

SIGNIFICANCE OF PRE-ANALYTICAL PHASE IN PATHOHISTOLOGICAL DIAGNOSTIC PROCESS – THE ROLE OF LABORATORY TECHNICIAN IN QUALITY ASSURANCE

Krasimira Dinkova

Trakia University - Medical College, Stara Zagora, Bulgaria, krasi.dinkova@gmail.com

Abstract: Histopathological analysis is an essential part of formulating the clinical diagnosis and the examination of tumors and their differentiation can be a great challenge for the pathologist. The latter is expected to assess the possibility of drug therapy and to give a prognosis for the development of the disease. The process from the placement of the biopsy specimens in the histology laboratory to the presentation of the finished samples to the pathologist is entirely in the hands of the histology laboratory technician, and his duties are related to the identification of the samples and their entry in the histology journals, as well as to the processing of these samples and preparation of microscopic preparations. That might be a long and multi-stage process. Advances in technology allow the implementation of new and modern devices that automatically perform a large part of the research. However, this does not apply to histopathological laboratories, in which only laboratory technicians still carry out the specific processing and staining.

Defects in the microscopic slides occur even in the best equipped laboratory. Errors can be made at four different stages:

- at the stage of processing the specimen and preparation of a paraffin block;
- during cutting of the paraffin block;
- during the staining of the microscopic slides;
- during mounting of the specimens.

Depending on the structure of some organs, more special processing may be required - fixation, tissue shaping, inclusion, etc. Most often such tissues are: lipomas, lymph nodes, curettage, skin, uterus, brain, bone.

Knowing of the possible stages at which errors might occur is important for both the doctor and the laboratory technician. A well-trained laboratory technician knows the reasons that lead to difficulties and directs his efforts to avoid or prevent them. Minimizing errors allows working in a calm atmosphere with a minimization of the harmful influence of the reagents used.

Keywords: histological studies, histopathological laboratory technician, diagnosis.

ЗНАЧЕНИЕ НА ПРЕАНАЛИТИЧНАТА ФАЗА В ПАТОХИСТОЛОГИЧНАТА ДИАГНОСТИКА - РОЛЯ НА ЛАБОРАНТА В ОСИГУРЯВАНЕ НА КАЧЕСТВОТО

Красимира Динкова

Тракийски Университет, Медицински Колеж - Стара Загора, Република България
krasi.dinkova@gmail.com

Резюме: Патохистологичното изследване е съществена част от поставянето на правилната клинична диагноза, а изследването на туморите и тяхната диференциация може да бъде голямо предизвикателство пред лекаря - патолог. От него често се очаква да оцени възможността за лекарствена терапия и да даде прогноза за развитието на заболяването. Процесът от постъпването на биопсияния материал в хистологичната лаборатория, до представянето на готовите проби на патолога е изцяло в ръцете на хистологичния лаборант, като задълженията му са свързани както с идентифицирането на пробите и тяхното вписване в хистологичните журнали, така и с обработката на тези проби и изготвяне на микроскопски препарати. Подготовката на тези препарати е дълъг и многостепенен процес. Напредъкът на технологиите позволява внедряването на нови и модерни апарати, които автоматично провеждат голяма част от изследванията. Това, обаче, не касае патохистологичните лаборатории, в които все още единствено лаборантите извършват специфичната обработка и оцветявания. Дори и в най-добрата лаборатория понякога се получават нежелани дефекти в микроскопските препарати. Грешките могат да бъдат допуснати на четири различни етапа:

- при обработка на материала и изготвяне на парафиново блокче;
- при рязане;
- при оцветяване;
- при включване.

В зависимост от структурата на някои органи, може да се наложи по-специална обработка – фиксация, оформяне на тъканта, включване и т.н. Най-често такива тъкани се явяват: липоми, лимфни възли, кюретаж, кожа, матка, мозък, кост.

Познаването на възможните места за грешки е от значение както за лекаря, поставящ диагнозата, така и за лаборанта. Добре обученят лаборант познава причините, които водят до затруднения, и насочва усилията си към тяхното избягване или предотвратяване. Свеждането на грешките до минимум позволява да се работи в спокойна атмосфера с минимизиране на вредното влияние на използваните реактиви.

Ключови думи: хистологични изследвания, патохистологичен лаборант, диагноза.

1. ВЪВЕДЕНИЕ

По данни на СЗО злокачествените новообразувания са сред водещите причини за смърт в световен мащаб. През 2019 г. злокачествените тумори са първа или втора водеща причина за смърт във възраст под 70 години в 112 от 183 държави. В световен мащаб над 19 милиона годишно са новите случаи на рак (Sung H et al, 2021). Усилията се насочват не само към лечението и борбата с последствията, но и към превенцията и ранната диагностика, като един от начините за справяне с проблема. Редица съвременни методи, сред които: компютърна томография, рентген, ултразвук, магнитен резонанс, генетични изследвания и др. позволяват до голяма степен да се постави изключително точна диагноза. За съжаление, част от тях остават с висока цена и не винаги достъпни. Биопсичната диагностика остава, обаче, „златен стандарт“, като тя включва взимане на тъкани проби от пациент с цел да се прецени точната локализация на патологичен процес в рамките на даден орган или тъкан, както и да се постави точна патологична диагноза, оределяне стадия на туморен процес, проследяване състоянието на пациента и т.н.

2. ЕТАПИ И ВЪЗМОЖНИ ГРЕШКИ В ХОДА НА ПРЕАНАЛИТИЧНАТА ФАЗА

Фиксирането във формалин и изготвяне на парафиново блокче е рутинен метод за обработка на тъкани за хистологично и имунохистохимично изследване. Наличието на разлики в продължителността на всеки етап, използваните реактиви, температурата на обработка, както и разликите в оборудването с апаратура в различните лаборатории е предпоставка за възникване на грешки. Въпреки че имунохистохимията представлява надеждна техника за диагностика, съществуват редица фактори, които могат да повлияят негативно върху интензитета на самата реакция. Преаналитичната фаза може да повлияе на следващите фази (аналитична и следаналитична), което я прави критична стъпка (Rao S, Masilamani S, Sundaram S, Duvuru P, Swaminathan R., 2016). Изготвянето на парафиново блокче е многоетапен процес. Неоптималната обработка може да промени морфологичните, имунохистохимичните и молекулярните характеристики на хистологичните проби (Gullo I, Marques A, Pinto R, Cirnes L, Schmitt F, 2021).

По данни на Американското дружество по патология и Колежът на американските патолози, в около 20% от имунохистохимичните анализи има неточности, (Bagchi A et al, 2021) като част от причините, водещи до този проблем са грешки в преаналитичната фаза от обработката на биопсичния материал. Най-сериозните грешки са отчитане на фалшиво-положителен или фалшиво-отрицателен резултат, което повлиява ефикасността на приложената терапия и определянето прогнозата при пациента (Agrawal L, Engel KB, Greytak SR, Moore NM, 2018).

Грешки по време на обработката

Грешките, допуснати по време на обработката на тъканите до блокче са с най-трайни последици (Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore NM, 2014). Ако първата стъпка от обработката – фиксирането на материала, не е проведена правилно, тогава е невъзможно да се получи качествено блокче, а от там – и качествен микроскопски препарат.

Изсъхването на материала преди или след фиксирането, също води до неговото трайно увреждане.

Ако добре фиксиран материал не е достатъчно обезводнен в алкохолната редица, тогава, при продължителен престой в ксилола, материалът става трошлив, което също разваля необратимо неговото качество.

Свеждането на тези грешки до нула е цел на всяка лаборатория.

Ако материалът е добре фиксиран и обезводнен, но не е добре пропит с парафин, рязането е почти невъзможно, но този дефект лесно може да се отстрани чрез разтапяне на блокчето и повторното му пропиване с парафин.

Дефекти при рязането

При добре обработено блокче могат да възникнат различни проблеми при рязането.

- Стандартната дебелина на хистологичните срези е 4-5 μm . Понякога, обаче, по-тънките срези могат да доведат до фалшиво отрицателен резултат при някои антигени. Познаването на особеностите на всяко едно изследване ще позволи избягването на грешки от този характер (Yu J et al, 2019).
- На срезовете може да има гънки и набръчквания. Те са резултат от лошото разпъване на водната баня. След монтиране върху предметното стъкло, тези дефекти не могат да бъдат поправени. Ето защо лаборантът трябва да се старее да изпъне гънките още в топлата ваничка и да подбере най-качествените от тях за монтиране върху предметното стъкло.
- На срезите могат да се открият надлъжни разкъсвания. Най-често те се дължат на дефекти на ръба на ножа. Решението е смяна на мястото на рязане или изцяло смяна на ножа.
- Понякога в материала има участъци на вкалцвяване. Дори и при идеално наточен нож не може да се получи добър срез, защото тези участъци повреждат ръба на ножа. Решението е със скалпел внимателно да се отстрани този участък (който обичайно е с размери не повече от 1/1мм), след което рязането може да продължи безпроблемно.

Стъпаловидни дефекти

- На срезите могат да се появят стъпаловидни дефекти с редуване на по-тънки и по-дебели участъци (наподобяващи черга). Причина за това са вибрации на микротомния нож или на блокчето. При новите ротационни микротомии и използването на пластмасови хистологични касети за оформяне на парафиновото блокче, тези вибрации са сведени до минимум. Срещата се най-вече при рязане на много твърди и плътни материали, като напр. миомен възел. За да се избегнат такива дефекти се използват специални ножове за твърди тъкани. Освен това е необходимо да се промени ъгъла на наклона на ножа спрямо блокчето (инклинация на ножа), да се намали дебелината на рязане, както и скоростта на рязане. Тези дефекти не затрудняват много микроскопирането, но правят невъзможно изготвянето на снимка на определен участък, който може да бъде обект на научен интерес (J. F. A. McManus and Robert W. Mowry, 1960).

Суперпониране на тъкани

- Понякога част от тъкан може да бъде частично суперпонирана върху друга тъкан от среза. Това се случва, когато повърхността на топлата ваничка е замърсена от предишния материал. За да се избегне такава грешка е желателно водната повърхност да се почиства с марля или салфетка след всяко блокче, а в края на работния процес ваничката да се почисти и подготви с нова вода за следващия ден.

Разпръскване на тъканта

- При рязане на по-рехави тъкани може да се получи разпръскване при поставяне на среза във водата, което води до неправилно раположение на тъканите и клетките една спрямо друга. Това е индикатор, че температурата на водата е висока и трябва да се охлади. За да се избегне този проблем водните ванички са оборудвани с контролен термометър, който помага на лаборанта да избере правилната температура за разпъване на срезите от съответния материал.

Дефекти при оцветяването

Дефектите, свързани с оцветяването най-често са свързани с времето на експозиция на боите. Ако е твърде кратко или твърде дълго, се получава съответно блед или преоцветен препарат. За целта се препоръчва периодично да се правят контролни срези, с помощта на които да се определя времето на престой в дадена боя, за да се избегне проваляне на оцветяването на цяла партида.

При някои бои могат да се получат утайки, които се отлагат трайно върху среза и да влошат неговото качество. За да се избегне този проблем се препоръчва филтриране на боите преди употреба.

Дефекти в последния етап

Последният етап от изготвянето на микроскопския препарат е просветляването им и включване с канадски балсам и покривно стъкло. Ако препаратът не е дехидратиран преди просветляването в ксилола, тогава се получава непрозрачен дефект на препарата – „млечна зона“. Този дефект може да се коригира, като първо се отстранява покривното стъкло, след което препаратът се дехидратира в абсолютен алкохол и отново се покрива с канадски балсам и покривно стъкло. Някои лаборанти предпочитат след алкохола препаратът да бъде подсушен. Ако това става чрез затопляне, то предметното стъкло трябва да се охлади напълно преди да се пристъпи към включването. Ако стъклото е топло се получават неравни черни очертания, които затрудняват микроскопирането. Не на последно място е и момента с поставянето на предметното стъкло. То се допира до капката включваща среда под ъгъл, след което плавно се спуска, без да се притиска. При неправилна техника на включване се получават мехурчета – малки или по-големи кръгли очертания, в които не е просветлен срез и е невъзможно да се наблюдават структурите, които ни интересуват. Този дефект

също е лесно поправим – отстранява се покривното стъкло, препаратът се промива в ксилол, след което се включва отново.

3. ВИДОВЕ ПРОБЛЕМИ ПРИ РАЗЛИЧНИ ТЪКАНИ И МАТЕРИАЛИ

Някои от грешките, които се допускат в лабораториите, са провокирани от естеството на материалите, които се обработват. Това са тъкани, в които реактивите проникват бавно и това налага някои промени в протоколите за работа.

Най-добрата фиксация на тези тъкани се получава при използването на 10% формалин, но за разлика от останалите тъкани и органи, тези се нуждаят от по-продължителен престой във фиксатора – около 48 часа. Препоръчва се фиксацията да е в термостат при 56°C за първите 6 часа, след което се пристъпва към оформянето на по-малки тъканни късчета, които продължават да се фиксират на стайна температура (Стефанова, Р., Павлов, К., 1961).

Липоми. След правилното извършване на фиксацията следва дооформяне на тъканното късче. Желателно е то да е с дебелина не повече от 1,5-2 мм, тъй като реактивите, през които преминава по време на последващата обработка проникват много бавно в тъканта. Като се има предвид, че повечето патохистологични лаборатории са оборудвани с автоматизирани тъканни процесори, в които времето за престой на всички материали е изравнено, то дебелината на тъканното късче е от съществено значение за качествено пропиване на липомите. Ако е необходимо да се изготвят многобройни срези от такъв материал, то тогава е препоръчително да се изготвят 2, 3 или повече блокчета, а не едно с по-голяма дебелина. При спазване на изброените изисквания изготвеното парафиново блокче ще е с добро качество и не изисква специфика на рязането, различна от останалите тъкани.

Лимфен възел. Подобно на липома, при лимфните възли също имаме бавно проникване на различните реактиви в тъканта. Затова е необходимо лимфните възли също да се оформят на срези с дебелина 1,5-2мм. Друга особеност на лимфните възли е, че те имат капсула от плътна съединителна тъкан, която възпрепятства проникването както на фиксатора, така и на останалите реактиви. Затова дори и лимфни възли с размери под 2 мм трябва да се срежат, за да се осъществи импрегнацията на тъканта с различните реактиви. В много случаи лекарят-патолог изисква и направата на отпечатък от лимфен възел преди фиксацията. Това става като пресен срез се подсуши леко с филтърна хартия, след което се поставя върху предметното стъкло, без притискане или размазване. По този начин се правят 2 до 3 отпечатъка. Ако е необходимо да се направят повече, то тогава се прави нов разрез.

След правилно проведена обработка и изготвяне на парафиново блокче, изготвянето на качествени срези все още не е гарантирано. Лимфните възли изискват рязане на по-малка дебелина – 2-3 μm . Затова при такива тъкани е задължително да се използва твърд парафин с точка на топене не по-ниска от 58°C. Понякога може да се наложи и използването на смес парафин с колофон, което значително улеснява изготвянето на тънки срези.

Кюретажен материал. Трудността при обработката на този материал идва от факта, че често се съдържа голямо количество кръвни съсиреци. Те не изискват особено внимание при обработката, но създават проблеми при рязането. Такъв материал трябва да се реже без да е много охладено парафиновото блокче, с много бавна скорост на движение на ножа, за да се избегне „насихане“ на среза.

Мозък. Подобно на липомите и лимфните възли, той изисква по-продължително време за обработка през различните реактиви до оформяне на парафиново блокче. При рязането изискванията към мозъчната тъкан са същите както при кръвта – не много охладено блокче и бавна скорост на рязане.

Матка. Плътен орган, изисква дълъг престой във всички реактиви до изготвяне на парафиново блокче. При рязането трябва да се използва специален нож за твърди материали с подходящ ъгъл на заточване, както и да се настрои наклона на ножа спрямо плоскостта на самото блокче. Ако не се спазят тези изисквания е много вероятно ножа да се „вклини“ в блокчето, което ще доведе до унищожаване на изследвания материал. Затова при работа с такива органи е желателно лекарят-патолог да остави материал за резерва, за да избегнем риска пациента да остане без диагноза.

Кожа. Плътен материал, много често е взет и с мастан тъкан. Този материал съчетава изискванията към мастната тъкан и към плътните материали. Освен по-продължителната обработка, кожата има известни изисквания при оформянето на парафиновото блокче. Материалът трябва да е ориентиран така, че при срез да се виждат всички слоеве на кожата – епидермис, дерма, дермоепидермална граница, мастна тъкан и т.н. при неправилна ориентация на материала съществува риск от изрязване на епидермиса и дермата, което води до невъзможност за поставяне на диагноза.

Материали от кост, трепанобиопсия от костен мозък, тъкани, съдържащи калциеви отлагания. Изискват определена обработка преди фиксацията. Нарича се декалцинация и представлява процес на

разтваряне и отделяне от костната тъкан на неорганичните соли. Ако не се извърши декалцинацията, то ще е невъзможно да се изготвят качествени тънки срези от парафиновото блокче. Калциевите отлагания нараняват острието на ножа, материалът се разкъсва и разпада при разпъването във водната баня. А при последващата обработка – депарафиниране и оцветяване на срезите, вероятността същите да изпаднат от предметното стъкло е много голяма.

Най-често за декалцинацията се използва 10% азотна киселина, като задължение на лаборанта е да следи степента на омекване на материала. При малките биопсии обикновено 24 часа са достатъчни. По-големите кости, обаче, престояват 7-10 дни, понякога и повече, в декалциниращия разтвор. След пълното декалциниране на костта се пристъпва към стандартната обработка на материала, до изготвяне на парафиново блокче.

Декалцинацията може сериозно да повлияе на молекулярния анализ на пробите, тъй като нарушава целостта на нуклеиновите киселини и протеините. Препоръчително е за проби, които е невъзможно да се извършат без декалцинация вместо стандартен декалциниращ разтвор да се използва етилендиаминтетраацетат (EDTA) (Souza da Silva R, Pinto R, Cirnes L, Schmitt F, 2022).

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Всички аспекти на обработката на тъканите, включително времето до фиксирането на тъканите, вида на фиксатора, продължителността на фиксирането, реактивите, използвани за последваща обработка, както и рязане на пробата, оказват влияние върху резултатите от всяко едно изследване.

Въпреки че имунохистохимията представлява нов и надежден метод за диагностика, тя остава зависима от същите процедури за събиране, обработка и съхранение на биологичния материал, използвани от десетилетия, и в много случаи, същите аналитични платформи за количествено определяне на биомаркери. Стандартизирането на всяка стъпка от обработката на тъканните проби в хистологичните лаборатории, разработването на протоколи за работа и тяхното стриктно спазване от лаборантите е съществен елемент от поставянето на точната диагноза.

ЛИТЕРАТУРА

- Стефанова, Р. & Павлов, К. (1961). Микроскопска техника на хистологични изследвания. ДИ Медицина и физкултура, София
- Agrawal L, Engel KB, Greytak SR & Moore HM. (2018). Understanding preanalytical variables and their effects on clinical biomarkers of oncology and immunotherapy. *Semin Cancer Biol.*, 52, 26-38.
- Bagchi A, Madaj Z, Engel KB, Guan P, Rohrer DC, Valley DR, et al. (2021). Impact of Preanalytical Factors on the Measurement of Tumor Tissue Biomarkers Using Immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.*, 69(5), 297-320.
- Bass BP, Engel KB, Greytak SR & Moore HM. (2014). A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med.*, 138(11), 1520-30.
- Gullo I, Marques A, Pinto R, Cirnes L & Schmitt F. (2021). Morphological control for molecular testing: a practical approach. *J Clin Pathol.*, 74(5), 331-333.
- J. F. A. McManus & Robert W. Mowry. (1960). *Staining Methods. Histologic and histochemical*, Harper (Hoeber), New York.
- Rao S, Masilamani S, Sundaram S, Duvuru P & Swaminathan R. (2016). Quality Measures in Pre-Analytical Phase of Tissue Processing: Understanding Its Value in Histopathology. *J Clin Diagn Res.*, 10(1), EC07-11.
- Souza da Silva R, Pinto R, Cirnes L & Schmitt F. (2022). Tissue management in precision medicine: What the pathologist needs to know in the molecular era. *Front Mol Biosci.*, 26, 9:983102.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.*, 71(3), 209-249.
- Yu J, Wang Q, Xue P, Zheng L, Mo J, Chen L, Yin M, Huang Y, Bao Y & Ding F (2019). A model for the impact of FFPE section thickness on gene copy number measurement by FISH. *Sci Rep.*, 17, 9(1):7518.