков парафина вокруг блоков являются непроизводительными тратами времени.

В заливочную формочку следует наливать ровно столько парафина, чтобы заполнить ее до краев.

Неадекватно подобранный размер формочек

При использовании крупных формочек для мелких образцов на поверхности блока, предназначенной для реза, остается широкая полоса пустого парафина,

не содержащего ткани, что значительно увеличивает площадь среза. Чем больше площадь среза, тем сложнее получить равномерно тонкий качественный срез. В таких ситуациях площадь поверхности среза обычно уменьшают путем ручной обрезки излишков парафина вокруг кусочка, что является непроизводительными тратами времени.

Заливочные формочки следует подбирать сообразно размерам тканевых образцов. Не следует использовать для всех образцов одинаковые заливочные формочки.

Неплотное прилегание кусочка к поверхности среза

Неплотное прилегание кусочка к поверхности среза в блоке увеличивает количество «пустого» парафина перед кусочком, который при микротомии приходится срезать – это увеличивает время процедуры микротомии, вызывает дополнительный износ микротомных лезвий и увеличивает площадь среза.

Преждевременное застывание парафина в формочке

Парафин следует наливать в хорошо прогретую заливочную форму, иначе он преждевременно застынет, что влечет за собой неравномерное застывание парафина в блоке, появление трещин в толще блока и в окружности кусочка.

При появлении таких дефектов блок надо перезалить. Если преждевременное застывание парафина обнаруживается во время заливки, следует заливочную форму с кусочком на некоторое время оставить на горячей плате заливочного комплекса до полного расплавления парафина.

Ореол вокруг кусочка в блоке

Если кусочек при переносе из кассеты в заливочную форму долго находится на воздухе, парафин на его поверхности застывает, и при перемещении в парафин не успевает полностью расплавиться. В результате, вокруг кусочка формируется зона неравномерного застывания парафина в виде мутного ореола с трещинами. Во время микротомии нередко кусочки из таких блоков выкрашиваются и выпадают при ударе блока о нож.

При появлении таких дефектов блок надо перезалить. Если ореол обнаруживается во время заливки, следует заливочную форму с кусочком на некоторое время оставить на горячей плате заливочного комплекса до полного расплавления парафинового ореола, и только после этого продолжить монтаж основания блока.

Микротомные ножи

Для микротомии всегда следует использовать острые лезвия высокого качества. Не следует использовать лезвия до появления полос на срезе. В моделях микротомов с возможностью горизонтального перемещения ножа в широком диапазоне лезвия могут использоваться более экономно.

Угол наклона ножа

Угол наклона ножа настраивается отдельно для каждого микротом, вида ножа и плотности блока. Если угол наклона ножа не изменяется в зависимости от изменения условий – другой микротом, другой тип ножа, другой парафин – это приводит к снижению качества срезов.

Подрезка блоков

В качестве подготовки к микротомии с поверхности реза блока необходимо удалить лишний парафин, выровнять ее таким образом, чтобы в срез попадала максимальная площадь кусочка, и отполировать.

Подрезку (тримминг) блоков следует производить бережно, чтобы не утратить важные фрагменты ткани.

Для полировки поверхности блока толщину последних нескольких срезов тримминга всегда следует делать равной конечной толщине среза.

Если для ускорения процесса блоки подрезаются не аккуратно (высокая скорость, очень большая величина подачи), поверхность не полируется перед изготовлением финальных срезов – это приводит к формированию большого количества рваных дефектов ткани, в срезе похожих на дырки «проеденные молью».

Если кусочек залит в блок таким образом, что прилежит к плоскости среза не ровной (изогнутой, деформированной) поверхностью, при попытке добиться максимальной площади ткани в срезе можно при тримминге срезать критически большой объем кусочка, или вовсе утратить объект. В таких случаях блок лучше

перезалить, и при перезаливке постараться, насколько это возможно, более плотно прижать кусочек к дну заливочной формы.

Охлаждение блоков

Перед микротомией блоки следует охлаждать так как они всегда должны быть холодными во время резки. Чем холоднее блок, тем плотнее парафин, и тем проще будет получить тонкие срезы.

Если для микротомии используются неохлажденные блоки – это приводит к сильной деформации кусочка при резке за счет смещения тканей при нажиме на нож.

Считается, что идеальна для охлаждения блоков температура «талого льда». Традиционно лаборанты используют для охлаждения блоков перед микротомией пластиковые емкости со льдом. Это не очень технологично, так как на поверхности льда помещается не много блоков, он быстро подтаивает, и емкости приходится часто менять, для чего необходимо отрываться от рабочего места, чтобы подойти к холодильнику.

Рядом фирм, специализирующихся на выпуске медицинского лабораторного оборудования, производятся настольные морозильные камеры малых размеров с горизонтально расположенной морозильной камерой, вместимостью до 200 блоков. Этот прибор удобно размещается на рабочем месте рядом с микротомом, и избавляет лаборанта от непроизводительных потерь времени.

Надо помнить, что блоки перед микротомией не следует сильно замораживать – это может привести к появлению трещин в парафине, особенно по краю залитого кусочка, в виде белесоватого ореола.

Качественный парафиновый блок не должен растрескиваться при охлаждении до -20°C . При появлении трещин в блоках при температурах в указанном диапазоне следует обратить внимание на качество используемого парафина и возможные дефекты заливки.

Скорость резания

При микротомии следует устанавливать малую скорость резания. При высокой скорости резания в момент удара ножа о край блока, из него выколачиваются мелкие зерна парафина, из-за чего в срезе появляются рваные дефекты в виде выщербин или полос.

В таких случаях поверхность среза следует заново отполировать ножом, чтобы в дальнейшем получить нормальные срезы.

Выбор оборудования для микротомии

Для изготовления парафиновых срезов используются специальные приборы – микротомы. Существует два принципиально отличных технических решения в конструкции этих приборов: так называемый «санный» микротом – ручное горизонтальное перемещение ножа, механическая винтовая подача образца, использование многоразовых микротомных ножей; «ротационный» микротом – ротационная ручная или механизированная подача образца на жестко закрепленный нож, возможность использования одноразовых лезвий, ретракция, различные варианты автоматизации. Ротационные механизмы используются и в конструкции современных криомикротомов.

Механические ротационные микротомы на рынке представлены моделями Leica RM2125 (Germany), Leica RM2235 (Germany), Microm HM325 (Germany), Sakura SRM200 (Japan) и Shandon FINESSE 325 (United Kindom). Промежуточное положение занимают не полностью моторизованные ротационные микротомы типа Leica RM2245 (Germany). Полностью автоматизированные роторные микротомы на рынке представлены моделями Leica RM2255 (Germany), Leica RM2265 (Germany), Microm HM350 (Germany), Microm HM355 (Germany) и Shandon FINESS ME+ (United Kindom).

Санные микротомы являются самыми простыми приборами, с весьма ограниченными техническими и функциональными возможностями.

Приборы Leica RM2125 и Sakura SRM200 имеют диапазон устанавливаемой пользователем толщины срезов от 0,5 мкм до 60 мкм, и тримминг от 10 мкм до 50 мкм. Microm HM325 характеризуется более широким диапазоном регулировки толщины срезов (0,5-100 мкм), но более узким диапазоном тримминга (10-30 мкм) и Shandon FINESSE 325 характеризуется минимальным диапазоном регулировки толщины срезов (1-30 мкм).

Величина ретракции образца в приборах Leica RM2125 и Sakura SRM200 имеет сравнимую величину (соответственно 200 мкм и 220 мкм), что в 4000 раз превышает наиболее часто используемую толщину срезов (0,5 мкм), и более чем в 3 раза превышает максимально возможную толщину среза. Величина ретракции в Microm HM325 составляет 60 мкм, что лишь в 120 раз превышает наиболее часто используемую толщину срезов (0,5 мкм).

Более технологичны приборы, в которых величина ретракции существенно превышает максимально возможную величину срезов – это обеспечивает лучшую сохранность отполированной поверхности реза блока при обратном ходе коромысла.

Величина горизонтального смещения образца в моделях Leica RM2125, Microm HM325, Sakura SRM200 имеет сравнимую величину, хотя увеличение этого параметра на 2 мм в Leica RM2125 создает условия для лучшей функциональности этой модели при работе с малыми образцами, поперечный размер которых меньше 2 мм. Следует, однако, заметить, что меньший диапазон поперечного смещения образца в Sakura SRM200 полностью компенсируется возможностью по-

перечного смещения ножа. Отсутствие же функции поперечного смещения ножа в Microm HM325 в сочетании с меньшей величиной горизонтального смещения образца существенно снижает функциональность прибора, особенно при работе с малыми образцами, и ограничивает возможности использования ножа для изготовления срезов с нескольких блоков. Shandon FINESSE 325 характеризуется минимальной в сравниваемом ряду приборов величиной возможного горизонтального смещения образца при отсутствии функции поперечного смещения ножа. Величина вертикального смещения образца во всех описываемых моделях имеет сравнимую величину, а имеющиеся отличия не оказывают влияния на функциональность приборов.

Наличие в Microm HM325 счетчика срезов создает дополнительное удобство при работе и позволяет объективно оценить нагрузку на прибор.

Ротационные микротомы Microm, имеющие систему ретракции, могут дополнительно оснащаться оригинальной системой переноса срезов Microm STS, позволяющей без какого-либо манипулирования руками тонкие срезы отличного качества направлять непрерывным ламинарным потоком воды от лезвия ножа в подогретую водяную баню. Система состоит из специального держателя сменных лезвий с ламинарным потоком воды между режущей кромкой и подогретой водяной баней, установленной непосредственно на микротоме. Под действием поверхностного натяжения воды, возникающего одновременно с резанием, происходит расплавление среза. Захваченная парафиновая полоска мягко переносится через водяной мостик и затем автоматически попадает в водяную баню. Лишние срезы и обрезки выравнивания собираются в отдельном съемном поддоне для отходов.

Автоматизированные ротационные микротомы характеризуются высокой производительностью за счет широкого спектра моторизованных функций и отличным качеством приготовления срезов. Основными техническими особенностями, выгодно отличающими модель Leica RM2255 от аналогов являются наличие функции ретракции без полного оборота ротора, более широкий диапазон тримминга, более удобная конфигурация информационных дисплеев и органов управления.

АРТЕФАКТЫ МИКРОТОМИИ

Следы от ножа

Борозды на препарате чаще всего являются результатом повреждения блока ножом при микротомии. Следы от ножа могут просматриваться по всей поверхности среза, но чаще выявляются в виде единичных борозд, идущих по направлению хода ножа. Грубые борозды хорошо видны макроскопически.

Режущая кромка ножа может иметь зазубрены, быть недостаточно заточенной или поврежденной в процессе работы (после контакта с металлическими инструментами или при резке плотной ткани, содержащей участки кальцификации).

Смещение тканевых компонентов в срезе

При приготовлении препаратов, чаще всего костной ткани, в процессе микротомии может произойти смещение костных балок, коллагеновых, эластических и ретикулярных волокон, что обусловлено изменением их направления и механической ориентацией по ходу ножа.

Такие изменения ткани могут быть обусловлены использованием тупых ножей, грубой микротомией или применением слишком мягких заливочных сред.

Эффект жалюзи

Появление тонких параллельных разрывов препарата обычно объясняется нестабильным положением ножа при микротомии плотных образцов тканей. В большинстве случаев это связано с недостаточной фиксацией лезвия в микротоме.

Кроме того, чрезмерная ломкость материала может быть обусловлена высушиванием образца при проводке или чрезмерным охлаждением кусочка при приготовлении замороженных срезов.

Нивелировать микровибрации ножа в этих случаях позволит уменьшение толщины срезов или некоторое размягчение блока перед микротомией.

Вибрационные повреждения

Грубые вибрационные повреждения материала возникают, в первую очередь, при обработке больших кусков плотных тканей (чаще всего, препараты шейки и тела матки), при плохом закреплении ножа микротомом или образца в держателе. В ряде случаев причиной вибрационных повреждений могут быть технические дефекты микротомов.

Описываемых артефактов можно избежать, используя качественные, хорошо отрегулированные микротомы и блоки адекватного размера. Стоит также обращать внимание на надежность крепления ножа и образца в держателях.

Последствия грубой подрезки (тримминга)

Данный артефакт чаще встречается в препаратах лимфатических узлов или других тканей с высокой клеточностью. В результате грубой подрезки (тримминга) с поверхности блока выпадают фрагменты ткани.

Эти дефекты обычно хорошо видны на срезах уже при их расправлении на водяной бане, но могут носить характер микроповреждений.

Загрязнения адгезивами

Если в лаборатории традиционно используются адгезивные средства, добавляемую во флотационную жидкость, то существует опасность отложения избытков адгезива на срезах.

Адгезивы могут откладываться на срезах в виде аморфных слабо базофильных гомогенных масс в результате вымывания или испарения флотационной жидкости.

Отложению адгезивов на срезах могут способствовать неоднородная структура тканей (легкое), низкое качество срезов и использование адгезивов, которые плохо стекают с предметного стекла. Не следует помещать на плитку для высушивания стекла, содержащие избыток раствора адгезива.

Использование тонких (3-5 мкм) срезов и высококачественных предметных стекол с идеально ровной гладкой поверхностью обеспечивает надежное прилипание тонких срезов к стеклу за счет сил поверхностного натяжения и, таким образом, исключает необходимость применения адгезивных средств при большинстве гистологических окрасок, не предполагающих термической обработки срезов.

Загрязнения срезов фрагментами плоского эпителия

Загрязнения микропрепаратов фрагментами плоского эпителия встречается не редко и связаны с попаданием на срез чешуек кожи пальцев, перхоти или эпителия слизистых оболочек носоглотки и ротовой полости при чихании и кашле.

Лаборантов следует предупредить о соблюдении элементарных гигиенических мер, направленных на исключение такого рода контаминаций, и строго за это спрашивать.

За кожей рук необходимо ухаживать с использованием питательных и увлажняющих кремов и смазок, волосы необходимо полностью убирать под медицинские шапочки, для исключения распыления слюны следует использовать медицинские маски.

Никогда не следует прикасаться руками ни к срезам, ни к поверхности предметных стекол – все манипуляции со срезами необходимо производить лишь с использованием кисточек и специальных инструментов, а предметные стекла можно брать рукой только за ребра по краям матовой полосы для записи.

Прочие загрязнения

Смонтированные срезы, оставленные неокрашенными на длительный срок на открытом воздухе, могут быть загрязнены различными агентами, например: микроорганизмами, особенно аэробными грибами, взвешенными в воздухе частицами, волосками от кисточки, при переносе среза с лезвия в ванночку, частицами целлюлозы с салфеток, используемых для очистки ванночки или покровных стекол, пылью.

Желательно свежеприготовленные срезы перед окраской высушивать в закрытых контейнерах. Срезы, которые предполагается хранить некоторое время неокрашенными, также рекомендуется содержать в закрытых контейнерах.

Кроме того, стекла со срезами необходимо тщательно промывать перед процедурой окрашивания.

Складки срезов

Хрящевая ткань одна из наиболее сложных для обработки, так как препараты плохо расправляются. Избежать складок в материале помогает применение специальных техник обработки: пропитывание в целлоидин-парафиновых смесях (double-embedding) или заливка в смолы.

Образование складок связано в первую очередь с тем, что хрящевая ткань в процессе проводки сильно ссыхается и лишь частично расправляется при флотации.

Складки срезов других тканей, чаще всего, являются следствием дефектов микрономии или флотации, и при тщательном соблюдении технологии работ не образуются.

РАСПРАВЛЕНИЕ СРЕЗОВ

Вода

Воду в емкости для флотации (водяная баня) следует заменять так часто как это возможно.

Если вода в емкости заменяется редко, а только добавляется, то на срез могут попасть различные загрязняющие агенты, такие как споры грибов или фрагменты срезов с других блоков. Если поверхность воды во флотационной емкости не очищается после каждого блока – это может привести к попаданию частичек одного препарата на другой и быть причиной диагностических ошибок.

Перед микротомией каждого нового блока следует тщательно очищать поверхность воды от мелких остатков срезов с предыдущего блока. Микротомию разнородного материала следует производить на разных микротоммах, или полностью менять воду в водяной бане перед началом работы с каждой новой партией блоков.

Часто на поверхности воды остаются мелкие фрагменты срезов от абортного материала (мелкие ворсины) – потому этот материал следует направлять на микротомию либо на отдельное рабочее место, либо последним в течение рабочего дня.

Для расправления срезов в водяной бане рекомендуется всегда использовать свежеприготовленную дистиллированную воду – это гарантирует избавление от избытков солей и механических примесей.

Стекло предметное

Перед использованием всегда следует проверять чистоту предметных стекол.

Предметные стекла следует готовить для размещения на них срезов непосредственно перед микротомией и в количестве, необходимом для изготовления требуемого числа препаратов. Нельзя раскладывать стекла заранее и оставлять их лежать на воздухе длительное время.

Прикосновение к стеклам руками необходимо исключить, или свести к минимуму, чтобы предотвратить загрязнение их чешуйками плоского эпителия кожи рук. Никогда не следует прикасаться руками к поверхности предметных стекол, предметные стекла можно брать рукой только за ребра по краям матовой полосы для записи.

Если чистота предметных стекол не контролируется, на них попадают частички грязи и микроорганизмы, которые портят даже хороший микропрепарат.

Выбор предметного стекла

Для гистологических микропрепаратов предпочтительно выбирать предметные стекла, изготовленные из нейтрального стекла, толщиной не более 1,0 мм, бесцветные, с идеально ровной и гладкой поверхностью и матовой полосой для записи.

Наличие шлифованного края существенно увеличивает стоимость стекла. Вместе с тем, стекла с нешлифованным краем, особенно при неосторожном обращении, дают много мелких осколков на предметном столе микроскопа, фронтальной линзе конденсора и в механизме привода препаратопроводителя.

Очень важно проследить точность линейных размеров предметного стекла. В некоторых случаях, особенно это характерно для менее качественных и недорогих стекол, ширина стекол варьирует даже в пределах одной партии более чем на 1,0 мм. Это может оказаться критичным в случае если в лаборатории используются автоматы для заключения срезов под покровное стекло – эти приборы очень чувствительны к изменению ширины предметных стекол.

Как правило, высококачественные предметные стекла для гистологии (Menzel, TermoShandon и другие) поступают к конечному потребителю готовыми к употреблению, и не требуют дополнительной чистки и обезжиривания.

Попадание на срез чешуек плоского эпителия

Микропрепараты, изготовленные неопытными сотрудниками, часто содержат в большом количестве чужеродные загрязнения в виде чешуек плоского эпителия. Не следует расчесывать волосы и кожу рук над срезами, плавающими на поверхности воды во флотационной емкости – это может привести к загрязнению срезов чешуйками плоского эпителия.

Микропрепараты с чужеродными загрязнениями нельзя принимать для микроскопического исследования, их следует отправлять на переделывание.

Расправление срезов

Срезы более чем с одного блока не должны находиться вместе во флотационной емкости.

Не следует оставлять во флотационной емкости срезы с двух или нескольких блоков – это может привести к неверной идентификации образцов. Особенно высок такой риск, когда одновременно обрабатываются ткани одного типа.

Контроль температуры водяной бани

Температуру воды во флотационной емкости следует тщательно контролировать. Оптимальна температура – на 4-5 °C ниже температуры плавления парафина – то есть 51-52°C. При такой температуре срезы быстро расправляются, парафин не плавится, а лишь размягчается.

Оставлять срезы во флотационной емкости следует только на время, которое необходимо для полного их расправления, и сразу переносить срезы на предметное стекло.

Парафин срезов никогда не должен плавиться на поверхности водяной бани. Если срезы оставляются на водяной бане более 15 минут или если парафин срезов плавится, происходит перерастяжение среза, за счет чего формируются повреждения и разрушения ткани среза в виде разрывов.

Складки на срезах

Качественные срезы при помещении во флотационную емкость должны быстро расправляться.

Если срезы полностью не расправляются, причиной этому может служить слишком холодная вода во флотационной емкости или слишком большая толщина срезов.

Повреждение срезов

Расправление складок на срезах с помощью щеточки или пинцета следует выполнять лишь в исключительных случаях и чрезвычайно аккуратно, чтобы не повредить срез.

Если расправление складок на срезах с помощью щеточки или щипцов выполняется энергичными движениями, возникают макро- и микроскопические повреждения срезов в виде проколов и разрывов.

Выбор срезов

Никогда не следует переносить на стекло первый и второй срезы из серии. Первый и второй срезы выглядят лучше, поскольку они всегда толще из-за теплового расширения холодного блока при первом прохождении ножа.

Пузыри под срезами

Любые видимые пузырьки воздуха плавающие на поверхности флотационной жидкости следует удалять до того, как срезы помещаются в воду.

Пузырьки воздуха могут образоваться под срезом и при его помещении во флотационную ёмкость. Если пузырьки сохраняются под срезом при переносе его на предметное стекло, они препятствуют плотной его адгезии, и в этих участках при высушивании образуются округлой или овальной формы мелкие дефекты в виде трещин и разрывов, выявляемые при микроскопии.

Чаще всего это связано с нарушениями техники монтирования среза на предметное стекло. Самой частой ошибкой является захват и подведение пузырьков воздуха под срез предметным стеклом. Правильной тактикой является натягивание среза на стекло, расположенное под углом к поверхности воды.

Пузырьки, попадающие под срез исчезают при его высыхании, но несмотря на это, область среза над пузырьком часто разрушается и может быть утрачена.

Для уменьшения количества пузырьков воздуха во флотационную ёмкость рекомендуется заливать свежекипячённую воду с минимальным содержанием растворённых газов. Воду следует сменить, если на внутренних стенках бани скапливаются пузырьки воздуха.

Отклеивание срезов от предметного стекла

Отклеивание срезов от предметного стекла может происходить при подготовке к окраске и во время процедуры окрашивания. Это может быть связано с недостаточным прилипанием срезов к предметному стеклу. Наиболее частыми причинами являются недостаточное высушивание срезов после микротомии, или толстые срезы, или использование некачественных предметных стекол с неровной поверхностью.

Отклеивание срезов от предметного стекла может происходить и при процедуре термической обработки срезов, требуемых для некоторых вариантов окрасок (демаскировки антигена перед иммуногистохимическим окрашиванием). В таких случаях следует использовать коммерческие предметные стекла со специальным адгезивным покрытием, выполненным в фабричных условиях.

Использование технологий ручного покрытия предметных стекол специальными адгезивами (AAS) не желательно, так как может повлечь за собой появление специфических артефактов.

Использование тонких (3-5 мкм) срезов и высококачественных предметных стекол с идеально ровной гладкой поверхностью обеспечивает надежное прилипание тонких срезов к стеклу за счет сил поверхностного натяжения и, таким образом, исключает необходимость применения адгезивных средств при большинстве гистологических окрасок, не предполагающих термической обработки срезов.

ВЫСУШИВАНИЕ СРЕЗОВ

Удаление воды со среза перед сушкой

Перед переносом стекол на плитку или в сушильный аппарат с них необходимо удалить избыток воды в вертикальном положении путем стекания. Если стекло нормально обезжирено и не загрязнено, то избыток флотационной жидкости легко стекает с его поверхности.

Если вода не удаляется со стекла перед сушкой, это может привести к деформации срезов, связанной с различием теплоемкости стекла, воды и парафина.

Поддержание оптимальной температуры сушки

Температуру плитки или в сушильном аппарате следует постоянно контролировать. Оптимальна температура – на 4-5 °С ниже температуры плавления парафина – то есть 51-52°С. При такой температуре срезы достаточно быстро высыхают, но парафин не плавится.

Если температура плитки или в сушильном аппарате превышает рекомендованные значения, это может вызывать появление так называемых «тепловых пятен» и участков неравномерного окрашивания препарата, связанных с плавлением парафина и пережиганием в этих участках самого тканевого среза.

Продолжительность сушки

Время сушки стекол следует тщательно контролировать. Длительная сушка при высоких температурах может быть губительна для срезов.

Кроме того, не следует оставлять стекла на открытом воздухе из-за опасности внешних загрязнений срезов различными агентами, например: микроорганизмами, особенно аэробными грибами, взвешенными в воздухе частицами, пылью.

Желательно свежеприготовленные срезы перед окраской высушивать в закрытых контейнерах, или прикрывать поверхности плитки с сушащимися стеклами чехлом.

ОБЗОРНАЯ ОКРАСКА

Хронометраж процедуры окраски

Следует тщательно отслеживать продолжительность каждого этапа окраски. Если технологическая процедура окраски нарушается или пропускаются некоторые этапы, это приводит к получению несопоставимых препаратов.

Контроль качества окраски

Для контроля качества окраски рекомендуется постоянно изготавливать контрольные препараты. В отсутствие контроля окраски становится невозможным определить причину плохого качества препаратов (например – некачественные реагенты, ошибки протокола, недостаточная фиксация и др.).

Обеспечение стандартных условий окраски

Условия окраски (такие как время окрашивания, перемешивания, промывки, сушки и др.) должны быть оптимизированы для каждого этапа.

При неоптимизированной промывке и сушке реагенты в последующих емкостях быстро загрязняются, а нестандартизованная процедура перемешивания может повлиять на качество препаратов – результаты окраски становятся несопоставимыми.

Оптимальным для обеспечения стандартизированной процедуры окрашивания является внедрение автоматов для окраски микропрепаратов (stainers).

Депарафинизация препаратов

При подготовке срезов к окраске необходимо всегда добиваться полной депарафинизации препаратов.

При неполной депарафинизации препаратов на стеклах остаются участки парафина, обуславливающие их гидрофобность по отношению к водным растворам красителей. В результате в препаратах появляются неокрашенные или неравномерно окрашенные участки срезов.

Препараты не страшно передержать в жидкости для депарафинирования (ксилол) – срезу это повредить не может, но зато обеспечит полную элиминацию парафина.

Для исправления дефекта можно попробовать отмыть краску, заново довести препарат до этапа депарафинизации, а затем повторить процедуру окрашивания, но это уже не гарантирует лучший результат.

Замена реагентов

Реагенты следует регулярно менять в зависимости от числа окрашенных в них препаратов. Не следует дожидаться снижения качества окраски как повода для замены реагентов.

Особенно тщательно надо следить за вспомогательными жидкостями – промывочными растворами, спиртовыми растворами, депарафинирующими реагентами.

Промывочную воду необходимо заменять на свежую перед окраской каждой новой партии препаратов независимо от того, насколько чистой она кажется глазу.

Спирты, используемые в процедуре окраски препаратов (гидратация перед окрашиванием и дегидратация перед заключением препаратов), должны сохранять характерный запах, быть прозрачными. Всегда следует заменить спирты перед окраской новой партии препаратов, если они имеют мутный вид. Наиболее быстро загрязняется емкость с 70% спиртом (первая при дегидратации), при больших объемах материала его приходится менять чаще. Довольно быстро загрязняется и первая после ксилола спиртовая емкость (неразбавленный спирт) при процедуре гидратации. Очень важно для адекватной дегидратации срезов в последней перед заключением спиртовой емкости всегда иметь чистый неразбавленный спирт – потому ее тоже надо заменять довольно часто (обычно спиртовые емкости просто сдвигают на одну позицию назад). Не рекомендуется использовать для дегидратации перед заключением препаратов ту же батарею спиртовых емкостей, что использовалась для гидратации после депарафинирования.

Ксилол, используемый для просветления должен сохранять характерный запах, быть прозрачным. Всегда следует заменить ксилол перед окраской новой партии препаратов, если он имеет мутный вид. Наиболее быстро загрязняется первая емкость ксилола, следующая за спиртом, при больших объемах материала его приходится менять практически перед окраской каждой новой партии препаратов.

Обеспечение полной гидратации препаратов

Перед окрашиванием препараты следует тщательно отмыть от остатков ксилола и спиртов и довести до воды (гидратация).

Не полностью отмытые от ксилола и спиртов препараты загрязняют раствор гематоксилина, что приводит к снижению качества красителя.

Кроме того, не отмытые капли ксилола, несмешиваемого с водой, препятствуют контакту красителей со срезом, в результате чего на срезе могут остаться плохо прокрашенные участки, соответствующие по размерам этим каплям.

Качество гематоксилина

Характеристики раствора гематоксилина следует тщательно контролировать, так как в процессе работы гематоксин значительно разбавляется водой со стекол, штативов и окисляется.

Влиять на окисление гематоксилина могут площадь поверхности емкости, в которой он хранится, продолжительность доступа кислорода во время окрашивания и температура окружающей среды.

Наиболее надежным признаком ухудшения качества гематоксилина является худшее прокрашивание ядер, снижение дифференцировки тонких ядерных структур, удлинение времени окраски – при появлении этих признаков раствор гематоксилина следует заменить на свежий.

Контроль качества окрашивания ядер

После окраски гематоксином для полного созревания следует использовать раствор Scott (щелочной заменитель водопроводной воды) или аммониевую воду (дистиллированная вода с несколькими каплями аммиака). Использование водопроводной воды, как это указано в классических руководствах, не рекомендуется, так как в наших конкретных условиях водопроводная вода далеко не всегда, как того требует протокол окраски, имеет слабощелочную реакцию, характеризуется разными показателями жесткости, часто содержит большое количество растворимых и нерастворимых примесей, влияние которых на качество окраски ни предсказать, ни нормировать не представляется возможным.

Объем подщелачивания дистиллированной воды раствором аммиака зависит от свойств местной воды. Иногда ядра клеток выглядят розовыми из-за неполного созревания. Также розовыми будут ядра в препаратах недостаточно окрашенных гематоксином, или перекрашенных эозином.

Обеспечение равномерной окраски эозином

После окраски гематоксином и дифференцировки в щелочной воде следует тщательно отмыть щелочные агенты из препарата, ибо окраска эозином происходит в кислой среде и остатки щелочи могут ее ослабить.

Неполное отмывание щелочных реагентов может привести к слабому или неравномерному окрашиванию препарата эозином, появлению на срезе потеков красителя, снижению качества красящего раствора.

Контроль pH эозина

Для оптимального окрашивания pH раствора эозина стабилизируют на значении около 5,0. Для подкисления раствора красителя используется уксусная кислота.

Повышение pH раствора эозина вызывается загрязнением щелочной водой, используемой для созревания гематоксилиновой окраски ядер. Для уменьшения нейтрализующего влияния аммиачной воды можно добавить одну дополнительную промывочную емкость с чистой дистиллированной водой или 70% этанолом перед помещением препаратов в раствор эозина.

Не следует дожидаться снижения качества окраски как повода для замены эозина.

Выбор оборудования для окраски препаратов

Для автоматической окраски парафиновых срезов используются специальные приборы – автостейнеры. Это современные роботизированные системы окрашивания срезов на предметных стеклах для выполнения всех рутинных и ряда специальных методов окрашивания. Принципиально важный результат внедрения технологий автоматизирования окрашивания микропрепаратов состоит в унификации условий окрашивания, что важно для получения сравнимых результатов, исключения лабораторных ошибок при резком увеличении производительности лаборатории.

Автостейнеры на рынке представлены моделями Leica ST5010 (Germany), Leica ST5020 (Germany), Microm HMS740 (Germany), Microm HMS760X (Germany), Sakura Prisma (Japan) и Shandon Varistain 24-4K (United Kindom).

При сравнении, в первую очередь, обращает внимание различие грузоподъемности механической лапы – у Sakura Prisma и Shandon Varistain 24-4K этот параметр в 2 раза превышает соответствующие характеристики Leica ST5010 и Microm HMS740, что соответственно отражается на общей производительности приборов.

При этом, однако, объем реагентных емкостей Sakura Prisma и Shandon Varistain 24-4K более чем на $\frac{1}{3}$ больше, что влечет за собой больший расход реагентов, и экономически оправдано только при очень больших объемах окраски микропрепаратов. При одинаковой величине загрузки (30 стекол) объем реагентных емкостей Microm HMS740 на 7% больше, чем у Leica ST5010, что отражает большую экономичность последнего, но существенно не влияет на средний расход реагентов при значительных объемах работы.

Sakura Prisma и Shandon Varistain 24-4K имеют наибольшее количество станций для реагентов и станций загрузки. Явным преимуществом Leica ST5010 и Shandon Varistain 24-4K является большее число промывочных станций.

Leica ST5010 дает возможность одновременного выполнения до 15 программ окраски до 40 шагов каждая, в то время как Microm HMS740, Sakura Prisma при меньшем количестве программ (9 и 11 соответственно) дают возможность использовать до 50 шагов на каждую программу. Shandon Varistain 24-4K характеризуется наименьшим количеством протоколов окраски (3), в каждом из которых предусмотрено всего до 24 шагов, что более чем в два раза ухудшает функциональность прибора в сравнении с аналогами.

Временная шкала (предельное программируемое время на каждый шаг программы) у Leica ST5010 составляет 22 ч 59 мин 59 сек, что в 15 раз превышает соответствующие параметры Microm HMS740 и Sakura Prisma. Это может иметь большое технологическое значение при длительных (более 1,5 ч на один шаг) процедурах обработки микропрепаратов – при использовании Microm HMS740 и Sakura Prisma в таких случаях потребуется установка более чем одной станции с одноименным реагентом, что влечет за собой существенное увеличение их расхода.

Весьма существенная техническая особенность Leica ST5010, Sakura Prisma и Shandon Varistain 24-4K – возможность объединения, посредством станции переноса, с коверслипером в единый роботизированный комплекс, что обеспечивает большую функциональность и значительно расширяет технологические возможности приборов.

АРТЕФАКТЫ ОКРАСКИ

Артефакты окраски можно разделить на две большие группы: неполное или частичное окрашивание при качественных красителях и преципитация красителей или загрязнение препаратов компонентами красителей. Неполное окрашивание в большинстве случаев выявляется в виде участков материала, лишенных окраски полностью или частично.

Неполная депарафинизация

Остатки парафина в срезах препятствуют проникновению в ткань водо- и спирторастворимых красителей, что проявляется в виде неокрашенных или недостаточно окрашенных участков препарата. Не полностью удаленный парафин может исказить окрашивание среза, снизить качество окраски («мутное ядро»).

Данный артефакт хорошо выявляется при микроскопии и может быть исправлен повторной депарафинизацией с последующим повторным окрашиванием.

Неполное окрашивание среза

Неравномерное окрашивание среза одним из красителей при сложных окрашиваниях с использованием автостейнеров может быть обусловлено недостаточным наполнением реагентных ёмкостей.

Неравномерное окрашивание среза

Неокрашенные или слабо окрашенные области на срезе могут появляться, когда остатки реагентов предыдущих этапов обработки при недостаточно тщательной отмывке переносятся со стеклом в последующие реагентные ёмкости.

Например, если при депарафинировании препаратов растворитель, оставшийся на срезе, не полностью отмывается в спирте (это возможно, если уровень спирта в реагентной ёмкости ниже уровня ксилола) или если стекла слипаются в растворителе. При последующей обработке в водных растворах красителей ксилол, который не смешивается с водой, может скапливаться на поверхности среза, ограничивая доступ красителя к ткани.

Другой пример: процедура окраски методом Shikata's orsein предполагает предварительную обработку среза перманганатом калия и щавелевой кислотой для предотвращения неспецифического окрашивания. При неполной отмывке этих реагентов orsein обесцвечивается, что снижает качество окраски.

Для предотвращения этих проблем следует тщательно соблюдать технологию обработки тканей, своевременно менять депарафинирующие жидкости, следить за уровнем реагентов в реагентных ёмкостях и тщательно отмывать стекла между этапами окраски.

Депозиты красителей

Депозиты могут быть обусловлены нерастворенными частицами красителя или его преципитацией в растворе.

Преципитация возможна при испарении растворов красителей, например, при использовании методов, предусматривающих нагревание или длительное время окрашивания. Проблема усугубляется при окраске препаратов на открытых поверхностях.

Использование стандартизованных ёмкостей для окрашивания, поддерживающих стекла в вертикальном положении, позволяет свести подобные артефакты к минимуму.

Загрязнения красящих растворов

Микроорганизмы, загрязняющие растворы красителей, нередко осаждаются на препаратах.

Во избежание этого артефакта рекомендуется своевременно менять красящие растворы или добавлять в них антибактериальные препараты, такие как тимол или метиолат. Если краситель поменять невозможно, фильтрация раствора позволит избавиться от этих загрязнений.

Загрязнение слизи

Для стандартной PAS реакции в качестве негативного контроля часто применяется человеческая слюна, являющаяся удобным, доступным и бесплатным источником диастазы. Однако, недостаточная отмывка препаратов после инкубации со слюной может привести к выраженному PAS-положительному окрашиванию остаточной слизи.

Вероятность загрязнения образца слизью можно снизить, разводя слюну водой или соевым раствором, а применение коммерческой лиофилизированной диастазы полностью решает проблему.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ОКРАСКИ

Понимание сути методики

Следует понимать, какие структуры вы хотите продемонстрировать с помощью специфической окраски.

Слепое следование методике и отсутствие понимания того, что должно получиться в итоге окрашивания, приводит к плохим результатам.

Использование положительного контроля

Следует использовать контрольные срезы, заведомо содержащие ту структуру или вещество, которые вы пытаетесь продемонстрировать.

Нельзя следовать принципу «если вещество или структура не выявляются при помощи специальной окраски на микропрепарате, значит ее там нет», ибо отрицательный результат может быть связан и с дефектами методики.

Стабильность реагентов

Следует уделять большое внимание сроку годности используемых реагентов. Некоторые реагенты или растворы красителей сохраняют свои реакционные свойства длительное время, другие чрезвычайно не стабильны и должны быть использованы сразу после приготовления, третьи используются только через некоторое время после приготовления, необходимое для их окисления (созревания).

Несоблюдение стандартных рекомендаций по срокам использования реагентов приводит к неудовлетворительным результатам окрашивания.

Соблюдение условий хранения реагентов

Некоторые реагенты должны храниться охлажденными, так как они склонны поддерживать рост грибков. Другие чувствительны к воздействию света и требуют хранения в темноте.

Нарушение условий хранения реагентов приводит к снижению качества или неудовлетворительным результатам окраски.

Соблюдение протокола

Протокол окрашивания следует четко и скрупулезно соблюдать. Получение различных результатов при использовании одного и того же протокола свидетельствует о наличии технологических дефектов.

Документирование изменений протокола

Все отступления от протокола следует тщательно документировать. Если отступления от протокола не документируются, то при получении неудовлетворительных результатов окрашивания невозможно установить их причину.

Отказ от ведения протокола недопустим, даже если вы знаете его наизусть. Следует детально документировать все шаги, особо тщательно – любые случайные или намеренные изменения протокола окраски.

Промывка препаратов

При гистохимических окрасках промывка стекол между технологическими этапами процедуры должна быть стандартизована как по времени, так и по форме исполнения, поскольку часто является причиной вариабельных результатов окрашивания.

Не следует в рамках одного протокола варьировать технику промывки от интенсивного полоскания до более спокойного.

Микроскопический контроль

Важнейшие этапы окраски рекомендуется контролировать с помощью микроскопа, при этом следует помнить, что непросветленные и непокрытые препараты в микроскопе выглядят иначе. Потому микроскопический контроль на разных этапах окраски требует наличие у лаборанта определенных навыков.

Не рекомендуется оценивать характер и степень окраски невооруженным глазом.

ИММУНОГИСТОХИМИЯ

Качество срезов

Следует уделять особое внимание качеству срезов – для иммуноморфологических исследований рекомендуется использовать тонкие, плоские, прочно закрепленные на предметном стекле срезы.

Неровные срезы, имеющие плохой контакт с предметным стеклом окрашиваются неравномерно и имеют значительное фоновое окрашивание.

Фиксация

При хорошем качестве фиксации (качественный фиксирующий раствор, оптимальная температура, pH, время) иммуногистохимия дает лучшие результаты.

Необходимо проверять образцы ткани перед проводкой для определения необходимости дополнительной фиксации.

Неудовлетворительные условия фиксации весьма существенно влияют на результаты иммуногистохимического окрашивания и могут сильно осложнить интерпретацию результатов. Выбор методов фиксации следует осуществлять в соответствии с паспортом антител.

Адгезия срезов

Категорически нельзя использовать адгезивы на основе белков (клей, крахмал, желатин), следует пользоваться предметным стеклом со специальным фабричным адгезивным покрытием (poly-L-lyzin).

Адгезивы на основе белков обильно адсорбируют антитела, что приводит к так называемому «неспецифическому окрашиванию».

Депарафинизация и распределение реагентов по срезу

Следует тщательно депарафинировать и отмывать препараты перед окрашиванием.

Реагенты на стекле необходимо распределять равномерно по поверхности среза. Это обеспечивает равномерное окрашивание и сопоставимые результаты.

Неполная депарафинизация или неравномерное распределение реагентов на поверхности среза могут быть причиной неравномерного окрашивания препаратов.

Предотвращение концентрационных градиентов

Следует равномерно распределять реагенты по поверхности среза, избегать их локального разбавления остатками воды на срезе.

Избыток остаточной воды на срезе может привести к локальному разбавлению реагентов и явиться причиной неравномерного окрашивания препаратов.

Выбор первичных антител

Выбор первичных антител следует осуществлять с учетом их чувствительности и специфичности.

Антитела одного наименования, полученные из разных клонов могут иметь разную чувствительность и специфичность, потому при выборе необходимо ориентироваться на наименование клона.

Не следует в качестве критерия выбора антител основываться только на их цене.

Изучение спецификации

Следует модифицировать протокол под каждую новую партию антител согласно прилагаемой к ним спецификации.

Производители антител часто модифицируют продукцию, что не редко влечет за собой изменение протокола окраски. Недоучет этих изменений приведет к неудовлетворительному результату окраски.

Потому всегда, при получении новой партии антител, рекомендуется внимательно ознакомиться с прилагаемой спецификацией и строго следовать рекомендациям во избежание проблем.

Демаскировка антигенов

Условия демаскировки антигена должны соответствовать спецификации первичного антитела, исследуемой ткани и фиксирующему агенту (pH, реагент, условия реакции).

Не следует использовать только один метод демаскировки в качестве стандартной пробоподготовки для всех первичных антител.

Перекрестные взаимодействия

Следует быть внимательными в отношении перекрестных взаимодействий (cross-реактивности) антител. Соответствующие сведения, как правило, указываются в спецификации.

Следует всегда быть очень внимательными в отношении необычной положительной экспрессии маркера. Интерпретировать такие находки рекомендуется с особой осторожностью, прежде всего, исключая все возможные технические дефекты.

Пероксидазный блок

При использовании пероксидазной системы детекции всегда следует блокировать эндогенную пероксидазу.

При не полностью заблокированной эндогенной пероксидазе часто выявляется неспецифическое окрашивание в эритроцитах, моноцитах, гранулоцитах и мышечных клетках.

Предотвращение фонового окрашивания

Во избежание фонового окрашивания всегда следует использовать соответствующий протеиновый блок.

Неэффективный протеиновый блок иногда может привести к диффузному фоновому окрашиванию препарата.

Системы детекции

Правильный выбор системы детекции обеспечивает четкое, специфическое окрашивание и достаточную чувствительность. Неправильный выбор системы детекции может привести к получению слабого и нечеткого окрашивания.

Промывка препаратов

Промывка стекол между технологическими этапами процедуры должна быть стандартизована как по времени, так и по форме исполнения, поскольку часто является причиной вариабельных результатов окрашивания.

Если результаты сильно варьируют в сериях с одним и тем же антителом и в сериях в различные дни – возможная причина состоит в различии техник промывки препаратов используемых разными лаборантами.

Не следует в рамках одного протокола варьировать технику промывки от интенсивного полоскания до более спокойного.

Докрашивание ядер

Докрашивание ядер гематоксилином должно обеспечивать контраст между хромогеном и фоновыми тканевыми элементами.

Для каждого хромогена следует подбирать соответствующий по цветовой контрастности и интенсивности способ докрашивания ядер.

Если докраска ядер слишком сильная – это может маскировать слабую иммуногистохимическую метку.

Контроль специфичности

Всегда следует использовать подходящие положительный и отрицательный контроли. Наличие внутреннего положительного и отрицательного контроля в исследуемом препарате также повышает уверенность в адекватности результатов окрашивания.

Не следует прибегать к контролю только тогда, когда кажется, что метод не работает. Контроли необходимо ставить в каждой серии препаратов.

Оценка результатов

При оценке исследуемых и контрольных препаратов следует четко знать какие структуры должны выявляться при использовании данного антитела. Не следует оценивать любую положительную реакцию, даже при кажущейся ее избирательности, как специфичную.

При любых сомнениях или при выявлении парадоксальных результатов, исследование следует повторить.

ГИБРИДИЗАЦИЯ IN SITU

Качество срезов

Следует уделять особое внимание качеству срезов – используйте тонкие, плоские, прочно закрепленные на предметном стекле срезы.

Неровные срезы, имеющие плохой контакт с предметным стеклом окрашиваются неравномерно и имеют значительное фоновое окрашивание.

Фиксация

Хорошее качество фиксации (качественный фиксирующий раствор, оптимальная температура, pH, время) дает лучшие результаты.

Неудовлетворительные условия фиксации влияют на результаты окрашивания и могут привести к проблемам в интерпретации результатов.

Адгезия срезов

Как и при иммуногистохимических реакциях, нельзя использовать адгезивы на основе белков (клей, крахмал, желатин), следует пользоваться предметным стеклом со специальным фабричным адгезивным покрытием (poly-L-lysin).

Адгезивы на основе белков могут блокировать «заряженную» поверхность предметного стекла. Это вызывает неполную адгезию среза и ведет к неравномерному окрашиванию препарата вследствие проникновения реагентов под срез.

Депарафинизация и распределение реагентов по срезам

Следует тщательно депарафинировать и отмывать препараты перед окрашиванием. Реагенты на стекле необходимо распределять равномерно по поверхности среза. Это обеспечивает получение сопоставимых результатов.

Неполная депарафинизация или неравномерное распределение реагентов на поверхности образца могут быть причиной неравномерного окрашивания препаратов.

Выбор зондов

Следует тщательно выбирать зонды с учетом их чувствительности и специфичности. Не следует в качестве критерия выбора зондов основываться на их цене.

Изучение спецификации

Следует модифицировать протокол под каждую новую партию зондов соответственно прилагаемой к ним спецификации. Тщательный контроль температуры и времени обеспечит наилучшие условия для гибридизации.

Производители зондов часто модифицируют продукцию, что влечет за собой изменение протокола окраски. Недоучет этих изменений приведет к неудовлетворительному результату реакции.

Оптимизация условий предварительной обработки

Следует выбирать оптимальные условия предварительной обработки в зависимости от степени фиксации и типа ткани. Использование одинаковых условий предварительной обработки для различных проб приводит к плохим результатам.

Бережное отношение к срезам

Следует тщательно фиксировать образцы и аккуратно обращаться с микропрепаратами, что предотвратит избыточное расщепление РНК эндогенными РНКазами.

При низком качестве фиксации РНК вымывается из срезов, что обуславливает низкое качество реакции.

Выбор системы детекции

Следует выбирать чувствительные системы визуализации и детекции, а также оптимизировать условия инкубации.

Если система визуализации и детекции недостаточно чувствительна – это может привести к слабому или даже отрицательному окрашиванию, несмотря на связывание зонда с образцом.

Предотвращение испарения реагентов

Поскольку при длительном времени инкубации общей проблемой является высыхание реагентов, следует предотвращать испарение раствора зонда и других реагентов во время инкубации, используя оборудование хорошего качества.

Если зонд или другие реагенты высыхают во время инкубации, чаще всего по краям, в этих областях наблюдается сильное фоновое окрашивание.

Промывка

Промывка стекол между технологическими этапами процедуры должна быть стандартизована, поскольку часто является причиной вариабельных результатов окрашивания.

Если результаты сильно варьируют в сериях с одной и той же пробой и в сериях в различные дни – возможная причина состоит в различии техник промывки препаратов используемых разными лаборантами.

Контроли

Всегда следует использовать подходящие положительный и отрицательный контроли. Наличие внутреннего положительного и отрицательного контроля в исследуемом препарате также повышает уверенность в адекватности результатов окрашивания.

Не следует прибегать к контролю только тогда, когда кажется, что метод не работает. Контроли необходимо ставить в каждой серии препаратов.

Оценка результатов

При оценке исследуемых и контрольных препаратов следует четко знать – какие структуры должны прореагировать при использовании данного зонда.

Для адекватной интерпретации результатов реакции необходимо иметь фундаментальные знания по теории и технологии процесса. Не следует оценивать любую положительную реакцию как специфичную.

АРТЕФАКТЫ СПЕЦИАЛЬНЫХ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Некоторые артефакты, описанные здесь ранее, могут встретиться и в материале, приготовленном с применением высокотехнологичных методик. Однако существует ряд специфических артефактов, связанных с особенностями методов гистохимии, иммуногистохимии и гибридизации в тканях.

Размозжение тканей

В тканевых структурах в зоне механического раздавливания может определяться дислокация метки.

Неспецифическое иммуногистохимическое окрашивание

Хорошо известной причиной неспецифического окрашивания материала при иммуногистохимическом исследовании являются эндогенная пероксидаза и кислая фосфатаза. Методы блокирования этих ферментов в тканях описаны в специализированных руководствах.

Эндогенная пероксидаза локализуется в эритроцитах и в меньшей степени в гранулоцитах свежих и фиксированных формалином тканей.

Активность кислой фосфатазы при формалиновой фиксации тканей значительно снижается, потому фоновое окрашивание кислой фосфатазы выявляется только в замороженных срезах и свежих не фиксированных цитологических препаратах.

Пигменты

Выявление антигенов в тканях при световой микроскопии определяется интенсивностью метки и локализацией антигена.

Хромоген диаминобензидин, применяемый для выявления пероксидазной метки, дает коричнево-черное, неотличимое от некоторых артефактов и эндогенных пигментов (формалиновый пигмент, экзогенные пигменты татуировок, липидогенные пигменты, меланин и псевдомеланиновые пигменты, гемосидерин, угольная пыль).

Использование негативного контроля позволит исключить ошибочную интерпретацию некоторых пигментов как позитивную иммуногистохимическую реакцию.

Некоторые пигменты могут быть удалены из тканей перед окрашиванием, а если это невозможно, стоит выбрать иной субстрат, цвет конечного продукта которого отличается от цвета эндогенных пигментов среза (красный, синий).

Эозинофильные артефакты при гибридизации *in situ*

Неспецифическая реакция эозинофилов встречается, когда используются ДНК зонды, включающие радиометки, пригодные для работы как с клетками периферической крови, так и с тканевыми образцами.

Применение карболового хромотропа блокирует неспецифическую реакцию эозинофилов, но не влияет на реакцию гибридизации специфических нуклеотидных последовательностей⁹.

Кристаллизация

Этот артефакт часто встречается при использовании солей тетразолия в стандартном методе выявления сукцинатдегидрогеназы. Метод предусматривает использование свежих нефиксированных криосрезов, фиксируемых в формалине после инкубации в растворе субстрата (натрия сукцинат), содержащего замещенную соль тетразолия (Nitro BT). Продуктом реакции является интенсивно окрашенный формазан, заключаемый в водную среду.

Тщательное промывание препарата перед заключением под покровное стекло позволит избежать кристаллизации солей тетразолия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ПОД ПОКРОВНОЕ СТЕКЛО

Дегидратация препаратов

Препараты следует полностью дегидратировать перед тем, как поместить в ксилол для просветления.

Если препараты быстро проводятся через спирты, освещение в ксилоле, загрязненном водой, приводит к появлению микроскопических капель воды на поверхности препарата.

Ксилол для просветления должен быть всегда свежий, примесь спирта и воды вызывает его помутнение – в этом случае реагент надо заменить.

Высыхание препарата

Покрывание препаратов покровными стеклами всегда следует осуществлять до того, как препарат успевает высохнуть.

Если препараты частично высыхают перед накрытием покровными стеклами, некоторые ядра клеток становятся черными, или как бы обведенными темным контуром – такие стекла надо вернуть в ксилол до полного просветления.

Кристаллизация монтирующей среды

Желательно использовать гистологическую среду высокого качества. Следует иметь в виду, что среды низкого качества при длительном хранении могут кристаллизироваться. Кристаллизованная гистологическая среда при длительном хранении может образовывать кристаллы и «поднимать» покровные стекла.

Разведение монтирующей среды ксилолом, как правило, не дает требуемого результата – через некоторое время среда под покровным стеклом все равно кристаллизуется, мутнеет.

Выбор оборудования для заключения препаратов

Для автоматического заключения окрашенных срезов используются современные роботизированные системы заключения срезов на предметных стеклах. Существует два принципиально различных технических решения приборов этого типа – заключение окрашенного среза под покровное стекло с использованием специализированных гистологических монтирующих сред (традиционное техническое решение), и заключение окрашенного среза под специальную пленку без использования монтирующих сред (совместная разработка Sakura и FujiFilm).

Коверслипперы на основе традиционной технологии заключения среза под покровное стекло на рынке представлены моделями Leica CV5030 (Germany), Microm CTM6 (Germany), Sakura Glas (Japan) и Shandon Consul Automated Coverslipper (United Kingdom).

Технология роботизированного заключения микропрепарата под покровное стекло во всех представленных приборах практически идентична, предполагает использование любых специализированных гистологических монтирующих сред и длинных покровных стекол (24x50/60 мм – так как при накрывании микропрепарата стеклом захватывается двумя присосками и при покрывании подвергается изгибанию).

Принципиальным позитивным отличием Leica CV5030 Shandon Consul и Sakura Film является наличие технической возможности конфигурации их в единый роботизированный комплекс с автостейнерами тех же производителей – при этом корзина с окрашенными стеклами автоматически переносится из автостейнера в коверслиппер и после заключения выгружаются уже готовые микропрепараты.

Microm CTM6 и Sakura Glas не снабжены роботом, потому перенос стекол из автостейнера в коверслиппер осуществляется вручную.

При планировании приобретения этих приборов необходимо предусмотреть достаточное количество дополнительных контейнеров для выгрузки готовых микропрепаратов и специализированных гистологических монтирующих сред исходя из показателей производительности лаборатории.

Кроме того, при планировании текущего материально-технического обеспечения лаборатории важно иметь в виду, что с этими приборами возможно использование только покровных стекол размером 0,17x24x50 мм и предметных стекол размером 1,0x76x26 мм. Коверслипперы очень чувствительны к изменению размеров стекол, стекла нестандартных размеров для автоматического заключения не пригодны.

Важным преимуществом Leica CV5030 является возможность использования большинства представленных на рынке корзин для стекол, тогда как приборы Microm CTM6, Sakura Glas и Shandon Consul Automated Coverslipper используют только собственные корзины оригинальной конструкции.

Технология роботизированного заключения микропрепарата под специальную полимерную пленку FujiFilm реализована только в приборах Sakura Film (Japan) и Sakura SCA (Japan).

Эти приборы отличаются высокой производительностью, экономичностью (не требуют использования покровного стекла и специализированных гистологических монтирующих сред) и технологичностью (требуют меньше технологического ухода так как исключено использование монтирующих сред и их растворителей, исключены засоры трубок и игл, исключена операция прокачки монтирующей среды при каждом запуске прибора).

Однако, при этом затратная часть работ существенно не отличается. Принципиальным позитивным отличием Sakura Film является наличие технической возможности конфигурации его в единый роботизированный комплекс с автостейнером Sakura Prisma – при этом корзина с окрашенными стеклами автоматически переносится в коверслипер и после заключения выгружаются уже готовые микропрепараты.

При всех положительных свойствах описываемых приборов все же имеется один существенный недостаток. Поверхность микропрепарата, покрытого полимерной пленкой, в отличие от покровного стекла, никогда не бывает идеально ровной, и потому никогда не обеспечивается точное соблюдение важного для качественной микроскопии расстояния от поверхности предметного стекла до поверхности пленки (0,17-0,20 мм). Это может оказаться критичным при микроскопии высокого разрешения или при микрофотографировании, особенно с использованием современных высокочувствительных микроскопических цифровых камер.

АРТЕФАКТЫ ХРАНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ

Изменения препаратов при их хранении могут не проявляться в течение длительного времени (месяцы или годы), но превращаются в неожиданную проблему при необходимости пересмотра архивного материала.

Высыхание

Появление пузырей в монтирующей среде под покровным стеклом хорошо знакомо большинству специалистов. Это происходит, если препарат, извлеченный из ксилола, успевает высохнуть перед заключением его под покровное стекло. Под покровным стеклом появляются мелкие пузырьки вокруг тканевых структур.

Высыхание среза может проявляться и изменениями прозрачности ядер клеток, которые при микроскопии выглядят более темными и теряют свои детали. Решить проблему можно, перенакрыв срез после дополнительной инкубации в ксилоле до его полного просветления.

Вода в срезе

При недостаточной дегидратации препарата, остаточная вода выявляется в виде непросветленных участков. В некоторых случаях при микроскопии вода в препаратах выявляется в виде капель. Это снижает качество препаратов и со временем приводит к выцветанию окраски.

При обнаружении воды в препарате необходимо снять покровное стекло, повторить дегидратацию спиртовыми растворами восходящих концентраций и заново заключить срез под покровное стекло.

Дефекты монтирующей среды

Некачественно приготовленная полистерол-содержащая монтирующая среда может растрескиваться или кристаллизироваться с течением времени. При этом необходимо удалить покровное стекло и дефектную монтирующую среду и перемонтировать препарат.

Для заключения срезов полистиролом лучше вообще не пользоваться — при этом никогда не получаются качественные препараты.

Выцветание препарата

При длительном хранении под прямыми солнечными лучами препараты могут выцветать.

Для обеспечения наилучшей сохранности препараты стоит перекрасить и хранить в темноте. Выцветание препарата также может быть вызвано воздействием интенсивного пучка света при микроскопии.

АРТЕФАКТЫ КОСТНОЙ И ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

Артефакты в тканях, богатых кальцием, могут быть обусловлены нарушением техники забора материала, его проводки, неполной декальцификации или дефектами микротомии.

Выпадение фрагментов кости и разломы костного матрикса

Костная ткань легко повреждается при заборе материала (методом толстоигольной биопсии, трепан-биопсии или при выпиливании фрагмента кости), что приводит к выпадению фрагмента кости и повреждению прилежащих мягких тканей. Во избежание нежелательных изменений рекомендуется брать образец из более глубоких участков кости, так как они менее подвержены травматизации.

Среди артефактов декальцифицированных костной ткани часто встречается разрушение костных балок и пластинок. Этого можно избежать, увеличив время пропитывания ткани. При заливке в эпоксидные смолы следует иметь в виду, что медленная полимеризация снижает ригидность костной ткани, а при ультрамикротомии использование алмазных ножей предпочтительнее, чем стеклянных.

Костная пыль в препарате

Фрагменты кости, заключенные в эпоксидную смолу, при недостаточной декальцификации могут содержать мелкую звездчатую костную пыль, концентрирующуюся преимущественно в области костных балок. Костная пыль хорошо окрашивается гематоксилином, но лучше выявляется методом von Kossa, при котором она окрашивается в черный цвет.

Данный артефакт, предположительно, возникает при микротомии и при увеличении толщины среза становится более выраженным. Загрязнения костной пылью встречаются в препаратах, приготовленных с использованием как стеклянных, так и алмазных ножей. Надежного способа избежать этого артефакта нет.

Повреждения ткани при декальцификации

Большинство артефактов в препаратах костей обусловлены плохой фиксацией материала, слишком длительной декальцификацией или, наоборот, неполной декальцификацией. Первые две ситуации необратимы, в то время как избыток кальция может быть удален из ткани при дополнительной обработке.

Адекватная и качественная фиксация обеспечивает достаточную защиту ткани от дегидратации при обработке в кислотах. Дегидратация тканей выражена тем сильнее, чем ткань хуже зафиксирована, но слишком долгое выдерживание образца в растворе кислоты при декальцификации способно повредить даже хорошо фиксированную ткань. Потому важно соблюдать технологию декальцификации.

Недостаточное вымывание кальция из ткани

Недостаточное вымывание кальция из ткани особенно ярко проявляется при тримминге парафинового блока. Помимо указанных ранее особенностей, необходимо помнить о повреждении мягких тканей вокруг зоны кальцификации и возможности повреждения ножа.

В том случае, если срез с такого образца все же удастся приготовить, на микропрепарате выявляются кальцификаты, интенсивно окрашивающиеся гематоксилином и повреждения прилегающих мягких тканей.

Ограничения применения парафина

Парафин, имеющий меньшую плотность по сравнению с костной тканью, не всегда адекватно поддерживает ее в тонком срезе, в результате чего в срезах появляются складки, дырки и полосы.

Для предупреждения этих артефактов обычно достаточно выдержать «лицевую» сторону парафинового блока в смягчающем агенте перед микротомией в течение 5-15 минут.

АРТЕФАКТЫ КРИОСТАТНЫХ СРЕЗОВ

Некоторые артефакты, описанные здесь ранее, могут встретиться и в криостатных срезах. Однако особенности методики предопределяют ряд артефактов, свойственных только замороженным срезам.

Повреждение тканей кристаллами льда

Повреждение тканей кристаллами льда относится к наиболее распространенным артефактам криосрезов и зачастую приводит к невозможности постановки диагноза. Визуально эти изменения проявляются в виде внутриклеточных повреждений, разрывов и вакуолизации тканей.

Артефакты заморозки возникают в результате медленной заморозки ткани, несоблюдения техники охлаждения материала или обработки слишком большого образца, который невозможно заморозить одномоментно, при этом повреждения максимально выражены в центре кусочка.

Часто качеством препаратов пренебрегают ради ускорения получения результата, например, при выполнении срочных интраоперационных исследований.

Кроме этого, повреждения ткани кристаллами льда встречаются в материале, замороженном одним большим куском (чаще всего при ампутации конечностей) для облегчения дальнейшей обработки или проведения отсроченного исследования, что нежелательно.

Растрескивание срезов

При микротомии замороженных тканей возможно образование трещин в материале, что обусловлено слишком сильным охлаждением образца или высокой его плотностью, плохим креплением блока или ножа, плохо настроенным криостатом, слишком большой толщиной среза.

Для каждой ткани характерна оптимальная температура приготовления среза. В том случае, если исключены все иные причины повреждения материала, можно считать, что образец слишком холодный. Слегка согревая образец при резке пальцем, лаборант сможет приготовить несколько срезов без трещин.

Для криостатов желательно использовать специальные лезвия, характеризующиеся низкой ригидностью металла при низких температурах. Следует соблюдать температурный режим и использовать кусочки небольшого размера, что позволит приготавливать тонкие срезы толщиной до 5 μm .

Нечеткое (мутное) окрашивание

Нечеткое окрашивание препарата наблюдается, если замороженный срез нативной ткани высыхает до фиксации. При этом в препарате тканевой рисунок стерт, особенности строения ядра и цитоплазмы не просматриваются, границы клеток нечеткие, на большем увеличении отчетливо выявляется вакуолизация цитоплазмы и нарушения строения ядра.

Прочие артефакты

Среди других артефактов, характерных для замороженных срезов стоит назвать складки материала, обусловленные низким качеством приготовления криосреза и/или нарушением техники заключения среза под покровное стекло; образование пузырей воздуха под покровным стеклом.

Применение водного бальзама для заключения под покровное стекло сложнее и чаще приводит к образованию пузырей воздуха. Прижатие покровного стекла с целью выгнать из-под него пузыри воздуха недопустимо, так как может привести к деформации ткани, раздавливанию и разрывам среза.

АРТЕФАКТЫ ПОЛУТОНКИХ СРЕЗОВ

Полимерные смолы редко применяются в рутинной гистологической практике, например, для заливки кальцифицированных тканей, но широко распространены в электронной микроскопии. Артефакты полутонких срезов часто едва различимы и их бывает трудно предотвратить.

Дефекты полимеризации эпоксидных смол

При заливке мелких тканевых образцов (малый объем блока) окончательная полимеризация эпоксидной смолы в среднем происходит в течение 16 часов при 60°C. При заливке больших кусочков (большой объем блока) этого времени часто недостаточно и для адекватной полимеризации может потребоваться до трёх дней.

Дефекты полимеризации могут быть настолько неявными, что не проявляются при микротомии, но обнаруживаются при окраске препаратов в виде фокуса «вибрационного» повреждения ткани в центральной зоне образца при удовлетворительном качестве среза на периферии.

В таких случаях часто бывает достаточно вернуть блок в термостат для завершения полимеризации не менее, чем на 24 часа при 60°C.

Дефекты полимеризации также могут быть обусловлены недостаточно полным перемешиванием компонентов эпоксидных смол и катализатора при приготовлении пропитывающей смеси. В такой ситуации дефект не устраним.

Следы тупого ножа в полутонких срезах

Для микротомии тканей, залитых в эпоксидную смолу, применяются стеклянные или алмазные ножи. Качество лезвия имеет решающее значение для приготовления качественного среза. Срезы, выполненные тупым лезвием, макроскопически в отраженном свете имеют стекловидную матовую поверхность, а срезы, сделанные острым лезвием, – блестящую, прозрачную.

Микроскопически на срезах, приготовленных тупым ножом, невозможно проследить детали тонкого строения ткани. Чаще всего этот артефакт встречается в препаратах костей, так как стеклянный нож, применяемый для приготовления срезов, быстро тупится при микротомии плотных кальцифицированных тканей.

Режущая кромка стеклянных ножей быстро оплавляется из-за аморфных свойств стекла, потому использовать стеклянные ножи лучше всего в минимальный промежуток времени после их изготовления, при этом необходимо следить за остротой режущего края и менять нож по необходимости.

Складки полутонких срезов

Появление неровностей на поверхности полутонких срезов возможно при их высушивании в результате следующих причин:

- При нагревании полутонких срезов в воде на поверхности стекла ткань, пропитанная эпоксидной смолой, расширяется сильнее, чем сама смола. В результате этого, эпоксидная смола по краю ткани ограничивает ее «набухание», что приводит к появлению складок и утолщений. Чтобы этого избежать, при заточке пирамидки перед микротомией не следует оставлять эпоксидную смолу по краям кусочка.
- Высыхание препарата при низких температурах.
- Монтирование среза на сухое или недостаточно увлажненное предметное стекло.
- Использование слишком малого количества воды, не обеспечивающего полного расправления срезов.

Неполное удаление эпоксидной смолы

В большинстве случаев для окраски полутонких используют красители, не взаимодействующие с эпоксидными смолами. При других методах окраски необходимо удалить смолу из срезов.

Возможность растворения эпоксидных смол определяется наличием эфирных мостиков, чувствительных к воздействию галогенов, потому композиты, полимеризующиеся с образованием малого количества эфирных связей плохо вымываются из ткани при использовании стандартных методик.

Увеличение доли Anhydride hardener в составе эпоксидного композита позволит увеличить количество эфирных мостиков в полимере и повысить чувствительность к растворителям.

Фоновое окрашивание акриловых срезов

Применение акриловых полимеров – эффективная методика заливки и окрашивания материала. Загрязнение акриловых эпоксидных смол метакриловой кислотой в процессе синтеза смол или распад мономера при их длительном хранении приводит к фоновому базофильному окрашиванию среза.

Чтобы избежать этого артефакта, необходимо следить за уровнем pH мономера (обычно 7.0–7.4): присутствие метакриловой кислоты приводит к падению pH ниже 7.0. Для очистки среды необходимо пропустить ее через ионообменные смолы.

АРТЕФАКТЫ ПРОЧИЕ

В этот раздел включены артефакты, причиной которых могут выступать многие факторы или те из них, причины появления которых остаются неясными.

Размытие ядра

Под «размытием ядра» подразумевается нарушение его визуализации, сглаживание структуры. Причины возникновения этого артефакта неясны и являются предметом споров специалистов на протяжении нескольких лет,^{10, 11} при этом считается, что он не может быть связан с нарушением фиксации.

Размытие ядра может иметь следующие характеристики:

- плохо определяемая ядерная мембрана;
- нарушение структуры хроматина (аморфный, мутный, окрашивающийся от бледного до интенсивного цвета);
- окраска ядра в синий цвет или обнаружение синей дымки (преобладание ярко-синего цвета над фиолетовым при соблюдении техники окрашивания);
- пятнистое распределение красителя в срезе или части его (например, когда в препаратах ядра клеток поверхностных слоев эпителия окрашены нормально, а глубоких слоев – недостаточно интенсивно);
- артефакт регистрируется только в определенной группе тканей: биоптаты желудочно-кишечного тракта (преимущественно, эндоскопические), простаты, лимфатических узлов и костного мозга, селезенки, кожи и эндометрия, чаще всего в эпителиальной и лимфатической.

Описанные изменения могут встречаться в лаборатории время от времени, появляясь без явной причины после недель или месяцев нормальной работы, обнаруживаться как в отдельных образцах из партии, так и во всех одновременно проводимых кусочках.

Среди возможных причин размытия ядра обсуждаются:

- высушивание материала перед фиксацией¹² (например, из-за помещения незафиксированного образца на сухую абсорбирующую поверхность). Чаще всего данная проблема встречается при обработке маленьких эндоскопических образцов;
 - использование ксилола, загрязненного водой, при проводке материала.
- Повторная проводка в чистых растворах дает удовлетворительный результат,¹³

- использование парафина, загрязненного формалином или спиртом.¹³

Причиной этих изменений могут быть неполадки в технологии автоматической проводки (чаще всего несвоевременная замена основных и чистящих реагентов).

- недостаточно полное пропитывание кусочка парафином при проводке, что может быть вызвано использованием слишком короткой программы, применением грязных растворов или нарушением техники обработки материала. В последнем случае повторная проводка дает удовлетворительный результат;

- пересушивание среза перед окраской;

Неполная депарафинизация перед окрашиванием материала проявляется в виде остаточных полос парафина, ухудшающих окрашивание. Ядра не полностью окрашиваются гематоксилином но могут частично окрашиваться эозином, так называемая «pink disease».^{14, 15} Увеличение времени депарафинизации и замена рабочих растворов помогут справиться с этой проблемой.

Поперечные разрывы волокон кардиомиоцитов

Причиной поперечных разрывов волокон кардиомиоцитов длительное время считалось нарушение техники вырезки материала. Однако это мнение было отвергнуто, так как при оценке эндомиокардиальных биопсий данных изменений не обнаруживается, потому причина появления поперечных разрывов волокон миокарда остается неясной.

Перинуклеарное сжатие

Сжатие хроматина с образованием ободка часто обнаруживается в клетках эритроидного ряда костного мозга, обычно в тонких (1-2 μm) препаратах, не зависит от используемого фиксатора (формалин, хлорид ртути, глутаральдегид) и заливочной среды (парафин, эпоксидная смола). Вероятнее всего, данный артефакт возникает в результате реакции ядра или цитоплазмы на проводку, в ряде случаев феномен вовсе не является техническим артефактом, а связан с ориентацией клеток параллельно плоскости предметного стекла.

АРТЕФАКТЫ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Артефакты упаковки

Следы картона в препарат могут быть обусловлены контактом непросушенных мазков с упаковочным материалом (картонные папки).

Высыхание материала до его фиксации

Техника окрашивания мазков по Раранісolaи предполагает фиксацию влажного образца. Высыхание материала до фиксации приводит к слабой интенсивности окрашивания и потери деталей клетки.

Артефакты ультрафиолетового излучения

Если материал оставляется на ночь в нефиксированном состоянии при включенной ультрафиолетовой лампе, а фиксируется и красится на следующий день, в препарате могут быть выявлены группы клеток с неконденсированным хроматином и неравномерной вакуолизацией цитоплазмы.

Загрязнение пропеллентом

Данный вид загрязнения материала встречается при использовании спреев для фиксации материала, когда в баллоне остается мало спирта (непосредственно фиксирующего ткань) и много низкокипящей жидкости (вытесняющего газа, пропеллента). Клетки приобретают темную равномерно-синюю окраску, обнаруживая мелкие гранулы, что делает препарат неинформативным. Потому применение спреев в качестве фиксаторов цитологического материала не рекомендуется.¹⁶ Для устранения этих дефектов препарат можно выдержать ночь в растворе соляной кислоты, после чего покрасить привычным способом.

Загрязнение остатками пищи

В мазке слюны иногда можно обнаружить мышечные волокна, попадающие в препарат при заборе материала из полости рта.

Загрязнения насекомыми

В некоторых мазках иногда обнаруживаются частицы насекомых, которые могут попасть на свежий мазок из окружающей среды.

Загрязнения пылью растений

Пыльца чаще всего встречается в препаратах из верхних дыхательных путей, но может быть обнаружена и в мазках из других локализаций. Для частиц пыльцы характерна полигональная симметричная форма и большой размер. Чаще всего пыльца не попадает в фокус микроскопа.

Загрязнение препарата грибами рода *Alternaria*

Род *Alternaria* – распространенные аэробные грибы, которые могут осесть на препарат на любой стадии обработки материала. Микроорганизм характеризуется разветвленным мицелием, по форме напоминает *Candida*. Во избежание загрязнения материала рекомендуется хранить его в закрытых контейнерах до окраски.

Загрязнение смазками

В мазках с шейки матки можно обнаружить лубрикант, если он использовался перед забором материала. При окраске по Раранісolaи лубрикант приобретает интенсивный синий цвет.

Загрязнение шовным материалом

В мазках из шейки матки могут быть обнаружены короткие частицы шовного материала. Шовный материал окрашивается по Раранісolaи в лиловый цвет, а в поляризованном свете обладает двойным лучепреломлением.

ЭЛЕМЕНТЫ УНИФИКАЦИИ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Унифицированная форма направления

Направление ф. 014/у, утвержденное Приказом Минздрава СССР от 04.10.1980 №1030 по многим параметрам уже не удовлетворяет современным требованиям. Наиболее важным с формальной точки зрения является несоответствие паспортной части бланка направления современным требованиям работы в системе обязательного медицинского страхования. Так, старым бланком допускается указание инициалов, а не полного имени и отчества пациента, возраста, а не даты рождения, не предусмотрены графы для указания адреса регистрации по месту жительства, наименования страховой компании, серии и номера страхового полиса ОМС. Кроме того, структура старой формы направления совершенно не приспособлена для выполнения задач унификации и автоматизации технологического процесса в патоморфологических лабораториях, а также для ведения электронных архивов и баз данных.

Потому рекомендуется использование модифицированной формы бланка направления на морфологическое исследование биопсийного (операционного) материала. Бланк имеет блочную конструкцию, состоящую из нескольких модулей. Лицевая сторона бланка предусмотрена для заполнения в клинике:

Сведения о пациенте – блок основных регистрационных данных пациента (фамилия, имя, отчество, дата рождения, адрес места жительства, место работы, паспортные данные, полис обязательного медицинского страхования).

Маркировка материала – блок основных идентификационных данных биопсийного (операционного) материала (маркировка флаконов, локализация и характер патологического процесса, количество объектов исследования).

Дополнительные клинические сведения – блок дополнительных идентификационных данных биопсийного (операционного) материала (вид биопсии, дополнительные клинические данные, задача биопсийного исследования, диагноз при направлении).

Сведения о предыдущих биопсийных исследованиях – блок дополнительных сведений о предыдущих морфологических исследованиях (учреждение, дата, регистрационный номер, краткая формулировка заключения).

Сведения о направившем учреждении – блок данных о направившем учреждении (наименование учреждения, отделения, данные о лечащем враче, подпись и личная печать врача).

Место для штампа учреждения

НАПРАВЛЕНИЕ
НА МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
БИОПСИЙНОГО (ОПЕРАЦИОННОГО) МАТЕРИАЛА
Медицинская документация, ф. 014/у, утв. Приказом МЗ СССР от 04.10.1980, № 1030 с дополнениями

СВЕДЕНИЯ О ПАЦИЕНТЕ

Дата выдачи направления: 20 г.

Персональный номер пациента в электронной базе диагностического центра:

Фамилия

Имя

Отчество

Дата рождения

число: месяц: год:

Адрес места жительства

область: район: Пол: М Ж

город: ул., д., кв.:

Место работы

район: организация:

должность:

Паспорт:

серия, номер

когда и кем выдан

ВИД ОПЛАТЫ (подчеркнуть и вписать необходимые данные)

ОМС ДМС ДОГ ПМУ

Наименование страховой компании (хоздоговорной организации):

Серия и номер полиса ОМС (полиса ДМС, другого платежного документа):

МАРКИРОВКА МАТЕРИАЛА (расшифровка маркировки флаконов или предметных стекол)

Номер флакона (стекло)	Локализация патологического процесса (орган, топика)	Характер патологического процесса (эрозия, язва, полип, пятно, узел, внешне неизменная ткань, отношение к окружающим тканям)	Кол-во объектов
1			
2			
3			
4			
5			

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

ЗАДАЧА ИССЛЕДОВАНИЯ (особые пожелания, отличные от стандарта)

ВИД БИОПСИИ (подчеркнуть)

Тканевой материал	Клеточный материал
Эндоскопическая	Экссудат, трансудат
Пункционная	Браш-биопсия
Операционная	Аспирационная
	Операционная
	Промывные воды
	Промывные воды

ДИАГНОЗ НАПРАВИВШЕГО УЧРЕЖДЕНИЯ

Код по МКБ-10 (не менее четырех знаков):

СВЕДЕНИЯ О ПРЕДЫДУЩИХ БИОПСИЙНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

УЧРЕЖДЕНИЕ	ДАТА	НОМЕР ПРОТОКОЛА	РЕЗУЛЬТАТ

СВЕДЕНИЯ О НАПРАВИВШЕМ УЧРЕЖДЕНИИ

Наименование учреждения:

Наименование отделения:

Фамилия, имя и отчество врача:

Личная подпись врача:

Телефон:

Место для личной печати врача

Наименование учреждения здравоохранения
наименование лаборатории
адрес и телефон

Дата поступления

Регистрационный номер

Окраски

Код диагноза МКБ-10

Код услуги

Количество услуг

МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ :

Количество объектов

МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ :

ЗАКЛЮЧЕНИЕ :

Код диагноза МКБ-10

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ :

РЕКОМЕНДАЦИИ :

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫПОЛНЯЛИ :

Врач

Лаборант

Консультант

МП

Подпись

Подпись

Подпись

Дата

Код

Код

Код

Гарантия конфиденциальности данных протокола подтверждается.
Первичные материалы настоящего исследования, а также все материалы, полученные из других лечебно-профилактических учреждений для пересмотра, хранятся в архиве лаборатории постоянно. Выдача первичных материалов исследований из архива в другие лечебно-профилактические учреждения для пересмотра осуществляется представителю другого ЛПУ, или пациенту, или его родственнику только при наличии официального запроса.

Оборотная сторона бланка предусмотрена для заполнения в патоморфологической лаборатории:

Сведения о патоморфологической лаборатории – блок данных о патоморфологической лаборатории, в которой производится исследование (наименование учреждения, лаборатории).

Основные регистрационные данные исследования – блок регистрационных данных об исследовании (дата поступления материала, регистрационный номер, дополнительные окраски, код диагноза, код услуги, количество услуг и объектов).

Протокол исследования – блок данных собственно морфологического исследования (макроскопическое описание, микроскопическое описание, заключение, дополнительные замечания, рекомендации, сведения о специалистах, проводивших исследование).

Централизованное обеспечение контрагентов

Для организации унификации сбора, консервации и хранения биопсийного и операционного материала следует централизованно обеспечить все сотрудничающие учреждения (отделения, кабинеты) стандартными биопсийными контейнерами с унифицированной фиксирующей жидкостью и унифицированной этикеткой.

Использованию не унифицированной посуды и фиксирующих агентов рекомендуется активно противодействовать с использованием всех возможных средств административного воздействия и профессиональных контактов.

Централизованное обеспечение биопсийными контейнерами

В лаборатории рекомендуется организовать приготовление биопсийных контейнеров для всех сотрудничающих учреждений (отделений, кабинетов). Процедура приготовления включает в себя расклейку унифицированных этикеток и расфасовку унифицированной фиксирующей жидкости.

Готовые к употреблению биопсийные контейнеры можно выдавать в сотрудничающие учреждения (отделения, кабинеты) по обменному принципу – сколько флаконов с биопсийным материалом доставлено в лабораторию, столько же чистых готовых к употреблению контейнеров направляется обратно в направившее учреждение (отделение, кабинет).

Унифицированная посуда

Для сбора биопсийного и операционного материала рекомендуется использовать специализированные пластиковые контейнеры с герметично закрывающейся

крышкой. Такие контейнеры объемом от 20 мл и более производятся серийно многими фирмами, специализирующимися на изготовлении лабораторного пластика.

Рекомендуется иметь в лаборатории необходимое количество стандартных биопсийных контейнеров различных типоразмеров, достаточное для обеспечения всех сотрудничающих учреждений (отделений, кабинетов) по обменному принципу.

Унифицированная фиксирующая жидкость

Для консервации биопсийного и операционного материала предпочтительно использовать забуференный раствор формальдегида 4% (забуференный формалин).

Не следует использовать в работе формалин, приготовленный аптечными учреждениями, ибо чаще всего обнаруживается, что в конечном растворе содержание формальдегида оказывается менее требуемых 4%, что неминуемо снижает качество фиксации, а иногда в таких растворах материал попросту подвергается полному или частичному аутолизу и поступает в лабораторию в виде, совершенно не пригодном для исследования.

Забуференный формалин можно приготавливать в лаборатории и централизованно обеспечивать им все сотрудничающие учреждения (отделения, кабинеты). Однако, организация производства готового к употреблению забуференного формалина в требуемых количествах может оказаться достаточно накладной задачей. В некоторых крупных клиниках за рубежом, например, имеются собственные установки для промышленного приготовления и фасовки забуференного формалина.

Гораздо более просто приобретать готовый стандартизованный раствор забуференного формалина, который производится серийно большинством фирм, специализирующихся на выпуске химических реактивов, в том числе имеются и российские производители, выпускающие формалин для гистологии вполне приемлемого качества. При этом остается реализовать в лаборатории лишь технологию расфасовки готового раствора формалина по биопсийным контейнерам.

Унифицированные этикетки

Каждый контейнер должен быть снабжен унифицированной этикеткой, содержащей следующие разделы: наименование фиксирующей жидкости, поле для записи, наименование производителя, каталожный номер, срок годности.

Унифицированные самоклеящиеся этикетки рекомендуется изготавливать централизованно. При этом остается реализовать в лаборатории лишь технологию наклейки этикеток на биопсийные контейнеры.

Унифицированные требования к маркировке материала

Для нанесения маркировки используется стандартное поле для записи унифицированной этикетки, в которое печатными буквами вписываются следующие данные: фамилия и инициалы пациента, внутренний номер направления, краткое наименование лечебно-профилактического учреждения, номер флакона, количество кусочков во флаконе.

Все указанные на этикетке данные должны точно соответствовать сведениям, указанным в прилагаемом направлении.

Если выполняется биопсия из нескольких участков (анатомических отделов) органа, или из нескольких патологических образований, расположенных на отдалении более 1 см друг от друга, то материал из этих образований следует помещать в разные флаконы с соответствующей маркировкой.

Рекомендации о порядке присвоения внутренних номеров

Рекомендуется донести до всех сотрудничающих учреждений (отделений, кабинетов) простые рекомендации о порядке присвоения внутренних номеров для биопсийного и операционного материала, направленные на исключение случаев ошибок идентификации материала, поступившего в лабораторию.

При наличии нескольких кабинетов, в которых выполняются биопсии, следует принять меры для обеспечения уникальности нумерации материала – можно, например, использовать единый для всех кабинетов регистрационный журнал, или ввести идентификатор (буквенный или цифровой), проставляемый вначале регистрационного номера. Не следует в каждом кабинете иметь свою отдельную нумерацию – при этом в одном транспортировочном контейнере могут одновременно оказаться одинаково пронумерованные материалы из разных кабинетов (если материал из разных кабинетов для транспортировки в лабораторию собирается в один транспортировочный контейнер), что затруднит их идентификацию.

Не следует каждый новый рабочий день (каждую смену) начинать нумерацию материалов с единицы – при этом в одном транспортировочном контейнере могут одновременно оказаться одинаково пронумерованные материалы (если материал перед транспортировкой в лабораторию накапливается в течение нескольких дней), что затруднит их идентификацию.

Следует организовать сквозную нумерацию материала, действующую в течение достаточно продолжительного периода времени, например, в течение календарного года.

Кроме регистрационного номера маркировка материала обязательно должна содержать фамилию и инициалы пациента и краткое наименование лечебно-профилактического учреждения – полное совпадение этих трех параметров маловероятно, что является дополнительной гарантией от путаницы материала.

Унифицированная процедура забора материала

Рекомендуется донести до всех сотрудничающих учреждений (отделений, кабинетов) простые рекомендации о процедуре забора материала, направленные на исключение случаев типичных ошибок взятия, консервации и маркировки материала.

Следует уведомить сотрудничающие учреждения (отделения, кабинеты) о том, что подготовка контейнеров (расфасовка фиксирующей жидкости и наклеивание этикеток) выполняется в патоморфологической лаборатории централизованно. В лечебно-профилактические учреждения поступают герметично закрытые контейнеры, уже содержащие фиксирующую жидкость и имеющие наклеенную этикетку.

Использование неунифицированных контейнеров (флаконы из-под медикаментов, детского питания и проч.) категорически не допускается.

Использование неунифицированных фиксирующих жидкостей (спирт и др.), равно как и формалина, приготовленного в других учреждениях (аптеки и др.), а также иных способов фиксации категорически не допускается.

Контейнеры не являются одноразовыми, после каждого использования подвергаются специальной обработке и затем используются повторно.

В централизованной окружной лаборатории патоморфологии и цитологии ведется ежедневный учет выданных в лечебно-профилактические учреждения контейнеров. Возврат новых (готовых к повторному использованию) контейнеров в лечебно-профилактические учреждения осуществляется по обменному принципу.

Тканевой материал фиксируется немедленно по иссечении путем погружения в специальный фиксирующий раствор.

Для наилучшей фиксации следует иметь в виду, что объем фиксирующей жидкости должен не менее чем в 20 раз превышать объем погруженной в нее ткани. Следует обратить особое внимание персонала сотрудничающих учреждений (отделений, кабинетов) на это и вытекающие из этого требования правила подбора контейнеров, соответствующих по объему биопсийному или операционному материалу из расчета 1:20.

Рекомендуется провести тренинги с сотрудниками сотрудничающих учреждений по стандартной последовательности действий медицинского персонала при взятии материала на морфологическое исследование. Эта последовательность проста, понятна и должна быть отработана до автоматизма, как любая иная стандартная медицинская манипуляция.

Унифицированная последовательность действий

Стандартная последовательность действий медицинского персонала при взятии, консервации и маркировки биопсийного и операционного материала включает в себя следующие операции: выбрать контейнер подходящего типа, открыть

контейнер, погрузить биопсийный материал в фиксирующую жидкость, плотно завинтить крышку контейнера, произвести маркировку контейнера, заполнить направление установленной формы, сверить данные маркировки контейнера с данными направления, хранить плотно закрытый контейнер до приезда курьера.

Любым манипуляциям с биопсийным и операционным материалом, помимо рекомендованных выше, необходимо активно противодействовать с использованием всех возможных средств административного воздействия и профессиональных контактов.

Ни при каких обстоятельствах не следует соглашаться на выполнение дополнительных разрезов на макропрепарате без участия врача-патологоанатома – любые такие действия могут значительно исказить первоначальную картину патологического процесса, синтопические взаимоотношений органов и тканей, и повлечь за собой неверную или ошибочную интерпретацию значимой для диагноза информации.

Унифицированные правила хранения материала

Хранение материала, помещенного в фиксирующую жидкость, осуществляется при комнатной температуре.

Дополнительное охлаждение, тем более – замораживание, как нефиксированного, так и фиксированного материала не допускается категорически.

При отсутствии возможности доставить материал в лабораторию в течение 1 суток, на следующий день фиксирующую смесь из контейнеров с материалом следует аккуратно слить (при этом не потерять кусочки) и залить свежим фиксирующим раствором.

Если размеры кусочков ткани не превышают 10 мм в наибольшем диаметре, то срок хранения материала в чистом фиксирующем растворе до доставки в лабораторию не должен превышать 5-7 дней.

Если размеры кусочков (фрагментов органов, тканей) превышают 10 мм. В наибольшем диаметре – такой материал должен быть доставлен в лабораторию в максимально короткий срок.

Стандартизованные реагенты

Использование готовых к употреблению стандартизованных парафиновых смесей и растворов красителей позволяет унифицировать методы гистологической обработки тканей, обеспечить получение стабильно воспроизводимого и качественного результата, высвободить рабочее время лаборантов, создать условия для повышения производительности труда и увеличения объемов выполняемой работы.

Разовые расходные материалы

Использование разовых расходных материалов (гистологические кассеты, заливочные кольца, микротомные ножи) позволяет унифицировать методы гистологической обработки тканей, обеспечить получение стабильно воспроизводимого и качественного результата, высвободить рабочее время лаборантов, создать условия для повышения производительности труда и увеличения объемов выполняемой работы.

Автоматизация лабораторных технологий

Современное гистологическое оборудование обладает рядом технических и конструктивных особенностей, непосредственно ориентированных на снижение трудозатрат при выполнении исследований.

Современные тканевые процессоры снабжены не только большой ретортой, вмещающей до 300 гистологических кассет, но и функцией автоматической подстройки программы проводки к установленному времени окончания рабочего цикла, функцией механизированной откачки/закачки реагентных емкостей и другими полезными функциями – такими как автоматическая проверка объема и срока годности реагентов.

Заливочные станции могут быть запрограммированы на включение и выход в рабочий режим к указанному времени, а удобная модульная конструкция рабочей зоны существенно экономит затраты времени непосредственно во время процедуры заливки.

Непроизводительные технологические операции до минимума сокращены при работе на полностью автоматизированных ротационных микротоме и автостейнерах.

Все виды гистологического лабораторного оборудования требуют минимального времени для калибровки (не более 1 мин.) перед началом работы, а их технологическая готовность наступает либо немедленно после запуска (микротомы, автостейнеры), либо лимитируется временем, необходимым для разогрева парафиновых емкостей (тканевые процессоры, заливочные станции).

Тканевые процессоры и автостейнеры обеспечивают достаточную продолжительность так называемого walk-away time – то есть длительности автономной работы аппарата без участия оператора, что важно для разумной организации технологического процесса – в это время лаборант может выполнять другие необходимые работы.

При возникновении технологических ошибок все приборы подают звуковой и световой сигналы, и вновь выводятся в рабочий режим с помощью простых и непродолжительных операций. При внештатных остановках приборов (например, при обесточивании сети электроснабжения) аппараты не требуют переза-

пуска, и при восстановлении питания действуют далее в соответствии с прерванной программой.

Все вышеперечисленные технические особенности приборов позволяют существенно сократить трудозатраты и значительно, на круг более чем в 5 раз, повысить производительность труда и, при определенных условиях, получить весьма ощутимый экономический эффект.

Комплексные технологические решения

Комплексные технологические решения оснащения патоморфологических лабораторий предусматривают не только автоматизацию отдельных трудоемких этапов работы, но и создание единой технологической цепочки от момента поступления материала в лабораторию до выдачи результата исследования и архивирования данных. По сути дела это – вариант лабораторной информационной системы, сконструированной специально под задачи патоморфологической лаборатории.

Система должна обеспечивать функции регистрации, штрих-кодирования и динамического сопровождения материала на всех этапах технологического процесса, а также архивирование данных и формирование отчетов.

Существует несколько принципиально различных технических и программных решений таких систем, их использование в российском здравоохранении только началось. Сложность состоит в том, что ни к одной лаборатории не применима некая стандартная разработка, любая система такого рода требует серьезной доработки и адаптации на месте, к конкретным условиям, техническому оснащению и технологическим особенностям данной лаборатории.

Потому вряд ли мы увидим когда-либо две одинаковые роботизированные системы, как бы широко они ни были распространены, и до появления адекватных сравнительных оценок различных вариантов этих систем, а тем более до формирования неких стандартов, потребуется некоторое время.

ПРИЕМ И РЕГИСТРАЦИЯ МАТЕРИАЛА

Прием материала и контроль его маркировки осуществляется в целях проверки полноты и качества за оформления направлений, соответствия данных направлений маркировке материала. Если доставка материалы осуществляется медицинским работником направившего лечебно-профилактического учреждения (отделения, кабинета) – прием материала осуществляется в его присутствии.

Регистрация заключается в присвоении биоматериалу уникального регистрационного номера. Регистрационный номер является основным идентификатором биологического материала в патоморфологической лаборатории, и используется для маркировки всех записей и первичных материалов морфологического исследования. Регистрационный номер является системообразующим параметром технологического процесса в любой патоморфологической лаборатории, он должен быть уникальным и формироваться исходя из четкого алгоритма, ясного для всех работников данной лаборатории.

Унифицированная процедура приема материала

1. Извлечь из транспортировочного контейнера все флаконы с биоматериалом и расставить их на специальном столе в порядке возрастания регистрационного номера, присвоенного в лечебно-профилактическом учреждении или, в отсутствие регистрационных номеров, по фамилиям пациентов.
2. Извлечь из транспортировочного контейнера направления и разложить их в порядке возрастания регистрационного номера, присвоенного в лечебно-профилактическом учреждении или, в отсутствие регистрационных номеров, по фамилиям пациентов.
3. Проверить – ко всем ли присланным направлениям имеются флаконы с биоматериалом, и ко всем ли присланным флаконам с биоматериалом имеются направления.
4. Сверить записи в направлениях с маркировкой флаконов:
 - фамилия и инициалы пациента на этикетке флакона должны соответствовать фамилии, имени и отчеству пациента на направлении;

- наименование лечебно-профилактического учреждения на этикетке флакона должно соответствовать штампу лечебно-профилактического учреждения в направлении;
- номера флаконов и количество кусочков на этикетке флакона должны соответствовать сведениям о маркировке материала в направлении.

5. Регистрационный номер биоматериала (в случае его наличия) на направлении и на этикетке флаконов должен совпадать.
6. В случаях выявления дефектов маркировки материала патоморфологическая лаборатория имеет право:
 - отказать в приеме материала на исследование и отправить его на переоформление в направившее лечебно-профилактическое учреждение (отделение, кабинет);
 - принять уточнения по оформлению направления и маркировке биоматериала по телефону.
7. Поступивший в патоморфологическую лабораторию биоматериал регистрируется в специальном журнале:

Наименование лаборатории
адрес, телефон

ЖУРНАЛ ПРИЕМА БИОПСИЙНОГО (ОПЕРАЦИОННОГО) МАТЕРИАЛА

Дата	Время	Наименование ЛПУ	Фамилия, инициалы пациента	Номер флакона	Кол-во кусочков	Сдал	Принял

8. В случаях выявления дефектов оформления направлений в части полноты и разборчивости заполнения требуемых граф патоморфологическая лаборатория имеет право востребовать уточнения по телефону.
9. Прием материала на цитологические исследования (мазки) осуществляется в том же порядке (см. пп. 1-8).

Выбор системы формирования регистрационных номеров

1. Формат регистрационного номера

- Сквозная нумерация случаев (пациентов, направлений)

При данном формате регистрационного номера основной идентификатор всегда соответствует конкретной цифре, является неделимым, уникальным для данного случая (пациента, направления) и легко учитываемым. Такой формат регистрационного номера удобен при любых формах унифицированной ручной и, тем более, машинной обработки направлений (направление = номер). Основной идентификатор не зависит от количества вырезанных объектов. Особенно удобен в крупных лабораториях, практикующих отдельную технологическую обработку различных типов биопсийного и операционного материала.

При данном формате регистрационного номера основной идентификатор всегда соответствует количеству обследованных пациентов, что при работе в системе ОМС соответствует записям в реестрах услуг. Перспективна при полном переходе здравоохранения на финансирование и взаиморасчеты по законченному случаю. Относительное неудобство составляет необходимость организации отдельного суммирования количества объектов и выполненных исследований.

- Сквозная нумерация кусочков (объектов исследования)

При данном формате регистрационного номера основной идентификатор никогда не является конкретной цифрой, а представляет собой некий диапазон цифр, всегда соответствующий количеству объектов, относящихся к данному случаю, что при работе в системе ОМС соответствует количеству услуг (объект = услуга). Относительное неудобство составляет необходимость организации отдельного суммирования числа обследованных пациентов и выполненных исследований.

2. Система нумерации

- Сквозная нумерация в течение всего срока существования лаборатории

При данной системе регистрации основной идентификатор всегда соответствует конкретной цифре, является неделимым, уникальным для данного случая (пациента, направления) и легко учитываемым.

- Сквозная нумерация в пределах определенного периода (год, пятилетка и др.)

При данной системе регистрации для обеспечения уникальности регистрационного номера к основному идентификатору требуется добавление префикса (буква, цифра), указывающего на выбранный период.

3. Дополнительные идентификаторы

- Дополнительные идентификаторы можно использовать для маркировки различных второстепенных признаков – таких как тип биологического материала, направившее учреждение, метод окраски и прочие параметры, удобные и принятые при организации технологического процесса в данной лаборатории.
- В качестве дополнительных идентификаторов можно использовать цветные заливочные кассеты, предметные стекла с цветным полем для записи, штрихкодирование и прочие метки.

Основные требования к регистрации материала

1. Регистрация биологического материала, поступившего в патоморфологическую лабораторию, производится в специальном регистрационном журнале.
2. Уникальный регистрационный номер проставляется на направлении одновременно с записью в регистрационном журнале.
3. Уникальный регистрационный номер проставляется на всех первичных материалах исследования – парафиновых блоках (заливочных кассетах при заливке) и микропрепаратах (предметных стеклах при микротомии).
4. Для нанесения регистрационного номера на заливочных кассетах и предметных стеклах используются простые графитовые карандаши или специальные гистологические принтеры с несмываемой химически стойкой краской.

Наименование лаборатории
адрес, телефон

ЖУРНАЛ РЕГИСТРАЦИИ
БИОПСИЙНОГО (ОПЕРАЦИОННОГО) МАТЕРИАЛА

Дата поступления	Регистрационный номер	Наименование направившего ЛПУ (отделения, кабинета)	Фамилия, инициалы пациента	Дата рождения	Кол-во кусочков	Дата заключения (ответа)	Дата выдачи

5. Регистрационный номер на заливочных кассетах и предметных стеклах должен наноситься четко и ясно, без исправлений и помарок.
6. Регистрационный номер на предметном стекле должен четко соответствовать регистрационному номеру блока, с которого изготовлен данный микропрепарат.
7. Регистрация цитологического материала осуществляется в том же порядке. Целесообразно цитологический материал регистрировать отдельно от гистологического с использованием отличительных дополнительных идентификаторов.

УКАЗАТЕЛЬ

Автоматизация лабораторных технологий, 94

Адгезия срезов. 61, 65

Артефакты заливки, 38

Артефакты замороженных срезов, 77

Артефакты костной и хрящевой ткани, 75

Артефакты микротомии, 44

Артефакты окраски, 57

Артефакты полутонких срезов, 79

Артефакты префиксационные, 16

Артефакты проводки, 33

Артефакты специальных гистологических методов, 68

Артефакты ультрафиолетового излучения, 90

Артефакты упаковки, 90

Артефакты фиксации, 25

Артефакты хранения препаратов, 73

Артефакты цитологических препаратов, 84

Бережное обращение с тканевыми образцами, 11

Включения желатиновые, 17

Включения целлюлозы, 17

Вода, 47

Вода в срезе, 73

Выбор срезов, 49

Вымывание растворимых веществ при проводке, 33

Выпадение фрагментов и разломы костной ткани, 75

Вырезка, 12

Высушивание образцов при проводке, 34

Высушивание срезов, 51

Высыхание микропрепаратов, 73

Высыхание образца, 7

Выцветание препарата, 74

Гематоксилин, 54

Гибридизация in situ, 65

Декальфикация, 76

Демаскировка антигенов, 62

Депозиты красителей, 58

Дефекты монтирующей среды, 73

Дефекты полимеризации эпоксидных смол, 79

Дислокация метки, 68

Докрашивание ядер, 64

Загрязнение крахмалом, 17
Загрязнение образца, 13
Загрязнение образца другим образцом, 20
Загрязнение остатками пищи, 85
Загрязнение препарата грибами, 85
Загрязнение пропеллентом, 84
Загрязнение слизью, 58
Загрязнение смазками, 85
Загрязнение срезов при их расправлении, 48
Загрязнение шовным материалом, 16, 84
Загрязнения адгезивами, 45
Загрязнения красящих растворов, 58
Загрязнения насекомыми, 85
Загрязнения прочие, 46
Загрязнения пылью растений, 85
Загрязнения срезов фрагментами плоского эпителия, 46
Заключение препаратов под покровное стекло, 70
Заливка, 35
Зонды, 66
Иммуногистохимия, 61
Испарение реагентов, 67
Кассеты гистологические, 14
Качество срезов. 61,65
Комплексные технологические решения, 95
Контроль качества окрашивания ядер, 54
Контроль качества реагентов, 29
Контроль специфичности, 64
Концентрационные градиенты, 62
Костная пыль в препарате, 75
Кристаллизация, 69
Кристаллизация монтирующей среды, 70
Лезвия микротомные, 40
Маркировка кассет, 14
Маркировка образцов, 8
Микротомия, 40
Нагревание образца, 7
Недостаточная дегидратация при проводке, 34
Недостаточное отмывание формалина при проводке, 34
Некроз, обусловленный применением раствора Monsel, 18
Неполное удаление эпоксидной смолы, 80
Оборудование для заключения препаратов, 71
Оборудование для заливки, 36
Оборудование для микротомии, 42
Оборудование для окраски, 55
Оборудование для проводки, 30
Окраска обзорная. 52-56
Окраски специальные. 59-60

Окрашивание неполное, 57
Окрашивание неравномерное, 57
Окрашивание неспецифическое, 68
Окрашивание нечеткое (мутное), 78
Окрашивание при маркировке куска, 19
Окрашивание фоновое, 63
Ореол вокруг кусочка в блоке, 39
Ориентация образца, 35
Отклеивание срезов, 50
Охлаждение блоков, 41
Охлаждение образца, 8
Первичные антитела, 62
Перегрев образцов при проводке, 34
Перекрестные взаимодействия, 63
Переполнение кассеты, 14
Переполнение формочки парафином, 36
Перерастяжение срезов, 49
Перинуклеарное сжатие, 83
Пероксидазный блок, 63
Пигменты, 68
Повреждение материала термическое, 16
Повреждение образца, 13
Повреждение образца механическое, 7
Повреждение образца химическое, 8
Повреждение срезов, 49
Повреждение тканей кристаллами льда, 77
Повреждения вибрационные, 45
Повреждения низкими температурами, 20
Повреждения термические, 38
Повреждения ткани катетером, 18
Подбор размеров формочек, 38
Подрезка блоков, 40
Положительный контроль, 59, 64
Поперечные разрывы волокон кардиомиоцитов, 83
Последствия грубой подрезки, 45
Посмертные изменения, 19
Предотвращение механических повреждений образцов, 35
Предотвращение сильного нагрева инструментов, 35
Преждевременное застывание парафина, 39
Прилегание кусочка к поверхности реза, 39
Проверка температуры парафина, 36
Проводка, 27
Программы проводки, 27
Продолжительность сушки, 51
Прокладки гистологические, 14
Промывка препаратов, 63
Пузырьки воздуха под срезом, 50

Размер вырезаемых образцов, 14
Размещение образцов в заливочных формах, 35
Размещение образцов в кассетах, 14
Размножение тканей. 18, 68
Размытие ядра, 82
Разовые расходные материалы, 94
Расправление срезов. 47-50
Распределение реагентов по срезу, 61
Растрескивание срезов, 77
Реагенты для проводки. 28-30
Рекомендации о порядке присвоения внутренних номеров, 91
Ртутный осадок, 26
Сбор и транспортировка образцов, 7
Сдавление биопсийными прокладками, 19
Системы детекции. 63, 66
Складки полутонких срезов, 80
Складки срезов, 46
Скорость реза, 41
Следы от ножа, 44
Следы тупого ножа в полутонких срезах, 79
Смещение тканевых компонентов в срезе, 44
Стабильность реагентов, 59
Стандартизованные реагенты, 93
Стекло предметное, 47
Температура водяной бани, 49
Температура сушки, 51
Транспортировка материала, 10
Угол наклона ножа, 40
Удаление воды перед сушкой, 51
Укорочение процедуры проводки, 33
Унификация гистологической технологии, 86
Унифицированная последовательность действий, 92
Унифицированная посуда, 89
Унифицированная процедура забора материала, 92
Унифицированная фиксирующая жидкость, 90
Унифицированное направление, 86
Унифицированные правила хранения материала, 93
Унифицированные требования к маркировке, 91
Унифицированные этикетки, 90
Условия хранения реагентов, 59
Фиксация. 10, 22-24, 25-26, 61, 65
Фиксация дополнительная, 28
Фиксация неполная, 26
Фиксация неравномерная, 25
Фиксация образцов, полученных при пункционной биопсии, 10
Фиксация предварительная, 12
Фоновое окрашивание акриловых срезов, 80

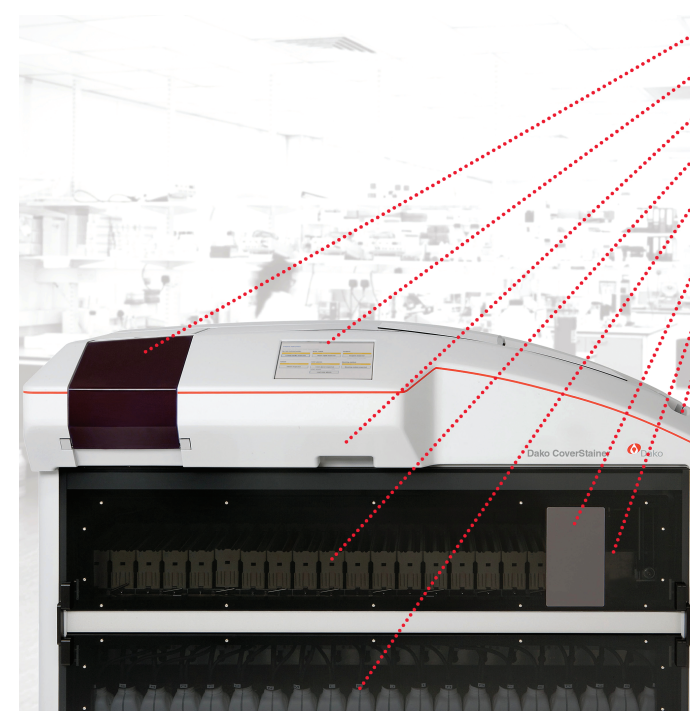
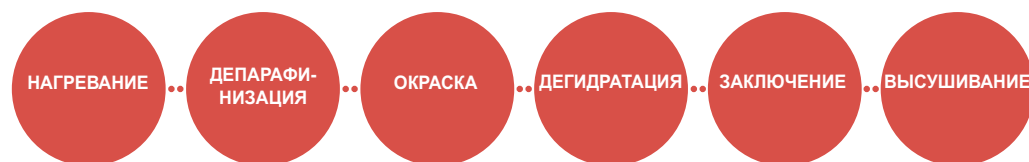
Форма вырезаемых образцов, 13
Формлиновый пигмент, 25
Формочки заливочные, 35
Холодовое повреждение блока, 41
Экзогенные пигментации, 18
Эозин. 54-55
Эозинофильные артефакты, 69
Эффект жалюзи, 44

ЛИТЕРАТУРА

1. Wallington EA Artifacts in tissue sections // Med Lab Sci. – 1979. – 36. – P. 3-61.
2. Thompson SW, Luna LG An atlas of artifacts. – Springfield: Charles C Thomas, – 1978.
3. Davis JR, Steinbronn KK, Graham AR, Dawson BV Effects of Monsel's solution in uterine cervix // Am Journal of Clin Pathol. – 1984. – 82. – P. 332-335.
4. Schlosshauer PW, Chen W, Chanderdatt D, Antonio LB Monsel's artifacts in gynecologic biopsies: a simple remedy // The Journal of Histology. – 2005. – 28. – P. 161-162.
5. Raife T, Jandas SK Intracellular crystalline material in visceral adipose material: "rediscovery" of a common artifact // The Journal of Histotechnology. – 1993. – 16. – P. 69-70.
6. Kobayashi H, Machovic D, Bauer TW Interpreting and histologic artifacts in hard-tissue research // The Journal of Histotechnology. – 2006. – 29. – P. 223-228.
7. Lee H, Neville K Handbook of epoxy resins. – New York: McGraw Hill, 1957.
8. Cook SF, Erza-Cohn HE A comparison of method for decalcifying bone // Journal Histichem Cytochem. – 1962. – 10. – P. 560-563.
9. Patterson S, Gross J, Webster ADB DNA probes bind non-specifically to eosinophis during in situ hybridization but does not inhibit hybridization to specific nucleotide sequences // Journal Virol Methods. – 1989. – 23. – P.105-109.
10. Luna LG Questions in search of an answer (Question 4) // HistoLogic. – 1989. – P.16.
11. Dayman ME Response to questions in search of an answer // HistoLogic. – 1989. – P.56-57
12. Grizzle WE The effect of tissue processing variables other then fixation on histochemical staining and immunohistochemical detection of antigens // The Journal of Histotechnology. – 2001. – 24. – P.213-219.
13. Wynnchuk M An artifact of H&E staining: The problem and its solution // The Journal of Histotechnology. – 1990. – 13. – P.193-198.
14. Drury RAB, Wallington EA Carleton's histological technique. – Oxford: Oxford University Press, 1980.
15. Foalain EO, Hunter MB, Byrne JM, Kelehan P, Lambkin HA, Byrne HJ, Lyng FM Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents // Journal of Histochemistry and Cytochemistry. – 2005. – 53. – P.121-129.
16. Wied GL, Keebler CM, Koss LG, Patten SF, Rosenthal DL (editors) Compendium of diagnostic cytology. – Chicago: Tutorials of Cytology, 1992.
17. Rolls GO, Farmer NJ, Hall JB (editors) Artifacts in Histological and Cytological Preparations / Leica Microsystems, 2008. – 106 p.
18. Rolls GO et al (editors) 101 Steps to Better Histology / Leica Microsystems, 2008. – 121 p.
19. Lillie RD Histipathologic Technic and Practical Histochemistry. – New York: McGraw-Hill Book Company, 1965. – 645 p.



Система гистологического окрашивания Dako CoverStainer

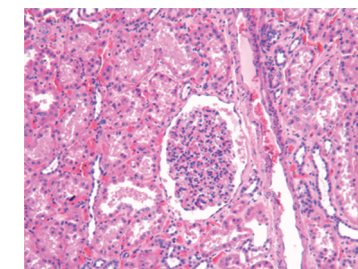
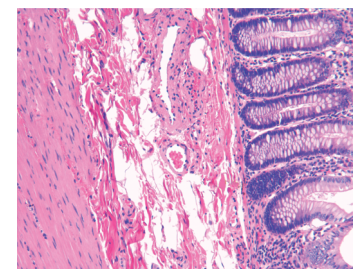


- Встроенный модуль заключения под покровное стекло
- Сенсорный дисплей для управления и контроля
- Модуль высушивания препаратов
- 36 станций для реагентов в 18 емкостях (по 2 станции на емкость)
- емкости с реагентами
- Желоб для загрузки штативов с препаратами
- Нагревательная камера для подогрева 120 препаратов одновременно
- Отсек выгрузки препаратов по мере их готовности

Реагенты
поставляются
в готовом виде



Высококачественная воспроизводимость окрашивания:



Тел./факс:
+7 (495) 921-35-78
e-mail: ab@amteo.ru
www.amteo.ru

ИПО «У Никитских ворот»
121069, г. Москва, ул. Большая Никитская д. 50/5 (тел. 495-2906719)

Подписано к печати	10.03.2011	Формат	70 x 100 1/16
Заказ	2903	Печ. л.	6,75
Тираж	3000 экз.	Усл. печ. л.	8,775
Сдано в набор	24.01.2011	Уч.-изд. л.	4,45
Гарнитура	Times	Бумага	офсетная 80 г/м²
Оформление и верстка	ИПО «У Никитских ворот»	Печать	офсетная



ОСНОВЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ КАЧЕСТВА В ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ТЕХНИКЕ

© П.Г. Мальков, Г.А. Франк, Н.В. Данилова, Л.В. Москвина, Л.А. Завалишина