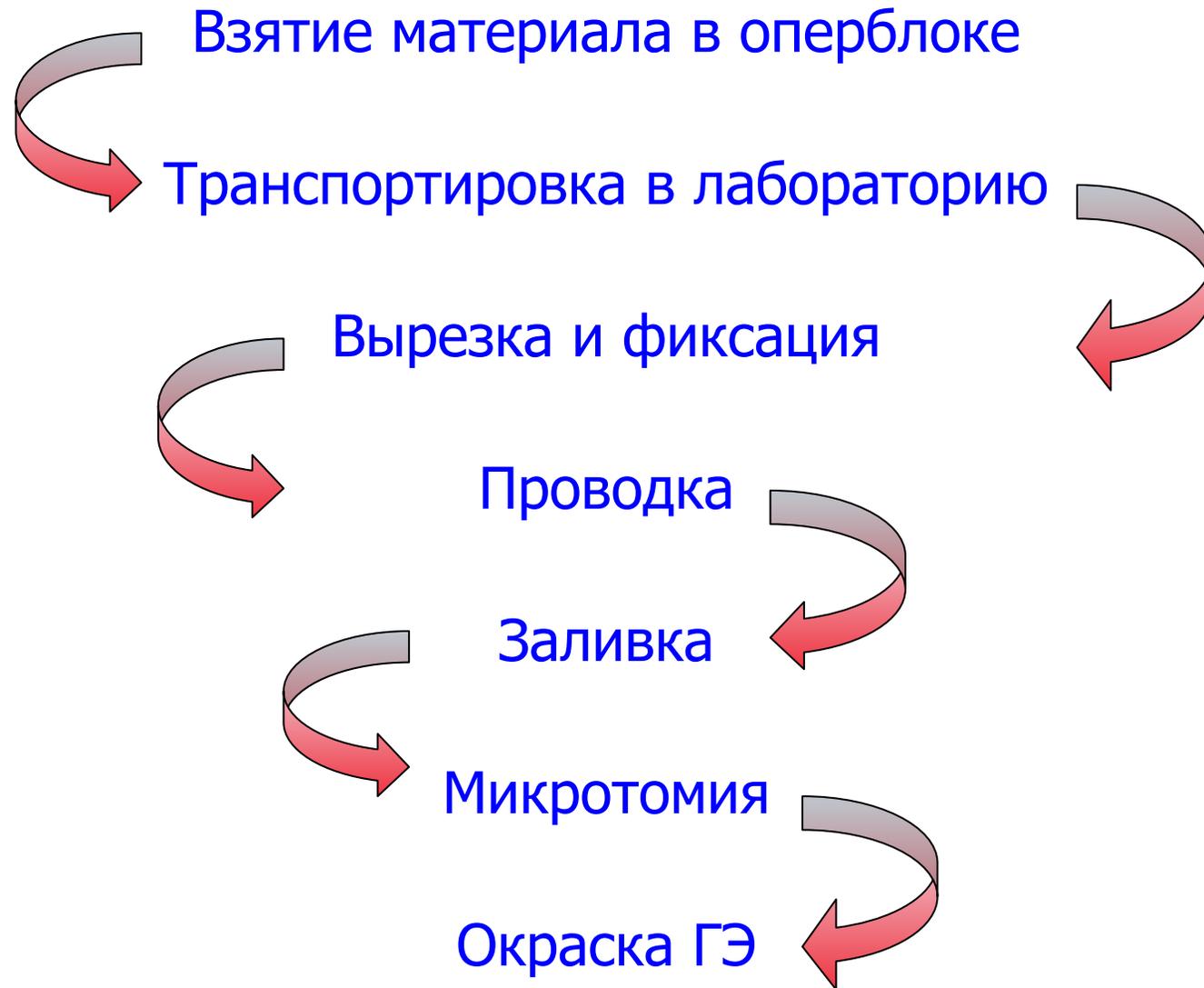


Преаналитический этап подготовки материала для ИГХ

Пешков М.В.
Патолого-анатомическое бюро г. Таганрог
2020



Основные этапы гистологического исследования



Взятие материала в операционном блоке



Максимально быстрое погружение в фиксатор

Фиксация в 10% нейтральном забуференном формалине

* Фиксация отдельного образца в 70% этаноле или Карнуа для молекулярного тестирования

* Сохранение в холоде и упаковка материала в вакуумные пакеты с соблюдением температурного режима.



Транспортировка материала в лабораторию



- Максимально быстрая доставка (формалин не проникает глубже 1 см от поверхности)
- При упаковке в вакууме соблюдение температурного режима (максимум +4°C)
- Четко и правильно заполненный бланк направления и маркировка контейнера с образцом



Вырезка и фиксация

- Выполняется только патологом
- Отсчет времени фиксации начинается с момента вырезки
- Кассету не заполнять более 75% объема
- До 2 мм в диаметре – мелкие образцы
- До 2.5 x 2.5 x 0.3 см – обычные образцы – лимитируются объемом кассеты (не более 75% объема)



Разделение потоков

- Эндоскопические и любые мелкие биоптаты до 2 мм – короткое расписание
- Мелкие биоптаты должны быть информативными
- Хирургические образцы до 3 мм – длинное расписание
- Любые трудные образцы должны проводиться по обычному расписанию с отличным результатом



Правила адекватной фиксации

2-3 мм

Толщина кусочков
ткани для проводки

10% NBF

10% нейтральный
забуференный
формалин
(одна смена, новый)

24 часа

При комнатной
температуре
Или 18 часов
при 37°C

20:1

Соотношение
объемов
фиксатора и ткани



Уровни пропитывания и связывания формалина

Время в НВФ (часы)	Пропитывание как % толщины					Уровень связывания	
	Толщина ткани (мм)					% равновесия	
	1	2	3	4	5	25°C	37°C
1	100	66	44	33	26	5	10
2		94	62	47	37	10	21
4			88	66	53	20	40
8				93	75	39	68
12					91	57	87
18						81	100
24						100	
100% при 25°C за	0,6 ч	2,3 ч	5,2 ч	9,2 ч	14,3 ч		
100% при 37°C за	0,3 ч	1,3 ч	3,0 ч	5,3 ч	8,2 ч		
100% при 42°C за	0,3 ч	1,0 ч	2,3 ч	4,0 ч	6,2 ч		



R.J. Buesa, M.V. Peshkov / Annals of Diagnostic Pathology 16 (2012) 202–209

Фиксация кусочка ткани толщиной 3 мм



Для объектов толщиной 3 мм	Температура			
	20°C	25°C	37°C	42°C
100% пропитается за	7,1 ч	5,2 ч	3 ч	2,3 ч
100% формалина свяжется с белками за	33 ч	24 ч	18 ч	10 ч
50% белков перекрестно свяжутся за	66 ч	48 ч	36 ч	20 ч
100% белков перекрестно свяжутся за	132 ч	96 ч	72 ч	40 ч

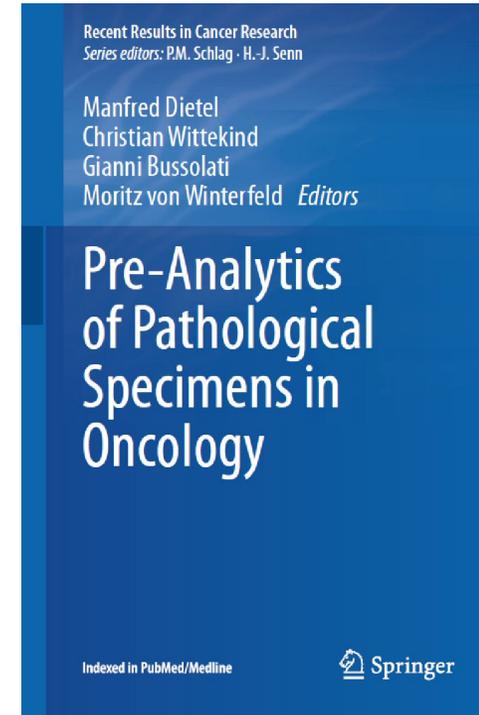
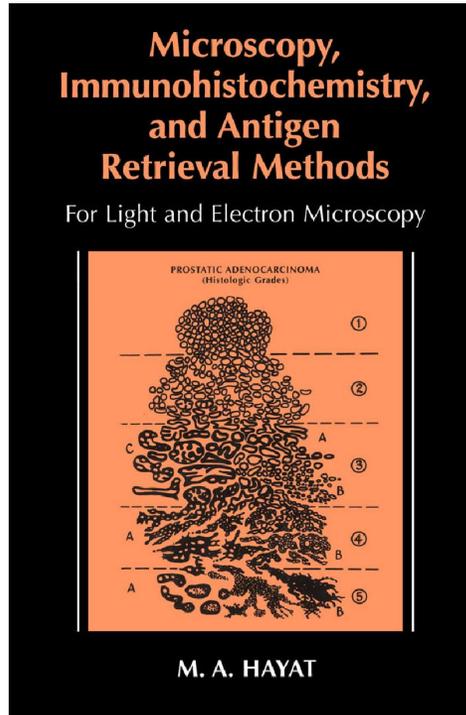
R.J. Buesa, M.V. Peshkov / Annals of Diagnostic Pathology 16 (2012) 202–209



Почему важна фиксация?

- Формалин образует очень прочные перекрестные связи между молекулами белков
- Эти связи помогают сохранить ткани в постоянных переходах от неполярных к полярным жидкостям и наоборот
- Перекрестные связи разрываются при высокотемпературной демаскировке и антигены становятся доступными для ИГХ





Available online at www.sciencedirect.com



Annals of Diagnostic Pathology 12 (2008) 387–396

Methods in Pathology

Histology without formalin?

René J. Buesa, BSc, HTL (ASCP)*

Miramar, FL 33029-5926, USA

**Annals of
DIAGNOSTIC
PATHOLOGY**



Проводка ткани

- Лучше щадящие и мягкие реактивы, дающие срезы толщиной 3-4 мкм без складок и затруднений
- Не передерживать ткани в реагентах
- Не перегревать ткани во время проводки
- Отсрочку проводки делать в первом спирте
- Малые образцы проводить по короткому расписанию
- Неверно проведенные и исправленные образцы могут дать ложноположительные или ложноотрицательные результаты
- Не использовать для декальцинации кислотные декальцинаторы и электролиз, ультразвук, термостаты; не передерживать в растворах.



Заливка

- Образцы заливаются в твердый парафин – он позволяет сделать более тонкие срезы
- Нагрев заливочного парафина в термостате или заливочном центре должен быть выше точки плавления парафина на 4-5°C
- Залитый образец должен представлять единое целое с парафином, а не отделяться от него
- Правила для ориентировки образцов – общие. Конкретные указания может дать патолог, вырезавший материал.



Контрольные образцы

- Желательно использовать внутренние положительные контрольные структуры, поскольку фиксация разных объектов отличается
- Контроль можно и нужно располагать на одном и том же стекле, так как реактивы покрывают всю площадь стекла, кроме лейбла



Микротомия

- Микротомия по общим правилам приготовления препаратов
- Вода – чистая дистиллированная или деионизированная, с добавкой ПАВ (tween20)
- Срезы должны быть ровные, толщиной 3-4 мкм, без складок и пузырей под ними
- Стекла: с поли-L-лизинном, Super frost, +, подходящие для Ventana.
- Сушить стекла: вертикально, термостат, 60 мин, 60°C.



Окраска ГЭ



- Обязательная обзорная окраска перед ИГХ исследованием.
- Отдельное стекло ГЭ должно быть сделано, если ИГХ-архив хранится отдельно от основных случаев.



Кто ответственный за выполнение этапа?



- Взятие – хирург
- Подготовка к транспортировке – м/с оперблока
- Транспортировка – санитарка оперблока/курьер
- Прием материала – лаборант/медрегистратор
- Вырезка – вырезающий патолог
- Проводка, микротомия, окраска – лаборант/медицинский лаб техник, отвечающий за работу с ИГХ-тестами и аппаратурой
- Архивирование – лаборант/медрегистратор
- Ответ – патолог/зав отделением



Пример СОП для подготовки к ИГХ

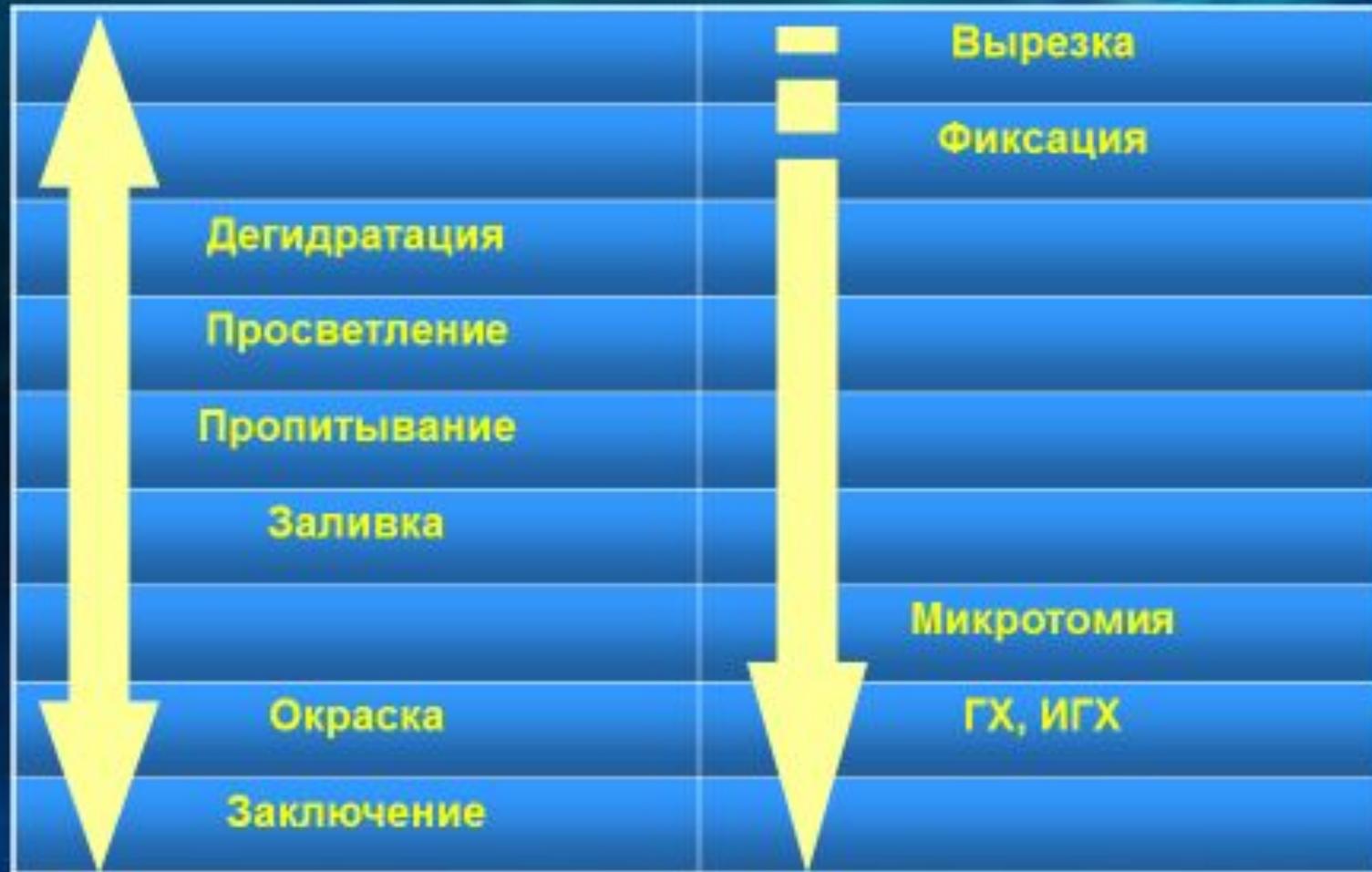
ЧЕК-ЛИСТ КОМПЕТЕНЦИЙ.

ГЛАВНАЯ ЗАДАЧА: ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕДУРЫ.

- 1 – Получить запросы, распечатанные на компьютере для всех ИГХ-случаев за прошедший день
- 2 – извлечь из термостата высушенные стекла (сушить минимум с 7 часов прошлого вечера)
- 3 – Проверить, чтобы все срезы были на +стеклах
- 4 – При наличии некоторых «дополнительных стекол» из случаев для стекол, используемых для ИГХ, проверить наличие положительных контролей
- 5 – Сверить тип иммуноглобулина для каждого случая с типом иммуноглобулина, используемого в стеклах для отрицательного контроля
- 6 – Проверить, чтобы все требуемые стекла были срезаны
- 7 – Если пропущены какие-то запрошенные стекла, обратиться к старшему технику за причиной и дать заказ на их резку до 4 утра ночной смене
- 8 – Рассортировать стекла по случаям пока заполняются стейнеры (48 стекол/запуск)
- 9 – Подготовить рабочие программы, а также количества реагентов (мкл)
- 10- Запустить программу, распечатать все нужные лейблы
- 11 –Приклеить лейблы к стеклам и разместить стекла в пластиковые стойки



Обратимые и необратимые этапы приготовления гистопрепаратов



**Спасибо за
внимание!**

**Спонсор вебинара: компания Рош
Диагностика Рус**

Максим Валерьевич Пешков – биолог отделения биопсийных и
цитологических исследований
патолого-анатомического бюро г. Таганрога

Maxim_71@mail.ru

(ВК: <https://vk.com/id422924423>)

