

**ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СТАРА ЗАГОРА
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „ЗДРАВНИ ГРИЖИ“**

КРАСИМИРА ИЛИЕВА ДИНКОВА

**ОСИГУРЯВАНЕ НА КАЧЕСТВОТО В ПАТОХИСТОЛОГИЧНИТЕ
ЛАБОРАТОРНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ – ИМУНОХИСТОХИМИЯ И
ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“,
Област на висшето образование 7. Здравеопазване и спорт; Професионално направление
7.4. Обществено здраве; Научна специалност „Управление на здравните грижи“

Научен ръководител: Проф. Албена Николаева Андонова, дм

Научен консултант: Проф. Д-р Юлиан Руменов Ананиев, дм

Официални рецензенти: Проф. Силвия Младенова Младенова, дм

Доц. Таня Паскалева Стойчева, доз

Стара Загора, 2023

Дисертационният труд е написан на 161 страници и е онагледен с 61 фигури (8 от които комбинирани микроскопски фотографии), 7 таблици и 8 приложения.

Библиографията включва 176 литературни източника, 15 от които на кирилица и 161 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита от Разшрен катедрен съвет на катедра „Здравни грижи“ към Медицински факултет на Тракийски университет на 08.11.2023 година, определен със заповед № 101/31.10.2023г.

Публичната защита ще се състои на 07.02.2024г. от 11.00 часа в академичната зала на Медицински факултет към Тракийски университет

Материалите по защитата са на разположение в научния отдел на Медицински факултет на Тракийски университет, Стара Загора, ул. Армейска 11, Деканат, ет. 2

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
ВЪВЕДЕНИЕ	5
ПЪРВА ГЛАВА – Цел, задачи и методология на проучването	6
1.1. Цел	6
1.2. Задачи на научното изследване	6
1.3. Хипотеза	7
1.4. Предмет на изследването	7
1.5. Обект на изследването	7
1.6. Технически единици	7
1.7. Етапи на научното изследване	7
1.8. Методи на научното изследване	8
ВТОРА ГЛАВА – Резултати, анализ и оценка от собствено проучване	9
2.1. Ретроспективно проучване върху честотата и рутинното използване на ИХХ методи в патохистологичната лаборатория към УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович“ АД – Стара Загора	9
2.2. Анализ на наличните и препоръчани протоколи за ИХХ обработка	11
2.3. Причини за най-често допусканите грешки, в процеса на изготвяне на качествени препарати за рутинна хистология и ИХХ изследване	21
2.4. Мнение на студенти от специалност „Медицински лаборант“ и преподаватели в медицинските колежи относно нуждите от обучение по хистотехника	36
2.5. Мнение на хистологични лаборанти относно необходимостта от продължаващо обучение и в частност необходимостта от допълнителна квалификация за извършване на ИХХ и ИФ изследвания	46
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	50
ИЗВОДИ	50
ПРИНОСИ И ПРЕПОРЪКИ	51
ПРИЛОЖЕНИЯ	53
РЕЗЮМЕ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК (SUMMARY)	58

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

Ab	-	антитяло
ABC	-	метод „авидин-биотин комплекс“
AEC	-	триамино-етилкарбазол хромоген
Ag	-	антиген
APA	-	Американското дружество по патология
АРААР-		алкална фосфатаза-антиалкалнофосфатазен метод
AR	-	антигенно възстановяване
BSA	-	говежди серумен албумин
DAB	-	диамино-бензидин хромоген
ER	-	естрогенен рецептор
FFPET	-	фиксирана във формалин и включена в парафин тъкан
NIER	-	термично антигенно възстановяване
HRP	-	хрянпероксидазен ензим
PAP	-	пероксидаза-антипероксидазен метод
PBS	-	фосфатен буфер
PIER	-	ензимно антигенно възстановяване
RTU	-	готов за употреба реактив
TBS	-	Tris-борна киселина буфер
БАПЗГ-		българската асоциация на специалистите по здравни грижи
ИФ	-	имунофлуоресценция
ИХХ	-	имунохистохимия
КОКП	-	клиника по обща и клинична патология
МК	-	Медицински колеж
ОКС	-	образователно-квалификационна степен
ОНС	-	образователна и научна степен
УЗГ	-	Управление на здравните грижи
УМБАЛ-		университетска многопрофилна болница за активно лечение

ВЪВЕДЕНИЕ

С напредъка на медицинските технологии, въвеждането на молекулярната диагностика, както и възможностите за персонализирано лечение, става задължително увеличаването на контрола на качеството и стандартизацията в хистологичните лаборатории, включително и в преаналитичната фаза от обработката на тъканите. В последните години все по-важно е стандартизирането на имунохистохимичните изследвания, тъй като от качествен анализ (наличие или не на даден антиген), вече се преминава към количествен такъв. Количествените резултати при изследване на хормоналните рецептори при рак на гърдата, HER2 рецептора и други имат пряко отношение към провежданото лечение на всеки пациент. Използването на ИХХ резултати като прогностичен маркер също се оповават на количествена оценка.

Интерпретацията на резултатите при различни оцветявания до голяма степен е субективна – основава се на виждането на отделния патолог. Според проучване на Faculty of Dentistry, Hamadan University of Medical Sciences, обаче, около 15 % от грешните диагнози се дължат на недобро качество на биопсичните проби. Според други проучвания при около 25% от случаите на злокачествени новообразувания има разминавания в диагнозите при различните патолози, като несъответствията са както във вида на тумора, така и в степента на неговата инвазия. Това налага навлизането на нови, по-точни диагностични панели, които елиминират субективността при поставянето на диагнозата. Достоверността и степента на полезност на тези панели, обаче, зависи критично не само от интерпретацията, но и от целия процес на изпълнение. В морето от хиляди антители, достъпни за диагностиката днес, избора на подходящото анти тяло е ключово за точността на диагнозата. Но компетентният патолог може лесно да бъде подведен, ако пробата „извърви грешния път“. Като се започне от начина на събиране на пробите, през цялостната им обработка, изготвяне на парафиново блокче, провеждане на имунохистохимичната реакция – всяка една стъпка крие рискове от грешки. Познаването на критичните моменти от обработката е ключово за постигането на добри резултати.

В съвременната научна литература не е трудно да се открият стотици статии, базирани на прилагането на ИХХ изследванията, тяхната роля при диагностиката на потенциално лечими злокачествени новообразувания, прилагане на таргетна терапия в резултат на същите тези изследвания. Почти липсва, обаче, такава литература, насочена към техническите извършители на хистологичните проби – медицинските лаборанти. С повишаването на изискванията към патолозите, нарастват и изискванията към компетенциите и отговорността на тези лаборанти. От тях се изисква задълбочено познаване на всички етапи при изготвянето на микроскопски препарати, възможните места за допускане на грешки, начините за тяхното предотвратяване или отстраняване. Обработката на биопсичен материал, изготвянето на микроскопски препарати, извършването на специфични оцветявания и имунохистохимични изследвания е основно в ръцете на хистологичния лаборант. От него зависи качеството, точността и достоверността на всяко изследване. Детайлното познаване на всеки етап от едно изследване, точното и стриктно спазване на протоколите за работа, както и правилното приготвяне и съхранение на реактивите е гаранция за качествен краен резултат.

Всичко това може да се осигури чрез създаване на възможности за периодично обучение за опресняване на знанията, както и за усъвършенстване на професионалната квалификация на лаборантите, работещи в хистологичните лаборатории.

ПЪРВА ГЛАВА – Цел, задачи и методология на проучването

2.1. ЦЕЛ

Да се проучи необходимостта от повишаване на качеството в патохистологичните лабораторни изследвания, чрез усъвършенстване на имунохистохимичните и имунофлуоресцентни методики и протоколи, с цел препоръки при съставянето на бъдещ стандарт по патология в частта му за медицински лаборанти, както и да се определи ролята на обучението по хистотехника на студентите в специалността „Медицински лаборант“ и продължаващото обучение на вече работещи хистологични лаборанти за осигуряване на качеството в лабораторната диагностика.

2.2. ЗАДАЧИ НА НАУЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ

1. Да се проучат достъпните литературни източници, наблягащи на значимостта на качеството в патохистологичните лаборатории.
2. Да се проведе ретроспективно проучване върху честотата и рутинното използване на ИХХ методи в патохистологичната лаборатория към УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович“ АД – Стара Загора.
3. Да се проучат наличните и препоръчани протоколи за ИХХ обработка, като на базата на това се направят препоръки за модифициране и внедряване в практиката на такива протоколи, които ще доведат до повишаване на качеството в патохистологичните лаборатории.
4. Да се изследват и опишат причините за най-честите основни грешки, в процеса на изготвяне на качествени препарати за рутинна хистология и ИХХ изследване.
5. Да се проучи мнението на студенти и преподаватели в колежа относно нуждите от обучение по хистотехника в специалността „Медицински лаборант“ и в частност необходимостта от допълнителна квалификация за извършване на ИХХ и ИФ изследвания.
6. Да се проучи мнението на медицински лаборанти, работещи в патохистологични лаборатории относно необходимостта от продължаващо обучение и в частност необходимостта от допълнителна квалификация за извършване на ИХХ и ИФ изследвания.

2.3. ХИПОТЕЗА

Проучването на най-често настъпващите грешки при на обработката на хистологичния материал и извършването на ИХХ и ИФ изследвания, би позволило изграждането на стратегия за предотвратяване или отстраняване на тези грешки, а анализът на мнението на обучаващите се и работещи в специалността „Медицински лаборант“, в частност – хистологичен лаборант, би показало състоянието или необходимостта от модернизиране на програмата и продължаващо обучение.

2.4. ПРЕДМЕТ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Факторите, влияещи върху качеството в патохистологичните лаборатории

- ❖ Причини за често допускани лабораторни грешки
- ❖ Влияние на обучението на студентите от медицинските колежи, специалност „Медицински лаборант“ върху качеството в патохистологичните лаборатории
- ❖ Влияние на индоктринирането и продължаващото обучение на новоназначени медицински лаборанти в патохистологичните лаборатории

2.5. ОБЕКТ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

- ❖ Студенти, специалност „Медицински лаборант“ в медицинските колежи
- ❖ Редови хистологични лаборанти в Благоевград, Бургас, Варна, Видин, Враца, Габрово, Монтана, Плевен, Пловдив, Разград, Русе, Силистра, Сливен, София и Стара Загора.
- ❖ Старши медицински лаборанти и началници на отделения по патоанатомия от Пловдив, София и Стара Загора.

2.6. ТЕХНИЧЕСКИ ЕДИНИЦИ

- ❖ Медицински колеж към Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна
- ❖ Медицински колеж към Медицински университет – Плевен
- ❖ Медицински колеж към Тракийски университет – Стара Загора

2.7. ЕТАПИ НА НАУЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ

- ❖ Подготвителен етап (2016-2018)
 - Преглед, анализ и синтез на достъпната научна литература по темата на изследването
 - Подготовка на методиките на изследването
 - Подготовка за провеждане на анкетното проучване:
 - Получаване на одобрение от страна на Директорите на медицинските колежи за провеждане на анкетно проучване по тематиката на изследването
 - Изготвяне на три вида анкетни карти, насочени към: студенти от специалността „Медицински лаборант“, началници на хистологични лаборатории и редови лаборанти в хистологични лаборатории.
 - Предоставяне на анкетните карти до респондентите, с уточнението, че участието в анкетирането е доброволно и анонимно, което дава основание да се приеме, че степента на надеждност на събраните данни е висока.
- ❖ Изследователски етап (2018-2019)
 - Извършване на нужния брой хистологични и имунохистохимични изследвания с подчертани грешки, за доказване и онагледяване на възможните проблеми при тяхното извършване, както и начините за предотвратяването им.
 - Анализ на данните, събрани от анкетното проучване
- ❖ Заключителен етап (2019-2022)
 - Обобщаване на получените данни от проучването на достъпната литература, анализирани хистологични и ИХХ изследвания, както и анкетното проучване и извеждане на съответните изводи.

2.8. МЕТОДИ НА НАУЧНОТО ИЗСЛЕДВАНЕ

❖ Документален метод

- Проучване на българска и чужда литература по проблемите на имунохистохимичните анализи
- Проучване на закони, нормативни актове и учебна документация, свързана с обучението на студентите
- Преглед на патохистологични журналы от УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович“ АД за периода от 01.01.2003 година до 31.12. 2022 година.

❖ Микроскопски методи

- хистологични и хистохимични методи
 - фиксация и на тъканите и изготвяне на парафинови блокчета
 - оцветителни техники
- имунохистохимични и имунофлуоресцентни методи

❖ Социологически методи

- Анкетен метод – пряко анкетно проучване, чрез собствени анкети, насочени към студенти, началници на патохистологични лаборатории, старши и редови лаборанти
 - Анкета № 1 - Анонимна анкетна карта за студенти от медицинските колежи Специалност „Медицински лаборант“, състояща се от 16 въпроса от отворен и затворен тип. Целта на анкетата е да се проучи мнението на студентите за ефективността на обучението им в дисциплината „Хистотехника“
 - Анкета № 2 – Анонимна анкетна карта за началници на хистологични лаборатории и старши лаборанти, състояща се от 9 въпроса от отворен и затворен тип. Целта на анкетата е да се проучи мнението на ръководителите на хистологични лаборатории относно влиянието на квалификацията на редовите лаборанти върху качеството на патохистологичната диагностика.
 - Анкета № 3 – Анонимна анкетна карта за редови лаборанти в хистологични лаборатории, състояща се от 9 въпроса от отворен и затворен тип. Целта на анкетата е да се проучи мнението на лаборантите относно продължаващото обучение и влиянието му върху качеството в патохистологичната лаборатория.
- Полуструктурирано интервю по телефона, проведено със старши и редови лаборанти, работещи в различни градове на страната. Интервюто е проведено на база въпросите от анкети № 2 и № 3 и преследва същите цели.

❖ Статистически методи за обработка и анализ на данните, получени от анкетите

Събраните данни бяха подложени на статистически анализ, извършен с помощта на статистическата програма SPSS for Windows Version 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Използвани бяха следните статистически методи:

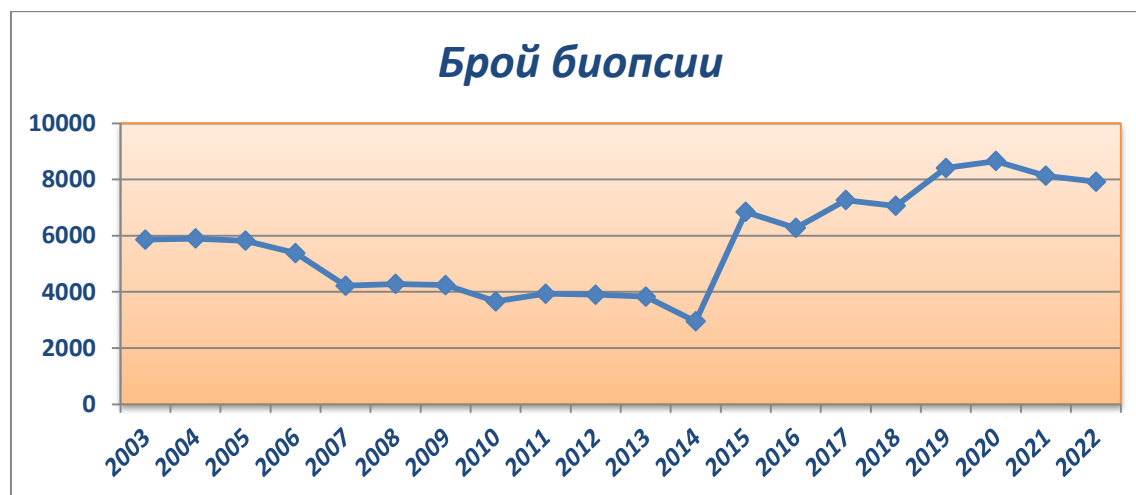
- Дескриптивна статистика
- Алтернативен анализ. Тест χ^2 .

За всички използвани анализи, статистически достоверни различия бяха приети при ниво на значимост $p < 0.05$ и ниво на гаранционна вероятност 0.95. При изготвянето на графичните изображения и таблици бяха използвани софтуерните продукти Microsoft Excel XP Microsoft и Word XP (Microsoft Corp., 2010, USA).

ВТОРА ГЛАВА – Резултати, анализ и оценка от собствено проучване

2.1. Ретроспективно проучване върху честотата и рутинното използване на ИХХ методи в патохистологичната лаборатория към УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович“ АД – Стара Загора

В изпълнение на задачите на дисертационния труд беше извършено ретроспективно проучване на имунохистохимичните изследвания с научна цел, извършвани в катедрата по обща и клинична патология към медицинския факултет, както и на такива с диагностична насоченост в патохистологичната лаборатория към УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович“ АД – Стара Загора за периода 2003 – 2022 година. То показва плавно повишаване на рутинните хистологични изследвания – от близо 6000 за 2003 година, през 2022 година те са почти 8000 (Фиг. 1). Едновременно с това се наблюдава рязко повишаване на имунохистохимичните изследвания – от средно 50 броя годишно за периода 2003г.-2016г., до над 700 броя ИХХ изследвания годишно през последните години (Фиг. 2).



Фигура 1. Натовареност в патохистологичната лаборатория към УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович“ АД – Стара Загора за периода 2003 – 2022 година



Фигура 2. Брой имунохистохимични изследвания в патохистологичната лаборатория към УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович“ АД – Стара Загора за периода 2003 – 2022 година

Началото на имунохистохимията в Стара Загора е поставено от проф. д-р Мая Гълъбова и проф. д-р Мария Цанева в началото на деветдесете години на XX век. През 1993 година е регистрирано тяхното първо участие на международен форум в Гърция. Първите имунохистохимични изследвания са работени на плуващи срези, изготвени от парафинови блокчета и са с дебелина 20-30 μm . Изследването се извършва по следния метод:

Срези с дебелина 20-30 μm се поставят в пеницилиново шишенце, в което се извършва депарафинирането. При всяка смяна на реактив течността се отпипетира внимателно, като се следи да не се загубят срезите!

1. Двукратно промиване в ксилол - 2 x 30 мин. в термостат на 56-58°C;
2. Двукратно промиване в абсолютен етилов алкохол - 2x10 мин. на стайна температура;
3. Еднократно промиване с 50% етилов алкохол - 10 мин. на стайна температура;
4. Еднократно промиване с дестилирана вода - 10 мин. на стайна температура;
5. Срезите се прехвърлят в епендорфки с PBS pH 7,4 и процедурата по ИХХ оцветяване се извършва в тях;
6. Потискане на ендогенната пероксидаза – 1,2% H_2O_2 в метанол – 30 мин.;
7. Двукратно промиване с PBS pH 7,4 – 2x10 мин.;
8. Инкубиране с първично анти тяло – 2-24 часа на стайна температура;
9. Двукратно промиване с PBS pH 7,4 – 2x10 мин. на стайна температура;
10. Инкубиране със свързващо анти тяло – 20 - 60 мин. на стайна температура;
11. Двукратно промиване с PBS pH 7,4 – 2x10 мин. на стайна температура;
12. Инкубиране с бележещ реагент – 60 мин. на стайна температура;
13. Двукратно промиване с PBS pH 7,4 – 2x10 мин. на стайна температура;
14. Проявяване на пероксидазната активност в следният разтвор, приготвен extempore: 0,3mg DAB на прах, разтворен в 15 ml 0.05M Tris-HCl буфер pH 7,6 + 36 μl H_2O_2 – 10-15 мин. до проявяване на реакцията в кафява оцветка (контролира се под микроскоп).
15. Монтиране на плуващите срези върху предметно стъкло, изсушаване, покриване с ентелан.

Този метод вече не се използва за рутинни ИХХ изследвания, тъй като плуващите срези са дебели и не отговарят на съвременните изисквания за светлинна микроскопия, но с леки модификации се използва и днес в катедрата по Обща и клинична патология към Медицинския факултет на Тракийски Университет гр. Стара Загора, като етап от електронната имунохистохимия.

През 1998 година се поставя началото на имунохистохимични изследвания върху предметни стъкла, като методиката е внедрена от проф. Татяна Влайкова, която към този момент е задочен докторант по онкология в катедрата по онкология и радиология в медицинския факултет на университета на гр. Турку – Финландия. Под ръководството на проф. Сеппо Пирхьонен тя усвоява тънкостите в имунохистохимичните методики и обучава лаборантите, работещи към този момент в катедрата по Обща и клинична патология към МФ при ТрУ – Стара Загора. Благодарение на знанията и уменията, натрупани в продължение на 5 години, се поставя и началото на диагностичната имунохистохимия в Стара Загора.

Първата регистрирана имунохистохимия с диагностична цел е направена на 09.04.2003 година. До края на тази година са направени общо 40 диагностични ИХХ изследвания.

През следващите 10 години се наблюдава сравнително постоянен брой на исканията за ИХХ изследване, като броя на тези изследвания започва плавно да се повишава след 2011 година, отговаряйки на повишените изисквания за диагностициране. Отдавна вече не е достатъчно да се

каже за една находка, че е злокачествена или доброкачествена. Злокачествените новообразувания имат различни морфологични характеристики и хистологични подтипове, изискващи специфичен клиничен подход. Патохистологията не само определя тези параметри, но е и ключов елемент от определянето на терапията на всеки отделен пациент. Започва прилагане на панели от ИХХ маркери, които постепенно се разширяват, за да се достигне до абсолютна конкретизация в диференциалната диагноза на тумора. В медицинския стандарт по клинична патология са посочени немалък брой диагностични панели, които университетските болници, каквато е и УМБАЛ „Проф. д-р Ст. Киркович“ АД-Стара Загора, е препоръчително да поддържат.

Това обяснява и нарастването на броя ИХХ изследвания в КОКП – Стара Загора през последните години (Фиг. 2). Повишеният брой ИХХ изследвания поставя лабораторията пред проблема с квалификацията на работещите в нея лаборанти. Продължаващото медицинско обучение е от изключителна важност за успешното изпълнение на тези изследвания, за да може болницата да отговори на нарастващите изисквания към диагностичните дейности.

2.2. Анализ на наличните и препоръчани протоколи за ИХХ обработка

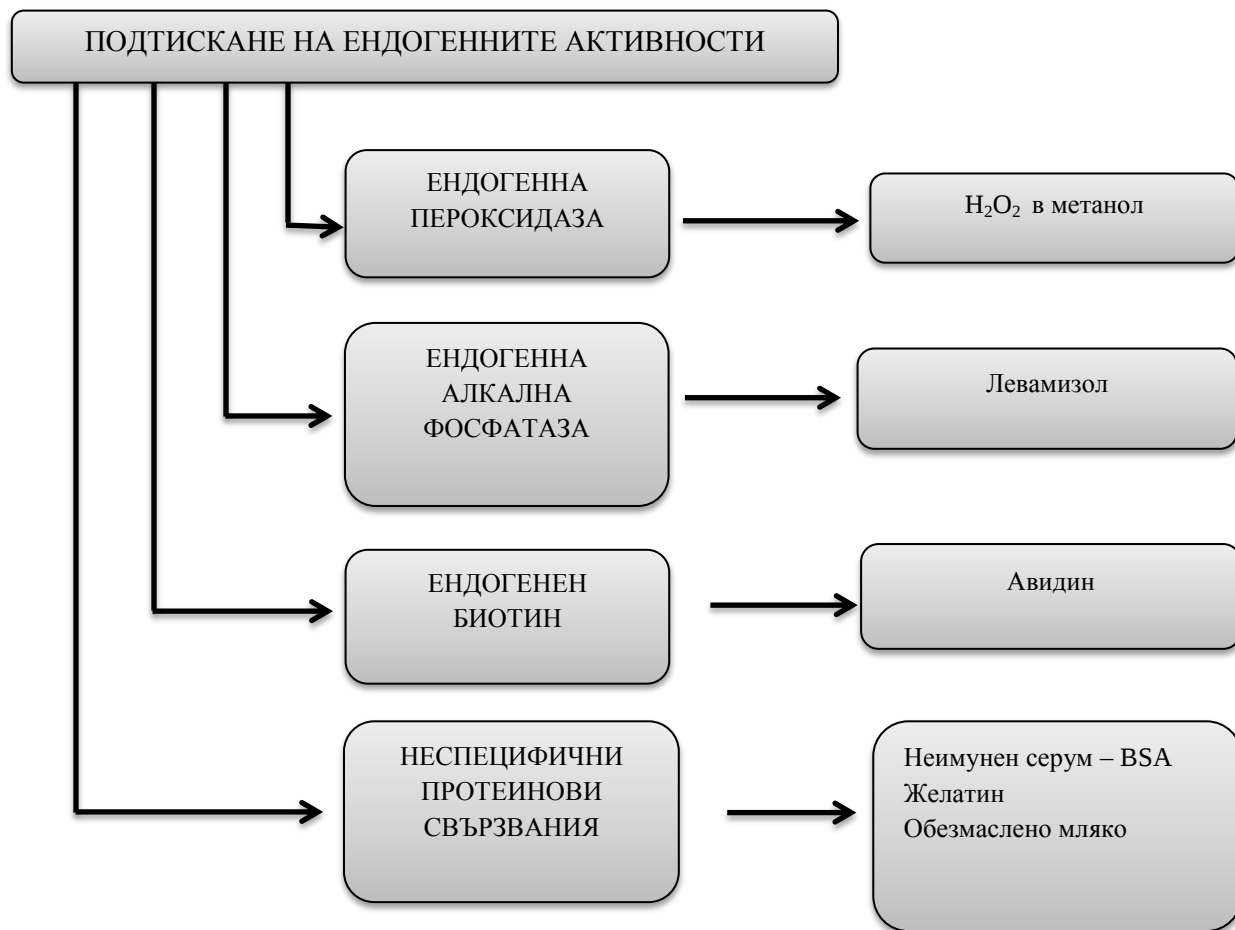
Проучването на наличните протоколи за различни антители показва следното:

1. На имунохистохимично изследване подлежат срези както от замразени тъкани, така и от парафинови блокчета.
2. Срезите, изготвени от замразена тъкан не се нуждаят от антигенно възстановяване, тъй като тъканите не са подложени на въздействието на реактиви, увреждащи антигените, докато за срези, получени от FFPE е задължително при почти всички антигени (Приложение 1).
3. Изсушаването на тъканните срези по време на цялото провеждане на изследването е пагубно за осъществяването на реакцията антиген-антитяло, затова всички инкубации протичат във влажна камера (Фиг. 3).



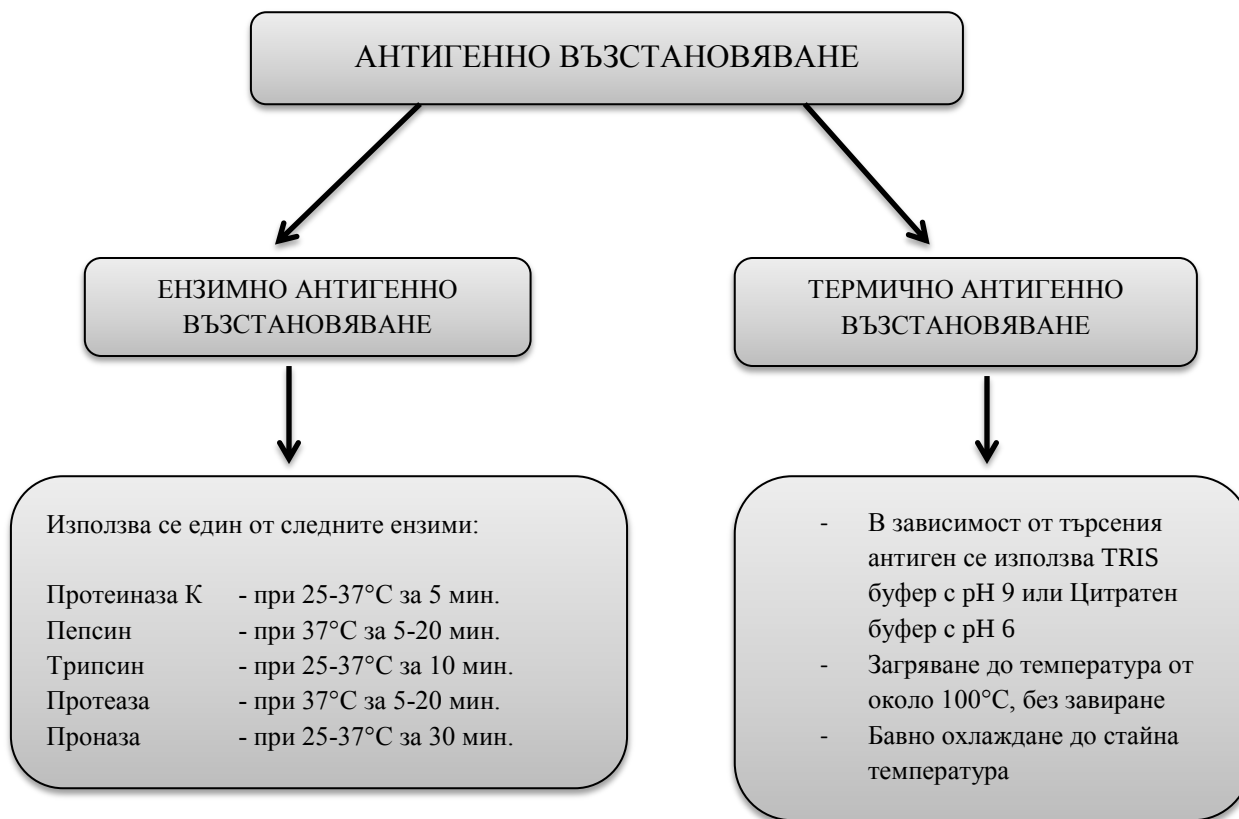
Фигура 3. Влажна камера за инкубация на препарати при ИХХ изследвания. Капацитета ѝ е 20 стъкла. Има улей за оттичане на водата, както и гумени противоплъзгащи ленти, които позволяват камерката да се накланя до ъгъл от 45°. Това е от голямо удобство, когато трябва да се извършва струйно промиване на препаратите.

4. При всички видове срези, независимо дали са получени от замразена или фиксирана тъкан е задължително потискане на ендогенните активности (Фиг. 4).



Фигура 4. Механизми за потискане на ендогенните активности

5. В зависимост от търсения антиген и целите на изследването се прилагат един от двата вида антигенно възстановяване – ензимно или термично, но има антигени, които изискват комбинирано възстановяване, като двата метода се прилагат последователно. Всички проучвания отбелязват, че няма значение в каква последователност се прилагат двата метода (Фиг. 5).



Фигура 5. Алгоритъм за антигенно възстановяване

6. Инкубация с първичното антитяло (Приложение 2).
- При наличие на данни за силно фоново оцветяване се препоръчва инкубацията да протича за по-дълго време и при по-ниска температура – напр. в хладилник за една нощ. Ако се използват концентрирани антитела, като мярка за намаляване на неспецифичните свързвания се препоръчва да се увеличи разреждането на първичното антитяло и успоредно с това се удължи на времето за инкубация.
7. Детекционни методи
- Флуоресцентни молекули – диагностично се прилагат предимно при кожни и бъбречни биопсии, като се работи върху замразени срези и не е необходимо антигенно възстановяване. Реакцията се наблюдава с флуоресцентен микроскоп.
 - Ензими – пероксидаза или алкална фосфатаза, взаимодействайки със специфичен хромоген образуват цветна утайка на мястото на реакцията. Наблюдава се със светлинен микроскоп.

8. Хромогени

- При използване на HRP (хрянпероксидазен ензим) детекционна система най-често използваните хромогени са:

-DAB (3,3' -Diaminobenzidine) – дава тъмно кафяв краен продукт, който е стабилен и позволява съхраняване на пробите дълго време. Може да се наблюдава със светлинен микроскоп, но освен това остава стабилен и при продължаващи обработки с OsO_4 , което го прави подходящ при проби за електронна микроскопия. Разтворим е в спирт, но не и в ксилол, което позволява включване на готовите препарати в синтетични смоли. За контрастно оцветяване могат да се използват хематоксилин на Майер (на вода основа), метиленово зелено и метиленово синьо.

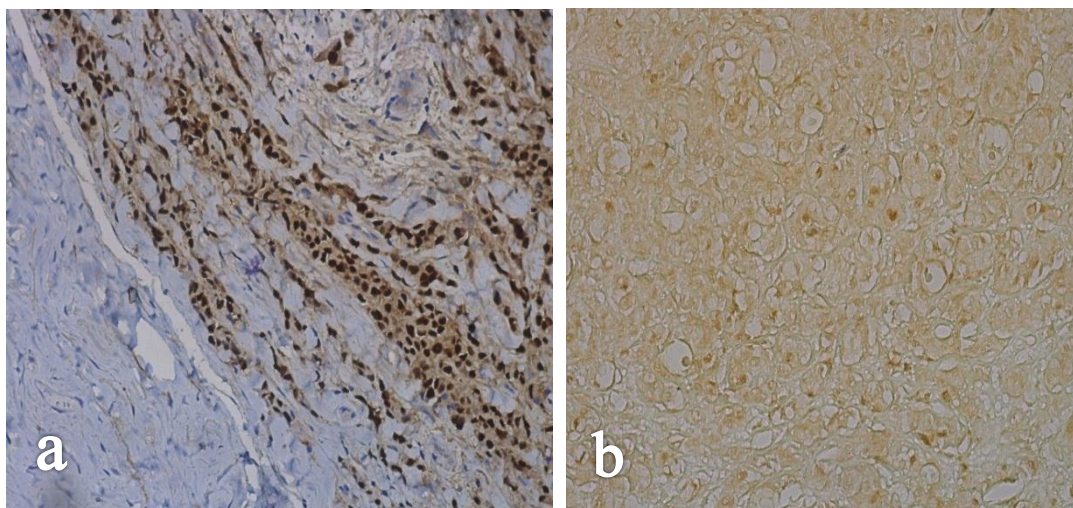
-AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole) – крайния продукт на реакцията е тъмноредна оцветка. Недостатък е разтворимостта в органични разтворители, което налага включването да се извършва с желатин или различни монтажни среди на водна основа, които могат да са фабрични или приготвени в лабораторни условия. Най-често използваните среди, приготвени на място са Сироп на Апати и глицериново желе. За контрастно оцветяване могат да се използват хематоксилин, метиленово зелено и метиленово синьо.

- При използване на ензима алкална фосфатаза най-често използваните хромогени са:

-BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate)/NBT (Nitro Blue Tetrazolium) – крайният продукт на реакцията е с тъмновиолетов цвят, неразтворим е в алкохол и органични разтворители. Като контрастни оцветители могат да се използват бързи ядрено червено (Nuclear fast red) и Brilliant green

-Fast Red – дава розово оцветен краен продукт, разтворим в алкохол. За контрастиране могат да се използват метиленово зелено и хематоксилин на Майер, който не съдържа алкохол в състава си.

- 9. Контрастно оцветяване – не е задължителна стъпка в имунооцветяването, но е препоръчително за постигане на по-добро разграничаване на таргетния сигнал (Фиг. 6).



Фигура 6. Микроскопски изглед на ИХХ реакция в зависимост от контрастирането: експресия на рецептора в ядрата на туморните клетки, на фона на контрастно оцветени ядрени структури (a); експресия на рецептора в ядрата на туморните клетки при липса на контраоцветяване (b).

Добрият хистологичен препарат трябва да отговаря на няколко основни изисквания:

1. Изследваната тъкан в максимална степен да запази своята прижизнена структура.
2. Изготвеният срез да е максимално тънък, за да може да се наблюдава на светлинен микроскоп.
3. Изследваните микроструктури трябва отчетливо да се отделят на общия фон на препарата.

Всички усилия за изготвяне на микроскопски препарат са насочени към осигуряване на тези изисквания.

Първото от тези условия касае взимането на материала и неговата правилна фиксация.

При работа с биопсичен материал отговорността за правилната и бърза фиксация е на лекаря, който взема материала. Той трябва да приготви предварително фиксиращия разтвор в обем и концентрация, подходящи за съответната тъкан. Общо правило е, че фиксиращият разтвор трябва да е в обем 10-20 пъти по-голям от обема на материала, който ще се фиксира.

Според начина на вземане биопсиите биват:

- Пункционна биопсия – с помощта на специална пункционна игла се взема тънък цилиндър тъкан от плътен орган.
- Ексцизионна (хирургична) по време на оперативна интервенция се взема тъкан, цял орган или част от него.
- Щипкова биопсия – чрез ендоскоп с помощта на щипка се откъсва парченце от повърхността на кух орган.
- Пънч-биопсия – с помощта на специален инструмент се взема част от кожна лезия, което позволява да се проследи патологичен процес в дълбочина.
- Трепано биопсия – подобно на пункционната биопсия, но с широка игла се прониква в спонгиозна кост и се взема костен мозък за хистологично изследване.

Всяка една от тези биопсии има различни изисквания към времето за фиксация и обработка на материала. При работа в болничните хистологични лаборатории, обаче, е невъзможно да се обработват по различен начин различните материали. Затова се препоръчва разделянето им в два потока – хирургични и пънч-биопсии, които изискват повече време за обработка във всеки един от разтворите; и щипкови и пункционни биопсии, които изискват по-кратка обработка.

Лаваж, четкова биопсия, отпечатък от лимфен възел са цитологични проби, при които изследваният материал е върху предметно стъкло. Тук, след извършване на фиксацията се пристъпва директно към оцветяване, без да е необходима друга обработка.

Всички материали, постъпващи в хистологичната лаборатория трябва да бъдат придружени от фиш, който да съдържа както данни за пациента – име, пол, възраст, така и кратко описание на изпратения биологичен материал – локализация, размер, вид на фиксацията. Контейнерът, в който е поставен материала, също трябва да бъде надлежно етикетирани.

В болничните хистологични лаборатории като най-подходящ за целите на диагностиката, се е наложил форамлинът – прост некоагулиращ фиксатор. Неговите предимства са:

- Цена – относително ниска, а това е от съществено значение, тъй като фиксаторът се използва в много по-големи количества, в сравнение с останалите реактиви.
- Прониква бързо в тъканите – 1 mm/h. За големи органи ще е необходимо повече време, но за късчета с дебелина 10-15 mm 6 часа са напълно достатъчни за добра фиксация. За сравнение – сублиматът и пикриновата киселина проникват със скорост 1mm/6h.
- Действа „меко“ – не предизвиква груби нарушения в тъканните структури.

Съществен недостатък на формалина е, че потиска действието на ензимите и „маскира“ антигените. Това може да бъде пречка при прилагането на нови, съвременни методи на изследване.

Изхождайки от факта, че формалинът в световен мащаб е с най-широко приложение като фиксатор на биопсични проби, научните институти и лаборатории разработват методики за ИХХ диагностика на базата на FFRET. Първото предизвикателство е да се запази общото количество тъканни антигени в пробите, както и мястото на тяхната локализация – ядро, цитоплазма или мембрана. Установено е, например, че при неправилна фиксация на материал от карцином на млечна жлеза, естрогенният рецептор преминава от нормалната си локализация – ядрото, към цитоплазмата. По данни на Американското дружество по патология (APA), до 20% от имунохистохимичните изследвания за естрогенен рецептор са фалшивоположителни или фалшивоотрицателни, като причина за това в най-голяма степен са преданалитичните етапи на обработка на пробите. В диагностичен план, отчитането на положителна реакция в такива проби е неточно. Тъй като ползите от прилагането на ендокринна терапия при пациенти с ниска експресия на ER, напр., са ограничени, фалшивоположителен резултат може да доведе до неправилно лечение на пациента, както и до ненужни разходи на здравеопазната система.

За да се избегне отчитането на фалшивоположителна или фалшивоотрицателна ИХХ реакция е необходима стандартизация както на използвания фиксатор, така и на времето за фиксиране на пробите. Приемането на единен протокол за фиксация позволява от една страна гарантиране точността, достоверността и възпроизводимостта на резултатите от направените изследвания, а от друга старна дава възможност на пациента да извърши нужните допълнителни изследвания в лаборатория, избрана от него.

Този протокол трябва да обръща внимание на три основни компонента:

1. Концентрация на алдехидите във фиксатора;
2. Времето от настъпване на клетъчната смърт до поставяне на тъканта във фиксатор;
3. Съотношение на фиксираща се тъкан към фиксиращ разтвор;
4. Продължителност на фиксацията.

Концентрация на алдехиди във фиксатора

Формалинът представлява 40% воден разтвор на формалдехид. При разтварянето се получава мравчена киселина, която придава кисел характер на фиксатора – pH е около 6. В такава среда, при по-продължителен престой, антигените загубват своята имуногенност. Установено е, че при неутрално pH на формалина те биват „маскирани“, но не са унищожени. Затова във всички болнични заведения е въведена употребата на неутрално буфериран формалин като мярка за повишаване диагностичните възможности при всеки отделен случай. Неутралният буфериран формалин се предлага като готов разтвор, с концентрация на формалдехид – 4%.

Времето от настъпване на клетъчната смърт до поставяне на тъканта във фиксатор

Бързото поставяне на тъканната проба във фиксиращия разтвор е от съществено значение за запазване имуногенността на някои протеини. Както знаем, клетъчната смърт настъпва с лигирането на кръвоносните съдове, хранещи тъканите, подлежащи на операция. До отстраняването на самата биопсия могат да минат до няколко часа, през което време клетките са подложени на лишения, в резултат на което настъпват биохимични промени, клетъчен оток, както и намален митотичен индекс в тумора. За успешното стандартизиране на този етап от обработката на биопсичните проби е необходимо освен патолозите, с протоколите за фиксация да се запознаят и хирурзите, защото те са отговорни за този първи етап от фиксирането на материала. При тъкани,

богати на ензими (черва, панкреас) бързо настъпва автолиза, което може да доведе до силно фоново оцветяване или фалшивоположителна реакция, ако фиксацията е забавена.

Съотношение на фиксираща се тъкан към фиксиращ разтвор

Съотношението между тъканта и фиксатора може да варира в известни граници, като основно правило е, че фиксиращият разтвор трябва да е в обем 10-20 пъти по-голям от обема на материалът, който ще се фиксира. Ако съотношението е по-малко, рискуваме телесните течности да намалят съществено процента на алдехидите във фиксатора, което ще доведе до лоша фиксация. По-голямото съотношение не крие рискове за процеса на фиксация, но ще доведе до излишни разходи в болничните заведения както за фиксиращи разтвори, така и за контейнери за транспортиране на материалите. В търговската мрежа се предлагат контейнери за фиксация и съхранение на хистологичен материал (Фиг. 7), които са с различен обем и не е трудно да се подбере подходящият съд за всяка биопсия. Те са предпочитани пред стъклени буркани, използвани преди десетина години, тъй като са по-леки и не толкова чупливи. Затварянето на тези контейнери е плътно, което не позволява изтичане на фиксатора при транспортиране или изпарение при по-дълго съхранение на биопсиите. Материалът, от който са изработени е съвместим с формалин и е лесен за почистване, което осигурява възможност за многократна употреба.



Фигура 7. Контейнери за фиксация и съхранение на хистологичен материал

Продължителност на фиксацията

Формалинът е един от най-бързо проникващите фиксатори. Проникването, обаче, все още не е фиксация. Формалиновата фиксация е химичен процес, при който имаме ковалентно свързване и образуване на кръстосани пептидно-протеинови връзки. Постигането на висок процент свързване в проба с дебелина от 3 мм става едва след 6-часова фиксация, въпреки че проникването е 100% още на втория час. Така че, за постигане на добри, точни и възпроизводими резултати се препоръчва фиксацията на малки тъканни проби да продължава не по-малко от 6 часа, а за по-големите хирургични биопсии – не по-малко от 24 часа. Имунореактивността на тъканните антигени, обаче, е тясно свързана с времето на експозиция на алдехидите, намиращи се във фиксатора, т.е. прекалено дълъг престой на пробите във фиксиращ реагент не се препоръчва. За оптимално време на фиксация се приема период от 6 до 72 часа.

Второто условие за получаване на качествен хистологичен препарат засяга обработката на материала, изготвянето на парафиново блокче и парафинови срези.

За изготвянето на качествени препарати за светлинна микроскопия е необходимо след фиксацията, тъканта, която се изследва да мине през различни етапи на обработка: обезводняване, просветляване и пропиване с парафин.

Целта на тази обработка е материала да се уплътни, без да бъде крехък и трошлив. Трябва едновременно да се запази формата и структурата на тъканта, но и да бъде възможно изготвянето на тънки срези от порядъка на 3-5 μm . Преди началото на тази обработка от по-големите материали се оформят тъканни късчета с размери около 1/1 см и дебелина 3-4 мм. Така оформени, на тъканите е необходимо да престояват в последващите реактиви не повече от 2 часа, което позволява да се съкрати времето за обработка.

След промиването следва обезводняване на тъканите в поредица от алкохоли с нарастваща концентрация (възходяща спиртна редица). Ако материалът е промиван с вода, обезводняването започва с 50% етилов алкохол. Ако е извършено със спирт, то започва със следващата концентрация от възходящата спиртна редица, т.е., ако промиването става в 80% алкохол, то следващата стъпка е 90% алкохол.

Последният спирт, в който тъканите престояват задължително е абсолютен алкохол, тъй като оставането на вода в тъканите преди прехвърлянето им в просветляващият реактив ги прави трошливи, което не позволява изготвянето на качествени срези в последствие. Просветляващият реактив представлява органичен разтворител, който едновременно „избистря“ тъканното късче и подготвя материала за пропиването с парафин. Подходящи разтворители са ксилол, толуол, бензол, ацетон, като най-често използван е ксилола, заради относително по-малката вредност за работещите с него.

Последната стъпка преди изготвянето на парафиново блокче е пропиване с парафин. Използва се твърд парафин, с точка на топене 56-58°C. Поддържа се разтопен в термостат, нагласен на температура 5-7°C по-висока от точката на топене и при ръчна обработка материалите се пренасят в него. Ако лабораторията разполага с апарат – тъканен процесор (Фиг. 8), той е оборудван с нагряващи се чаши, в които се поставя гранулиран парафин и материалът автоматично се пренася в тях за 3-5 часа.

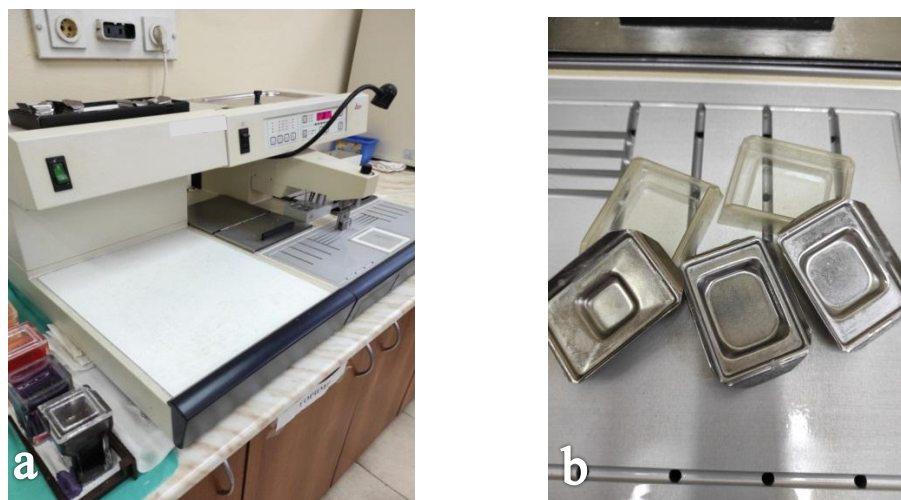


Фигура 8. Тъканен процесор (хистокинет)

На фигура 8а е представен каруселен автоматичен хистокинет, с възможност за запаметяване на 2 и повече програми за обработка на тъканите, което позволява да се използва

пълноценно за различни видове биопсии, а на фигура 8b – автоматичен вакуумен хистокинет, който разполага с капацитет за много голям брой биопсии – между 300 и 600, в зависимост от модела, с възможност за конфигуриране на множество програми, както и с отложен старт. Голямо предимство е системата за мониторинг на реактивите, която не позволява прекомерното им замърсяване, а това осигурява и по-високо качество при обработката на пробите.

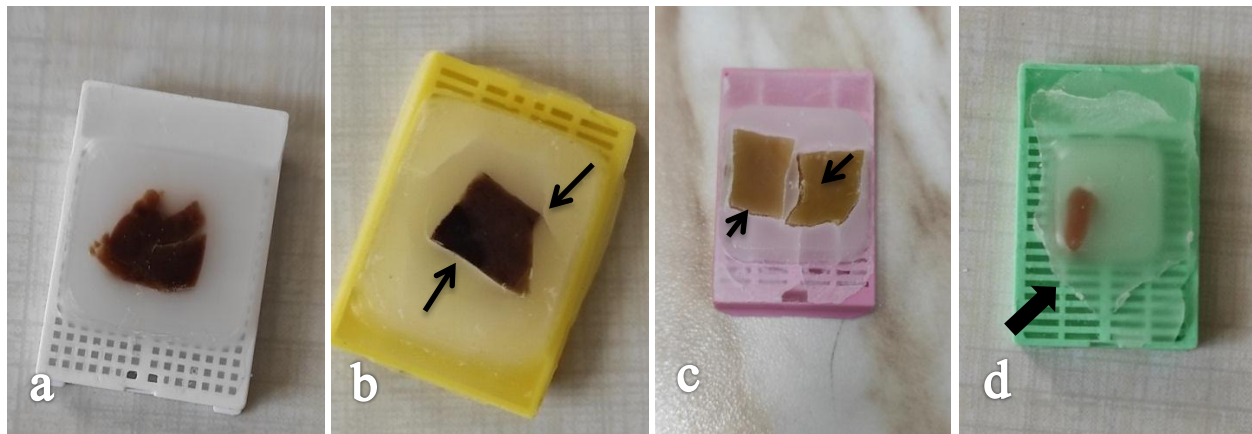
След приключване на пропиването с парафин пристъпване към оформяне на парафиновото блокче. Днес повечето големи патохистологични лаборатории разполагат с парафинов център (Фиг. 9a) – специален апарат, в който много по-прецизно се наглася температурата, на която се поддържа разтопения парафин, снабден е и с масичка за охлаждане, благодарение на което парафиновото блокче се охлажда постепенно. Използват се специални формички с различни размери (Фиг. 9b), в които се оформя блокчето, а това значително улеснява работата на лаборанта.



Фигура 9. Парафинов ембендинг център и профили за оформяне на парафинови блокчета

За оформяне на качествено парафиново блокче от съществено значение е температурата, при която е разтопен парафина, както и на средата, в която ще се охлажда. Гранулираният парафин с точка на топене 58°C се загрява максимум до $65\text{--}68^{\circ}\text{C}$, като е желателно да е престоял в разтопено състояние поне 24 часа, за да може да се отделят дребните мехурчета въздух, които се съдържат в него. Загряването на парафина при температура над 70°C намалява неговата еластичност, става трошлив и в следствие на това се затруднява изготвянето на тъканни срези. Охлаждането на вече оформеното блокче става на стайна температура или на слабо охладена хладилна масичка, в резултат на което имаме компактност между парафина и тъканното късче, без рязка граница между двата различни по своята същност материала (фиг. 10a). Бързото охлаждане води до напукване на блокчето (фиг. 10b [➡]), което значително затруднява изготвянето на качествен срез за микроскопиране.

При изливането на парафиновото блокче трябва да се следи за температурата както на разтопения парафин, така и на материала. Ако той е охладен, парафина замръзва бързо около него и не може да се получи плътно и стабилно съединяване между парафина, биопсичния материал (фиг. 10c [➡]) и хистологичната касета (фиг. 10d [➡]). При рязане на така оформено блокче риска материалът да се „изкърти“ и унищожи е много голям.



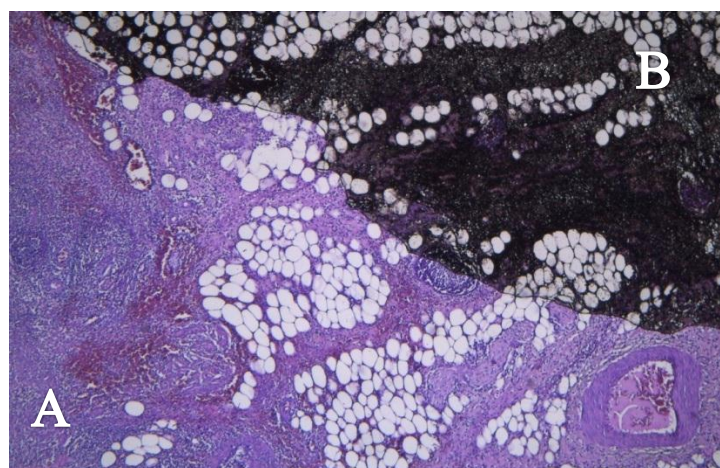
Фигура 10. Проблеми при оформяне на парафиново блокче

Третото условие за изготвяне на качествени препарати за светлинна микроскопия се отнася до методите за оцветяване на различните микроструктури.

При всички видове оцветявания има общи правила, които трябва да се спазват, за да се гарантира качествено оцветяване:

- Боите трябва да са чисти, затова е желателно тези, които се използват многократно да се филтрират преди употреба
- За приготвянето на водно разтворимите бои винаги се използва дестилирана вода
- Използването на по-разредени бои за по-дълго време обикновено дава по-добри резултати спрямо варианта по-концентрирана боя за по-кратко време на експозиция.

Финалният етап от изготвянето на препарат за микроскопска оценка е включване с просветляващ балсам и покривно стъкло. На фиг.11 ясно се вижда разликата между просветления (А) и непросветления (В) участък от срез и невъзможността да се разграничат структурите на тъканта в непросветления участък.



Фигура 11. Просветляване и включване на микроскопски препарат

2.3. Причини за най-често допусканите грешки, в процеса на изготвяне на качествени препарати за рутинна хистология и ИХХ изследване

Имунохистохимичната реакция е вид оцветяване, при което не се използват хистологични бои като оцветители, а се извършва на базата на атиген-антителна реакция, като крайният продукт от нея се визуализира с определен цвят. Имунооцветяването е сложен и многостепен процес, който крие не малко технически капани, които могат да повлияят негативно върху крайният резултат от изследването.

Три са основните етапи, на които трябва да се обърне внимание:

1. Преданалитична фаза – приемането и етиктирането на биопсичния материал, стъпките, през които преминава тъканта до изготвяне на микроскопски препарат.
2. Аналитична фаза – наблюдение на микроскопския препарат и поставяне на диагноза.
3. Постаналитична фаза – водене на документацията.

Преданалитичната и постаналитичната фаза се изпълняват от лаборанта и ще се фокусираме върху грешките, които могат да се допуснат там.

Преданалитичните фактори, които влияят върху способността да се локализира търсеният антиген са:

- Фиксация и обработка на тъканите
- Оформяне на парафиново блокче и изготвяне на парафинови срези
- Антигенно възстановяване
- Апликация на антитялото
- Визуализираща система
- Контрастно оцветяване и включване

1. Грешки при фиксацията на тъканите

Грешките, допуснати по време на обработката на тъканите до оформяне на парафиново блокче са с най-трайни последици. 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.

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

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 пропиване с парафин за няколко часа.

При вземане на материал за имунохистохимично изследване трябва стриктно да се спазват правилата за фиксация.

Фиксацията на биопсичния материал протича на два етапа – първична фиксация, която се осъществява от медицинските специалисти в хирургичното отделение, и вторична фиксация, която представлява фиксация на вече оформени тъканни късчета.

Проблем 1.1 – първична фиксация

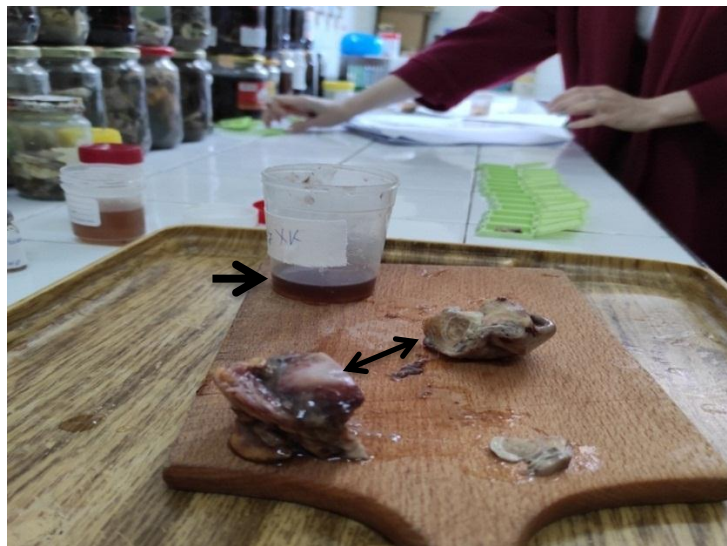
Недостатъчно количество на фиксиращият разтвор, използване на неподходяща среда, забавяне на фиксацията (студена исхемия).

Последствия:

Ако количеството фиксираща течност е недостатъчно, тъканните сокове разреждат фиксатора. Намалената концентрация на алдехиди води до недостатъчно и неравномерно

фиксиране на материала. На фигура 12 наблюдаваме материал, изпратен от хирургична клиника в неподходящ по размер контейнер. На дъното на контейнера е количеството фиксатор [➡], с който е злят материала [↔] в деня на операцията. Той в престолял в този разтвор не по-малко от 18 часа, тъй като по регламент, хирургичните биопсии взети за деня се транспортират до клиниката по патологоанатомия на следващият ден. В резултат на това материалът е недобре фиксиран, което води до два основни проблема:

1. Забавяне на хистологичния резултат с 24 часа, поради необходимост от допълнително време за фиксация.
2. Риск от опорочаване на диагнозата, тъй като процесите на лизиране на белтъците, както и гнилоствните процеси, които протичат в нефиксиран материал водят до невъзможност да се провеждат качествени ИХХ или генетични изследвания.



Фигура 12. Първична фиксация в неподходящ контейнер

- Използването на хипотонична среда (напр. вода) ще доведе до нарушаване на клетъчните стени и увреждане на тъканната морфология
- Забавянето на фиксацията води до изсушаване на тъканта, което я прави твърда и трудна за обработка, може да причини загуба на антигенност.
- Важно е да се знае, че капсулите на някои органи възпрепятстват проникването на фиксатора, което налага органа да бъде разрязан на „филии“, за да се осигури бърза и равномерна фиксация.

На фигура 13 виждаме миомен възел с размери над 10 см в диаметър. Материалът е изпратен в голям контейнер с достатъчно количество формалин, но капсулата на миомния възел не позволява фиксатора да проникне в дълбочина. На снимката ясно се вижда, че процесът на фиксация, който е продължил повече от 20 часа, е протекъл само в повърхностния слой [➡]. Вътрешността на материала [➡] е нефиксирана и негодна за хистологична преценка.



Фигура 13. Неправилна фиксация на капсулован орган

Решение на проблема

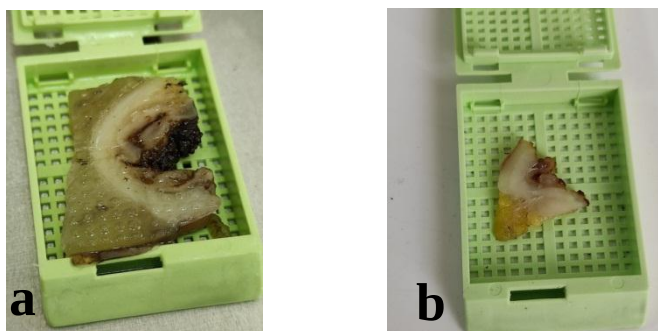
- Предварителен подбор на подходящи контейнери за фиксация и внимателното им зареждане с фиксиращ разтвор
- Запознаване на медицинския персонал с правилата за взимане и фиксиране на материала, особено в случаите с капсуловани органи

Проблем 1.2 – вторична фиксация

Неподходящо оформяне на тъканната проба, продължителност на фиксацията, температура, при която протича фиксацията

Последиствия

- По-голямата дебелина на тъканното късче води до затрудняване на пропиването с всички реактиви. Особено важно е при работа с лимфни възли, кожа и мастна тъкан. Тук дебелината на тъканта трябва да е не повече от 2мм. На фигура 14а наблюдаваме дебело оформен материал за тъканна обработка, което е предпоставка за непълноценно пропиване с всички реактиви. Ясно си личат следите от капачето на хистологичната касетка, което е допълнително увреждане на тъканната структура. На фигура 14b – демонстрация на добре оформено тъканно късче, обработено по всички правила на хистотехниката.

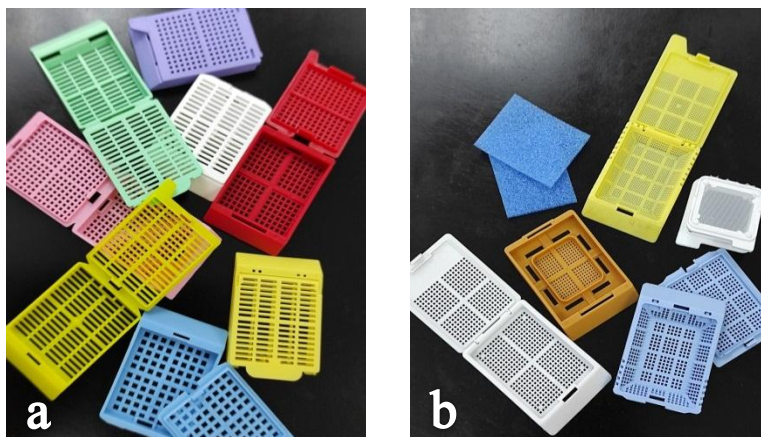


Фигура 14. Оформяне на тъканни късчета за хистологична обработка

- Фиксация по-кратка от 6 часа е недостатъчна за пълното фиксиране на тъканни късчета с дебелина 2-3 мм. Ако такъв материал бъде подложен на последваща обработка за изготвяне на парафиново блокче, то той ще се „дофиксира“ в алкохол, което в последствие се отразява на качеството на имунологичните изследвания.
- Престой във формалин над 72 часа води до свръхфиксация, при която настъпват трайни утвърждения на антигените и невъзможност за прецизиране на диагнозата на пациента, а при някои антигени – миграция на нетипично място в клетката.
- При температури под 10°C фиксацията протича по-бавно и е необходимо по-дълго време, при минусови температури процесът на фиксиране спира.
- Повишената температура – над 30°C ускорява процеса на фиксация, но и автолитичните промени, така че ускоряване на фиксацията по този начин е нежелателна.

Решение на проблема

- Използването на хистологични касетки за водене на материал не позволява оформяне на тъканни късчета с дебелина над 3-4 мм, което предполага спазване на изискването за оптимален размер на материала (Фиг. 15).
- Стриктно следене на движението на биопсичния материал от страна на хистологичните лаборанти, недопускане на неподходящо кратък или прекалено дълъг престой във формалин.
- Осигуряване на помещение за пускане на материал, както и за съхранение на резерви с подходяща температура



Фигура 15. Хистологични касети за еднократна употреба, изработени от полимери, устойчиви на хистологични разтворители. Имат матиран участък за идентификация на тъканните проби, а размерите са съобразени с адаптерите за микротом. Прорезите, през които става обмен на реактиви са с различни размери и позволяват в тях да се обработват както хирургични биопсии с по-големи размери (a), така и дребни щипкови или тънкоиглени биопсии (b)

2. Грешки при Антигенно възстановяване

Фиксирането с формалин омрежва протеините, като по този начин потиска действието на антигените. В резултат на това при провеждане на ИХХ изследване върху фиксирана тъкан голяма част от антителата показват твърде слаба или липсваща реакция. Дълго време това се е приемало като неразрешим проблем и ИХХ изследвания са провеждани само върху срези от замразени нефиксирани тъкани. Разбирането, че промените, които настъпват под влияние на алдехидите са обратими, позволява ИХХ да се прилага върху фиксирани с формалин и включени в парафин тъкани (FFPET).

Първите успешни опити за разкриване на антигени са с помощта на протеолитични ензими (PIER). Те имат способността да прекъсват кръстосаните връзки между протеините, образувани под въздействието на алдехиди, като по този начин правят епитопите отново достъпни за взаимодействие с антителата. Препоръчва се прилагането му върху срези от FFPET. Най-често използваните ензими са трипсин, пепсин, протеаза, проназа и протеиназа К (табл. 1). За оптимално ИХХ оцветяване при използване на ензимно антигенно възстановяване има 4 ключови фактора:

1. рН на ензимния разтвор
2. Ензимна концентрация
3. Температурата, при която протича инкубационния процес
4. Продължителност на инкубацията

Най-критичен момент се явява четвъртият фактор. Инкубацията на срезите с протеолитичен ензим е право пропорционална на времето на фиксация на тъканта. По-дългият период на фиксация не само позволява, но и изисква по-продължителна инкубация с ензим.

Таблица 1. Ензими, използвани за PIER

Ензим	Препоръчителна температура на активация	Препоръчително време за инкубация
Протеиназа К	25-37°C	5 мин.
Трипсин	37°C	10 мин.
Пепсин	37°C	5-20 мин.
Протеаза	37°C	5-20 мин.
Проназа	25-37°C	30 мин.

Многобройни изследвания показват висока ефективност на термичното антигенно възстановяване (HIER). Този метод има различни модификации, като общото между тях е нагряването на срези от парафиново блокче в буферни разтвори до температура около 100°C. Не съществува единен протокол за извличане на антигени. Два основни фактора са ключови за успешното термично антигенно възстановяване :

1. рН на буферния разтвор
2. Условия, при които се извършва нагряването

Въз основа на тези два фактора е разработен подход на тестова батерия, благодарение на който се съставят оптималните протоколи за AR на различните антигени. Класическата тестова батерия включва девет предметни стъкла с монтирани срези от едно парафиново блокче, като тъканта е подбрана така, че гарантирано да експресираща проучвания антиген. Срезите се подлагат на HIER при 9 различни условия. Три проби в буфер с рН 2, загрявани при три различни температурни режима; съответно три проби в буфер с рН 8 и три проби в буфер с рН 10, подложени на същите температурни режими. Оптималният резултат от деветте проби се въвежда като протокол за съответния антиген.

Най-често използвани са: цитратен буфер с рН 6; EDTA буфер с рН 8 и TrisEDTA с рН 10. Избора на буфер с подходящо рН зависи от електричния заряд на антигена, който трябва да се активира. Важно е да се отбележи, че епитопи, които имат киселинна изоелектрична точка (pI) изискват основни буферни разтвори, а епитопи с киселинно pI се разкриват оптимално в алкални буферни разтвори. Като цяло може да се отбележи, че изборът на подходящ буферен разтвор за антигенно възстановяване (AR) е от съществено значение за ефективността на процедурата.

Първоначално цитратният буфер с рН 6,0 се е прилагал за повечето антигени. Напредъкът в разработването на нови антитела, обаче, обръща тази статистика. Трудни за откриване антигени показват специфична имунна реакция при AR в буфери с алкално рН.

Таблица № 2. Средства и апаратура, подходящи за антигенно възстановяване

Метод за HIER	Предимства	Недостатъци
Водна баня	Не изисква скъпо оборудване, лесен контрол на температурата	Бавен, трудоемък процес, трудно се поддържа равномерна температура на загряване
Микровълнова печка	Не е особено скъп уред; Значително се съкращава времето за AR; Предполага се (без да е доказано), че микровълните имат своя принос към антигенното възстановяване.	Разтворът кипи по време на загряване, изисква се периодично доливане; съществува риск от прегряване на срезите; съществува риск от изпадане на срезите от предметното стъкло
Камера под налягане	Не изисква скъпо оборудване; лесен за работа уред; кратко време на загряване; малък диапазон на вариации в температурата	Няма възможност за допълнителен механичен контрол на температурата
PT (Pre Treatment) Module	Лесен за работа; изключително точно поддържа желаната температура; позволява едновременно антигенно възстановяване на голям брой срези; много подходящ при работа с автостейнер	Скъп уред; изисква големи количества буферни разтвори

Термичното антигенно възстановяване изисква загряване на срези от парафиново блокче до температура около 100°C, без да се позволява завиране на течността. Нагряването до по-високи температурни стойности влияе отрицателно върху имуногенността. Могат да се използват различни уреди за достигане на нужната температура, без завиране на буферния разтвор – водна баня, микровълнова фурна, камера под налягане, автоклав (Табл. 2).

Загряване в специален уред на водна баня (фиг. 16a) дава възможност за много точно отчитане на достигнатата температура, като позволява това да се извършва на голям брой проби, поради големия обемна камерата. Тук, обаче, отново се изисква отделяне на много време за проследяване на процеса до достигане на нужната температура, след което да се засече времето за антигенно възстановяване.

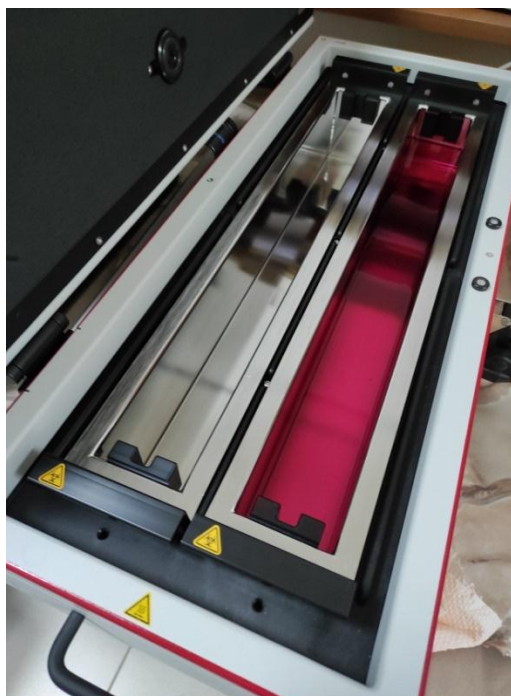


Фигура 16. Уреди за антигенно възстановяване

Използването на камера под налягане (фиг. 16b) позволява оптимизиране на процеса по антигенно възстановяване. При нея на водна баня се поставя кюветата с буферния разтвор и препаратите. Тя има вградени таймер и термометър. Уредът се настройва за определена температура, която се поддържа автоматично. Времето на инкубацията също се настройва предварително. Важното тук е, че времето започва да се отчита автоматично след достигане на зададената температура. Препоръчителното време за антигенно възстановяване е 20 минути, което е най-краткото в сравнение с всички други уреди. Самият разтвор не достига точка на кипене, което дава известна стабилност на срезите върху покривното стъкло и гаранция за запазване на антигенността.

Едно от последните постижения в техниката за термично антигенно възстановяване е едновременното извършване на двата процеса – депарафиниране с AR. Разработеният за целта Pre Treatment Module позволява да се увеличи производителността в хистологичните лаборатории, като съкращава ценно време от предварителната подготовка на препаратите за ИХХ изследване. Освен това тук се постига максимално качество на извършваните процеси. За извършване на процедурата „2 в 1“ се използват водни разтвори на детергенти, а не органични разтворители на парафина. При загряване на тези разтвори до температура близка до 100°C, парафинът, който има точка на топене 56-58°C се разтапя в течността. Добавените в развора повърхностно активни

вещества (ПАВ) спомагат за образуването на емулсия на парафина с разтвора, което го отстранява трайно от тъканните срези. Апаратът е снабден със лесен за работа софтуер, който позволява да се правят разпечатки за всяка стъпка от процеса, има опции за настройка на максимална температура, както и датчик за намалено ниво на течността. Възможността за отложен старт е допълнително удобство, тъй като позволява гъвкавост в работата на лаборанта в съответствие с останалите процеси (Фиг. 17).



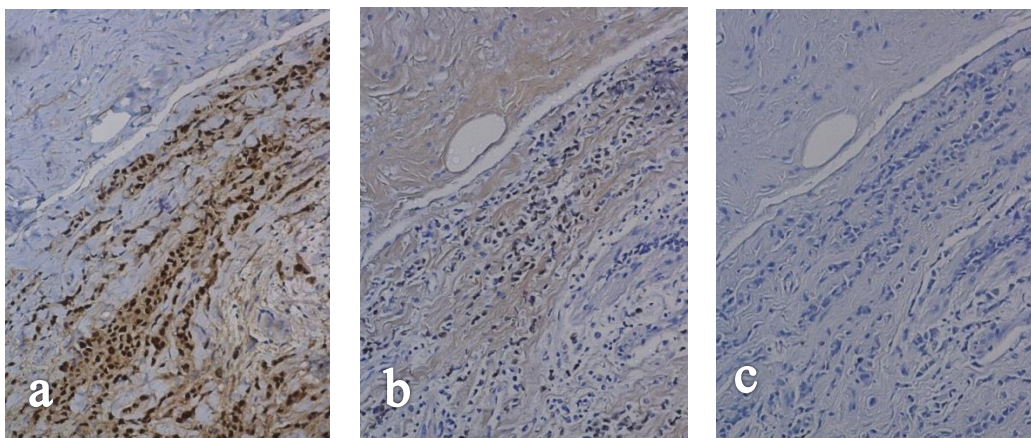
Фигура 17. Модул за термично антигенно възстановяване

Проблем 2.1

Използване на неподходящ метод (ензимен или термичен) за антигенно възстановяване.

Последствия:

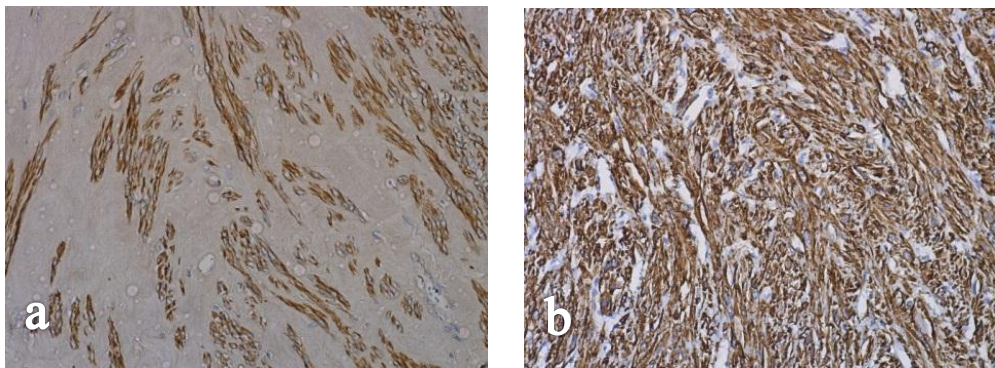
- Фалшивоотрицателен резултат при неправилен избор на метод за антигенно възстановяване или изпускане на тази стъпка (Фиг. 18).



Фигура 18. Влияние на метода за антигенно възстановяване върху ИХХ реакцията

На фигура 18 виждаме изображение на имунохистохимично изследване на естрогенен рецептор при пациентка с рак на гърдата. На фиг. 18a върху среза е приложено термично антигенно възстановяване, както е препоръчителният протокол на фирмата – производител на антитялото, като се наблюдава изразена ядрена експресия. Върху среза от фиг. 18b е приложено ензимно антигенно възстановяване с Протеиназа К. Резултатът е изключително слаба реакция. На фиг. 18c наблюдаваме срез от същия материал, на който не е приложено никакво антигенно възстановяване и съответно имаме пълна липса на реакция. В резултат на грешен избор на метод за антигенно възстановяване, пациентката би загубила шанса за прилагане на адекватно лечение.

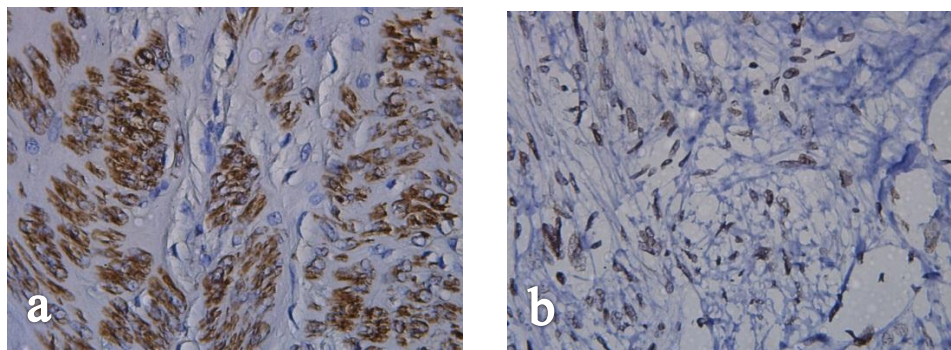
- прилагането на протеолитичното антигенно възстановяване върху тъкани, фиксирани с алкохол е неподходящо. Ако се приложи върху недобре фиксирани във формалин тъкани, при които последващото обезводняване в алкохолната редица се получава вторична алкохолна фиксация, при която настъпва денатурация на протеините, последващо антигенно възстановяване с протеолитични ензими ще доведе до частична или пълна загуба на антигена.



Фигура 19. Сравнение между протеолитично и термично антигенно възстановяване при нефиксиран материал

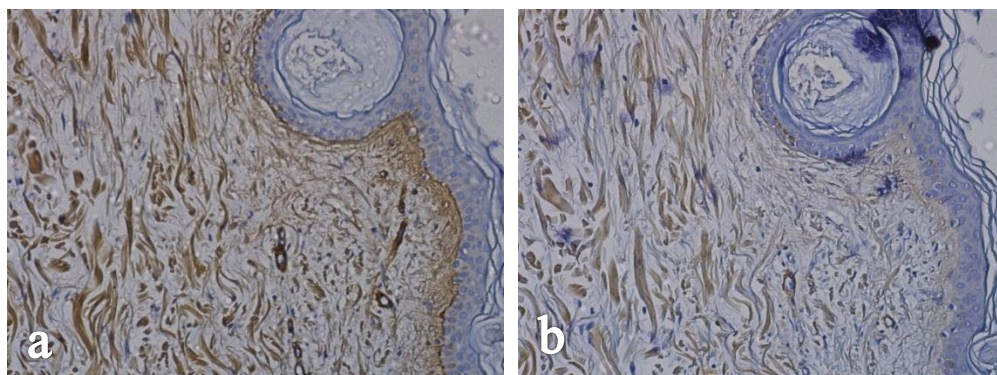
Препаратите от фиг. 19 са изготвени от недобре фиксиран миомен възел, който в процеса на обработката на тъканта до парафиново блокче е претърпял вторична алкохолна фиксация. И двата препарата са инкубирани с едно анти тяло – α гладкомускулен актин. Обработката е идентична, с изключение на използвания метод за антигенно възстановяване. На фиг. 19a е резултатът, който се получава при използването на ензимен метод, а на фиг. 19b – термично възстановяване. Ясно се забелязва изключително слабата реакция при ензимния метод, което е показателно, че антигените са унищожени, а това доказва колко е съществен изборът на антигенно възстановяване при изготвянето на ИХХ препарати.

Част от същия материал беше оставен да се дофиксира във формалин, след което срези, подготвени от това парафиново блокче бяха инкубирани с протеолитичен ензим Пепсин. Добре фиксираният материал показва много добри резултати при разкриването на α гладкомускулния актин (Фиг. 20a), за разлика от недобре фиксираният материал (Фиг. 20b).



Фигура 20. Сравнение между фиксиран и нефиксиран материал при прилагане на протеолитично антигенно възстановяване

- При правилно фиксирани с формалин тъкани най-критичен момент се явява инкубацията на срезите с протеолитичен ензим – тя е право пропорционална на времето на фиксация на тъканта. По-дългият период на фиксация не само позволява, но и изисква по-продължителна инкубация с ензим.
- Някои антитела дават много по-добри резултати при използване на ензимно антигенно възстановяване (Фиг. 21).



Фигура 21. Показани са резултати при инкубиране на еднакви срези с антитяло Collagen IV. Обработени са по един и същи начин, като разликата е само в антигенното възстановяване. Тук определено по-добрите резултати са при използването на ензимния метод (а), докато при термичното възстановяване (b) реакцията е изключително слаба.

Решение

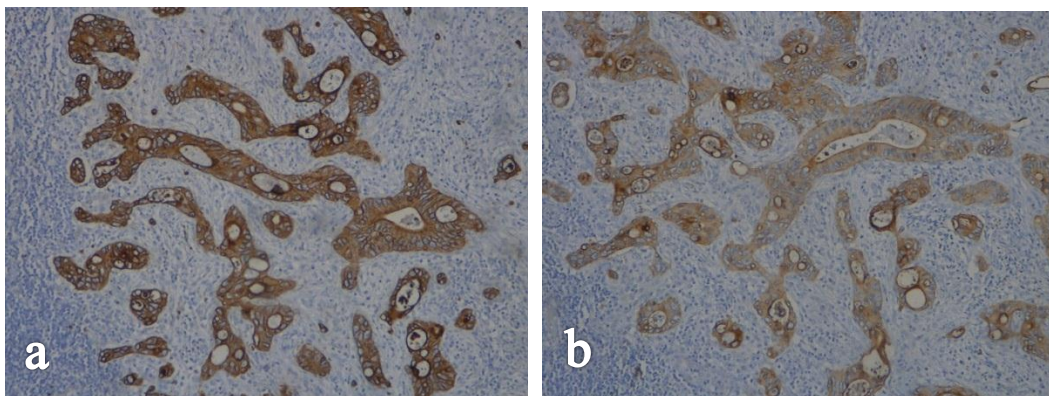
- При работа с фиксирани в алкохол тъкани се прилага HIER
- Стриктно спазване на протоколите, с отбелязване на точното време за фиксация, когато се налага протеолитично възстановяване
- Използване на HIER при ретроспективни проучвания.

Проблем 2.2

Избор на буферен разтвор с неподходящо pH за HIER (Фиг. 22)

Последствия

- Недобро антигенно възстановяване и риск от отчитане на фалшивоотрицателен резултат



Фигура 22. Имунохистохимично изследване демонстриращо експресията на Цитокератин в метастаза в лимфен възел. На фигура 32a е приложено HIER с pH 9 и се наблюдава силна експресия на антигена, а на фигура 32b – HIER с pH 6 и резултатът е много по-ниско качество на реакцията.

Проблем 2.3

Нарушена клетъчна морфология или силно фоново оцветяване (Фиг. 23)



Фигура 23. Причини за нарушена клетъчна морфология при ИХХ изследвания

Решение

- Стриктно спазване на препоръките на производителите на антигела
- При липса на препоръки – експериментиране на място с цел установяване на оптималното съотношение целеви антиген:фоново оцветяване

Проблем 2.4

Загуба на парафинови срези при HIER

Последствия

- Удължаване на времето за изследване и забавяне на резултатите, поради необходимост от повторение на процедурите

Решение

- Използване на предметни стъкла с адхезив (фабрични или приготвени в лабораторията)
- Продължително загряване на монтираните парафинови срези при температура от 60-65°C (от 45 мин до една нощ)

3. Грешки при Апликация на антигелото (Приложение 4)

Проблем 3.1

Продължителност на инкубацията и температура, при която протича

Последствия

- При кратка инкубация и ниска температура – неуспешна реакция антиген-антигел
- При прекомерно дълга инкубация и ниска температура – загуба на антигенната активност

Решение

- Спазване на препоръчителните протоколи
- Разработване на методики, приложими за съответния стил на работа в конкретна лаборатория

Проблем 3.2

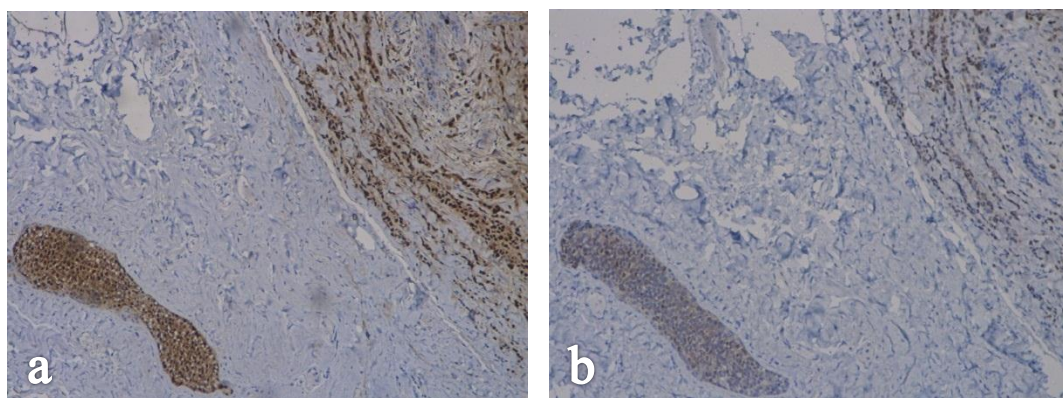
Изсушаване на препарата по време на инкубацията

Последствия

- Загуба на епитоп, риск от фалшивоотрицателна реакция

Решение

- Използване на влажна камера във всички етапи от ИХХ изследването
- Осигуряване на оптимална околна температура



Фигура 24. Изсушаване на препарата по време на инкубацията

На фигура 24 наблюдаваме образци, получени от едно и също парафиново блокче. На фиг. 24а имаме ИХХ изследване, проведено по всички правила и тук се наблюдава силно положителна реакция на естрогенен рецептор, докато на фиг. 24b е допуснато изсушаване на препарата след извършване на антигенното възстановяване. Реакцията е изключително слаба и може да се отчете неправилно, като отрицателна.

Проблем 3.3

Апликация на грешно анти тяло

Последствия

- Отчитане на неточен резултат за пациента или проучването

Решение

- Повишено внимание от страна на хистологичния лаборант
- Осигуряване на добро етикетиране на контейнерите за съхранение на антителата

4. Грешки при прилагане на визуализираща система

Проблем 4.1

Пропускане на стъпката за подтискане на ендогенната ензимна активност

Последствия

- Силно фоново оцветяване
- Фалшивоположително оцветяване

Решение

- Потискане на ендогенната пероксидаза с помощта на H_2O_2 при работа с детекционни системи на базата на хрян-пероксидаза
- Потискане на ендогенната алкална фосфатаза, като се използва левамизол, при работа с детекционни системи на базата на алкална фосфатаза

Проблем 4.2

Ендогенен биотин при работа с тъкани от черен дроб и бъбрек

Последствия

- Силно фоново оцветяване
- Фалшивоположително оцветяване

Решение

- Инкубация с разтвор на авидин и биотин при работа със системи за откриване на базата на авидин/биотин
- Замяна на авидин със стрептавидин, който дава по-ниско фоново светене

Проблем 4.3

Неспецифични протеинови свързвания

Последствия

- Силно фоново оцветяване
- Фалшивоположително оцветяване

Решение

- Инкубация с неимунен серум
- Използване на разрежител на антитела, който съдържа блокиращи протеини

5. Грешки при Контраоцветяване и включване

Проблем 5.1

Използване на спирт след визуализиране на реакцията

Последствия

- Разтваряне на цветната реакция и отчитне като отрицателна

Решение

- Не се извършва дехидратация на готовите препарати във възходяща спирна редица
- Използване на водноразтворими бои за контраоцветяване

Проблем 5.2

Използване на контраоцветяваща боя с малък контраст с цвета на ИХХ реакцията

Последствия

- Невъзможност за отчитане точната локализация на реакцията антиген-антитяло

Решение

- Контраоцветяване с хематоксилин на Майер, метиленово зелено при използване на 3,3'-диаминобензидин тетрахлорид (DAB) хромоген, който дава кафява утайка или 3-амино-9-етилкарбазол (АЕС), който дава черна утайка
- Контраоцветяване с бързо ядрено червено или основен фуксин при използване на 5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат (BCIP) или нитро син тетразолиев хлорид (NBT), които дават синя цветна утайка.

Проблем 5.3

Включване в смоли при работа с хромогени, чиито реакционни продукти са разтворими в ксилол

Последствия

- Разтваряне на цветната реакция

Решение

- Използване на водни включващи среди

6. Чести грешки, водещи до фалшиви резултати при ИХХ и ИФ изследвания

Фалшивоположителни резултати

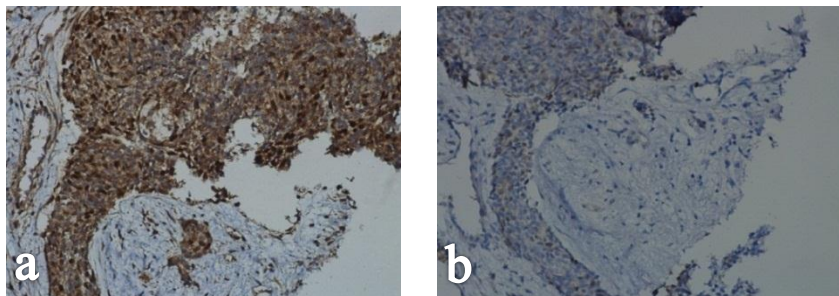
- използване на яйчен албумин или серум като лепило върху предметните стъкла;
- недобро измиване след всяка инкубация;
- дебели срези ;
- прилагане върху замразени нефиксирани срези;
- нисък титър на антитялото (при работа с концентрирани антитела);
- прилагане на визуализиращи системи на база (стрепт)авидин при тиреоидна тъкан.

Фалшивоотрицателни резултати

- Неправилно съхранение на антителата

Правилното съхранение на антителата, както и на останалите реактиви за ИХХ ще намали проблемите с неправилно отчетени проби. Неспазването на температурния режим може да е една от причините за получаване на фалшиво отрицателна ИХХ реакция. Използването на нечисти съдове и пипети при разреждане и накапване води до замърсяване на реактивите, което от своя страна също може да бъде причина за получаване на фалшиви резултати.

- Висок титър на антитялото или неподходящ разреждащ буфер (при работа с концентрирани антитела);
- Използване на антитела с ниска чувствителност или специфичност – антигенното възстановяване влияе върху чувствителността, но не и върху специфичността на реакцията;
- Работа с готови прафинови срези, съхранявани дълго време при неподходящи условия;
- Използване на детекционна система с ниска чувствителност, при търсене на слабоекспресирани антигени (Фиг. 25).



Фигура 25. Изследване на BrCA с прилагане на система за усиление на сигнала (a) и без прилагане на система за усиление на сигнала (b)

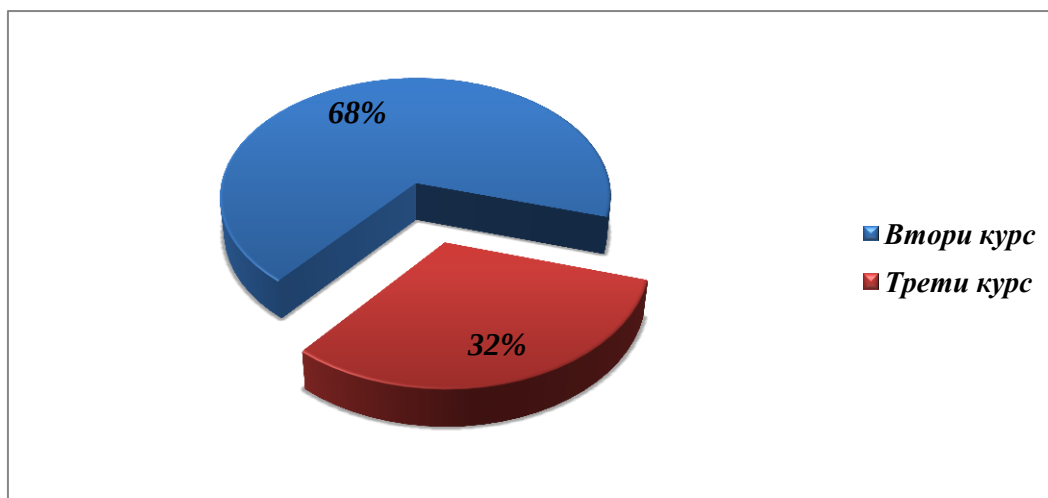
2.4. Мнение на студенти от специалност „Медицински лаборант“ и преподаватели в медицинските колежи относно нуждите от обучение по хистотехника

Във връзка с проучване ролята на обучението на студенти за придобиване на професионална квалификация „Медицински лаборант“ и отражението му върху качеството в патохистологичната лаборатория бяха проведени анкети сред 114 студенти от специалността „Медицински лаборант“.

Анкетираните студенти са от втори и трети курс на обучение и са разпределени както следва:

II курс – (n = 78) – 68.4%

III курс – (n = 36) – 31,6% (Фиг. 26)

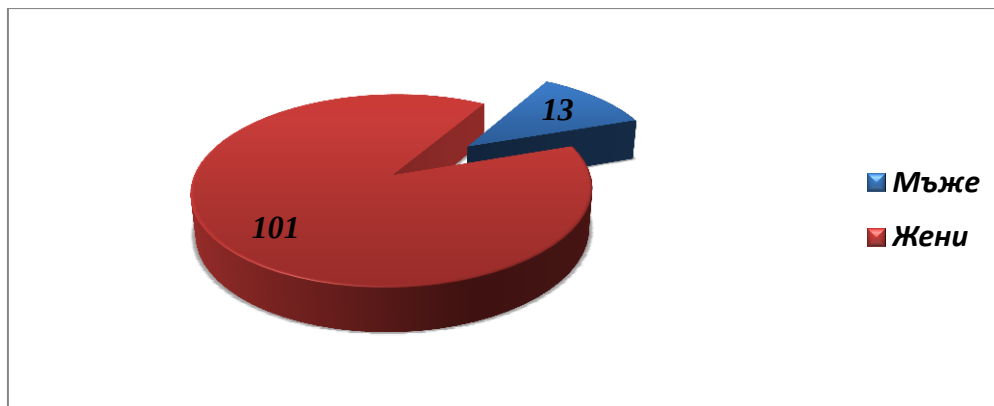


Фигура 26. Разпределение на студентите по курс на обучение

Студенти от първи курс не са анкетирани, тъй като учебната дисциплина „Хистотехника“ се изучава в трети семестър, учебната практика е в четвърти семестър, а преддипломният стаж е в шести семестър.

Разпределението по пол е както следва:

- Мъже (n = 13) – 11,4%
- Жени (n = 101) – 88,6% (Фиг. 27)



Фигура 27. Разпределение на студентите по пол

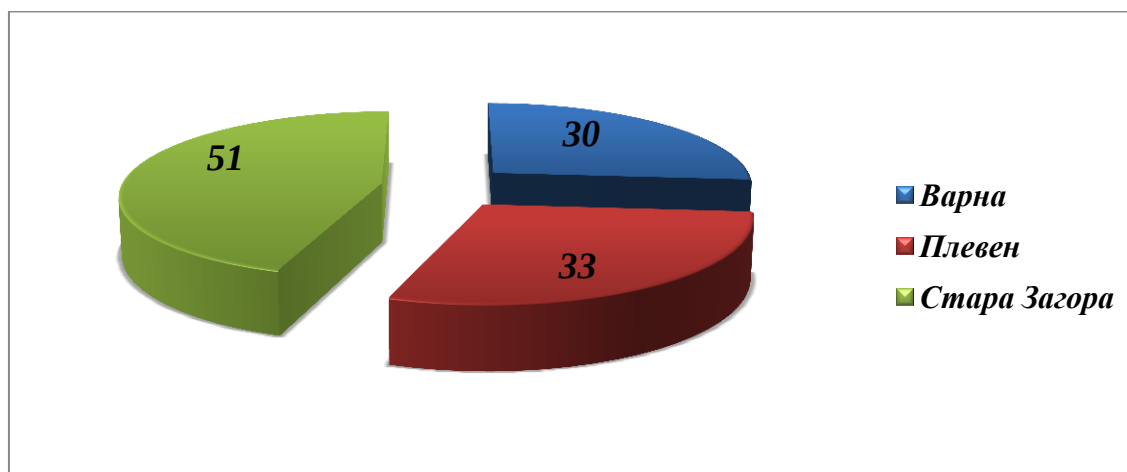
От разпределението по пол се вижда, че сред студентите от специалността преобладават жените (101, или 84,6%), като тенденцията се запазва до момента.

Средната възраст на обучаващите се е 22.52 (mean 22.52 $\pm$ 4.428), min 19; max 49.

По местообучение студентите са разпределени както следва:

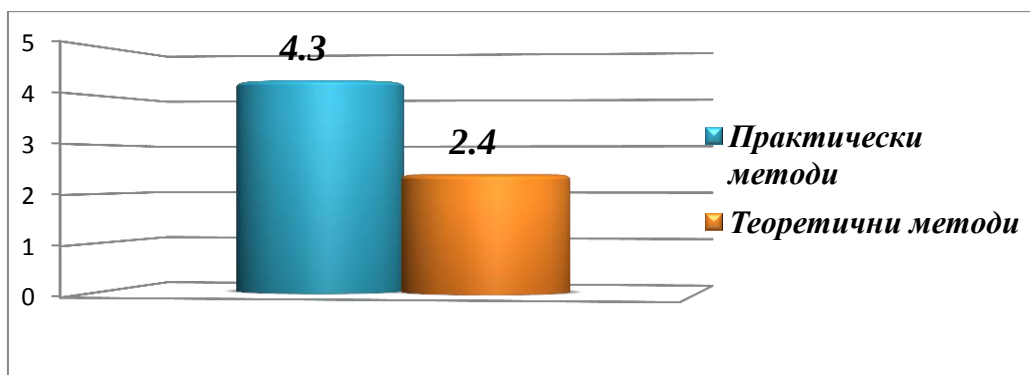
- Стара Загора (n = 51) – 44,7%
- Плевен (n = 33) – 28,9%
- Варна (n = 30) – 26,3% (Фиг. 28)

Анкетирани са студенти от три медицински колежа в страната, предлагащи обучение в специалността „Медицински лаборант“ – Плевен, Варна и Стара Загора. Студентите от Стара Загора са най-многобройни, тъй като анкетите с тях са провеждани в периода от 2017 до 2023г., докато студентите от Плевен и Варна са анкетирани само през 2023 година.



Фигура 28. Разпределение на студентите по местообучение

Потърсихме мнението на студентите относно степента на трудност при усвояване на учебният материал и влиянието на теоретичните и практическите методи по време на обучението им. Помолихме ги да оценят ефективността на двата метода по скала от 1 до 5, като 1 е най-висока степен на трудност, а 5 – най-достъпно за усвояване (Фиг. 29). Средната оценка на студентите за практическите методи на преподаване е 4.3, което се равнява на отлична оценка, докато за теоретичните методи е среден 2.4. Сравняването на двата метода показва статистическа тенденция в полза на ефективността на практическите методи на обучение ($p=0.024$) ($\chi^2=19.181$).

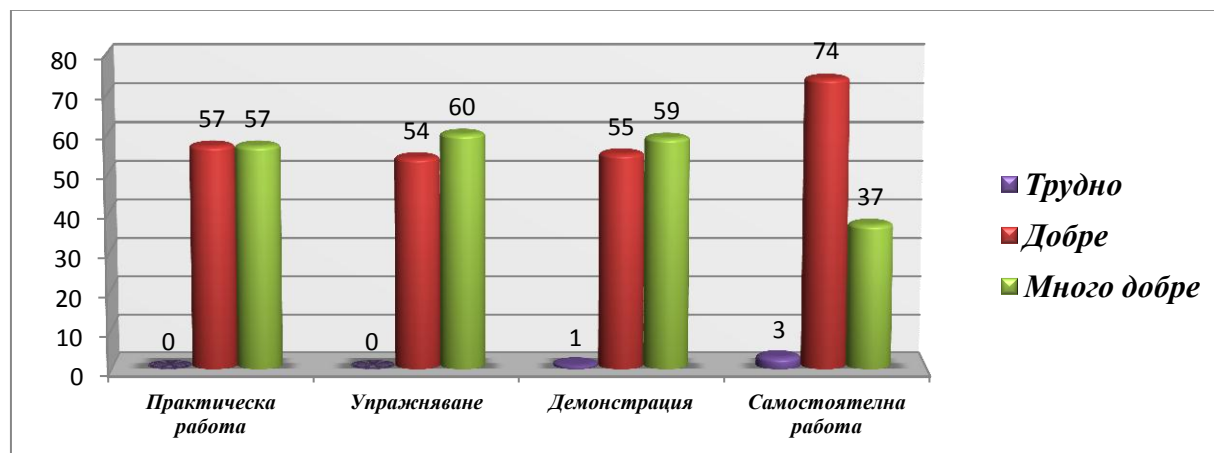


Фигура 29. Оценка ефективността на теоретичните и практическите методи на обучение

За да проверим истинността на оценяването, помолихме студентите да оценят степените на трудност при усвояване на учебния материал.

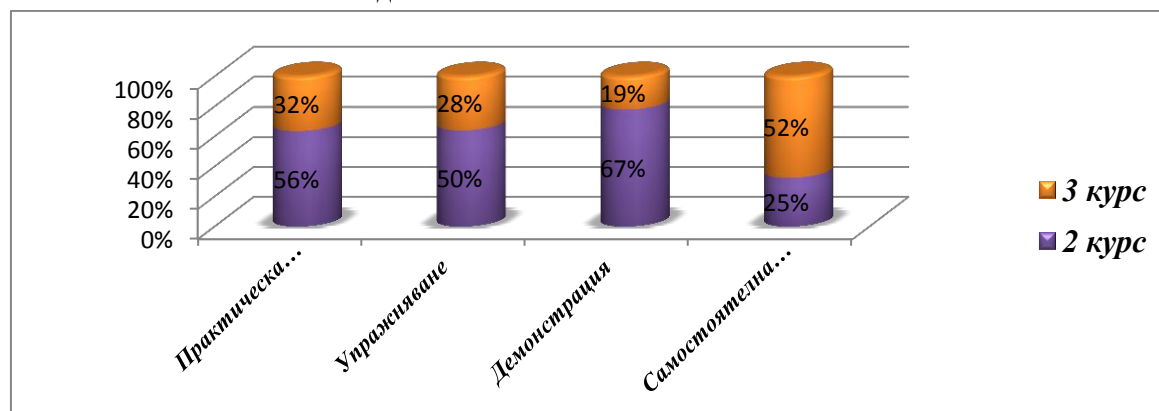
От практическите методи на преподаване се интересувахме от следните 4 метода: практическа работа, упражняване, демонстрация и самостоятелна работа.

Както се вижда от графиката на фигура 30, студентите оценяват високо три от методите на преподаване (практическа работа, упражняване, демонстрация), докато при самостоятелната работа 2/3 от студентите изпитват известни затруднения. За големи трудности при демонстрация и самостоятелна работа споделят само четирима студенти.



Фигура 30. Обща оценка степента на възприемане на учебния материал при прилагане на различни практически методи на обучение

Практическа работа, упражняване и демонстрация са сред предпочитаните практически методи на обучение предимно при студентите от втори курс (над 50% от далите висока оценка на тези методи са второкурсници). Това показва, че в този етап на обучението си те осъзнават важността на практическите дисциплини, както и отговорността, която носят за качествено провеждане на всяко едно изследване. Но все още не се чувстват достатъчно компетентни, за да изпълняват самостоятелни задачи.



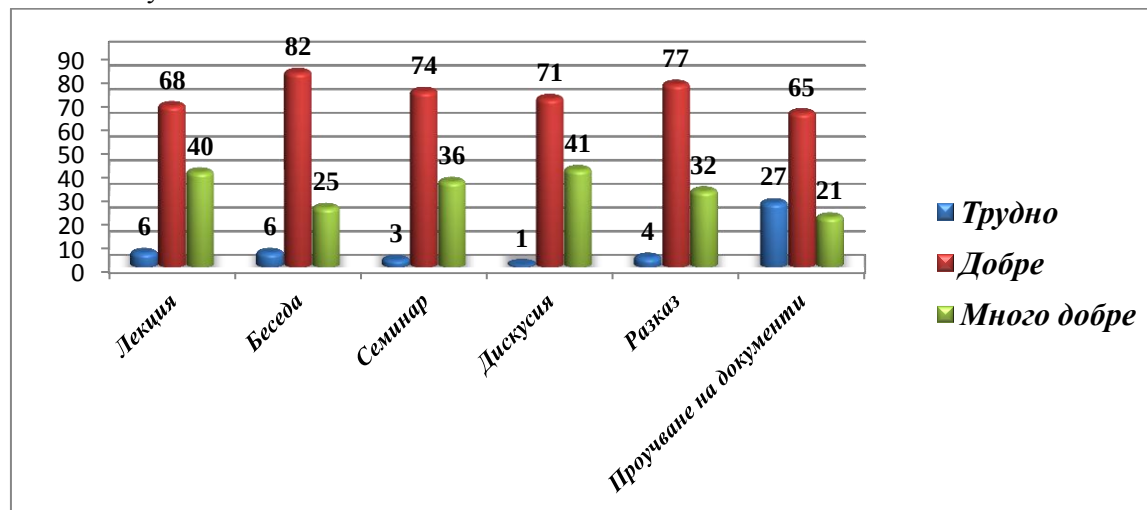
Фигура 31. Оценка степента на трудност на усвояване чрез прилагане на различни практически методи на обучение според курса на обучение

Методът „самостоятелна работа“ е оценен високо от студентите трети курс. Само трима от тях са отбелязали отговор „добре“, всички останали предпочитат този метод на преподаване, като 52% дават максимална оценка на метода. Това се обяснява с факта, че по време на цялостното обучение, натрупвайки знания и умения, студентите добиват професионално самочувствие и желание за самостоятелно изпълнение на поставени задачи (Фиг. 31)

От теоретичните методи на преподаване потърсихме мнението на студентите за следните: Лекция, Беседа, Семинар, Дискусия, Разказ и Проучване на документи.

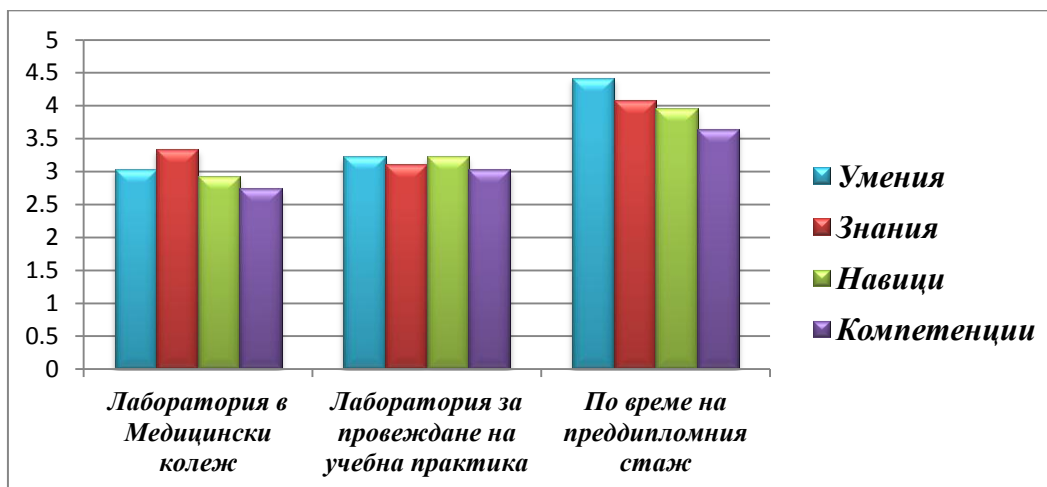
Както се вижда от графиката на фигура 32, отговор „Трудно“ е даден от между 2,6% и 3,5% от анкетираните студенти, в зависимост от теоретичния метод, като изключение прави методът „Проучване на документи“, който се определя като много затрудняващ от 23,7% от анкетираните студенти. Най-голям е процентът на студентите (между 59,6% и 71,9% в зависимост от теоретичния метод), посочили средно ниво на трудност при усвояване на учебния материал при различните теоретични методи на преподаване. 1/3 от анкетираните оценяват теоретичните методи на преподаване като много ефективни. В сравнение с практическите методи на обучение, теоретичните са получили по-ниски оценки за ефективност. Като най-ползотворни към обучението си, студентите определят лекцията и дискусията. Лекцията е пасивен метод на възприемане на материала, но тя е основополагаща за получаване на основни знания по всяка тема. След лекция, най-висока оценка е дадена на Беседа. Този метод на преподаване се предпочита, най-вероятно, поради факта, че протича в почти неформална обстановка, студентите са освободени от страха от оценяване и могат свободно да изразят своето мнение по дискутираните въпроси, както и смело да задават въпроси, които са останали недоизяснени по време на лекциите.

С най-високо ниво на трудност при обучението е оценен метода „проучване на документи“. 50 % от студентите го определят като относително ефективен, но за 25 % от тях той е с високо ниво на трудност. Това показва, че този метод не е за предпочитане от студентите по време на тяхното обучение.



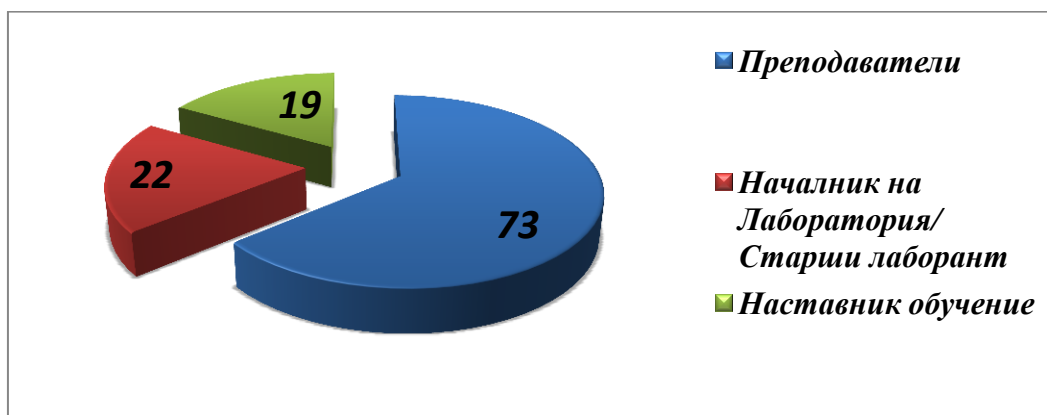
Фигура 32. Обща оценка на степента на трудност при прилагане на различни теоретични методи на обучение

Относно провеждането на практическото обучение, помолихме студентите да оценят по 5-степенна скала местата, където то протича. Лабораториите в медицинските колежи и лабораториите за провеждане на учебна практика са оценени с добра оценка – между 3.1 и 3.3 от максимална 5. Много добра оценка, обаче, е дадена от студентите за протичане на обучението им по време на преддипломния стаж – 4,4 за придобиване на умения, и малко под 4 за знания, навици и компетенции. (Фиг.33)



Фигура 33. Ефективност на придобиване на практически умения в различни звена

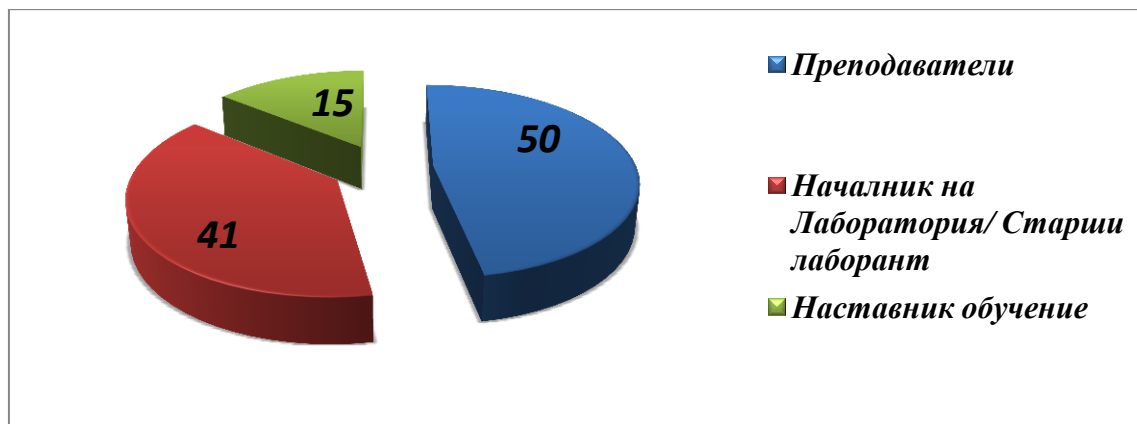
Друг въпрос от който се интересувахме е: “От кого получавате най-голяма подкрепа по време на учебната практика?” (фиг. 34). Най-голям брой студенти – 73 са посочили, че това са техните преподаватели, 22 са посочили старшите лаборанти към лабораториите и 19 – наставниците.



Фигура 34. Степен на подкрепа по време на учебната практика

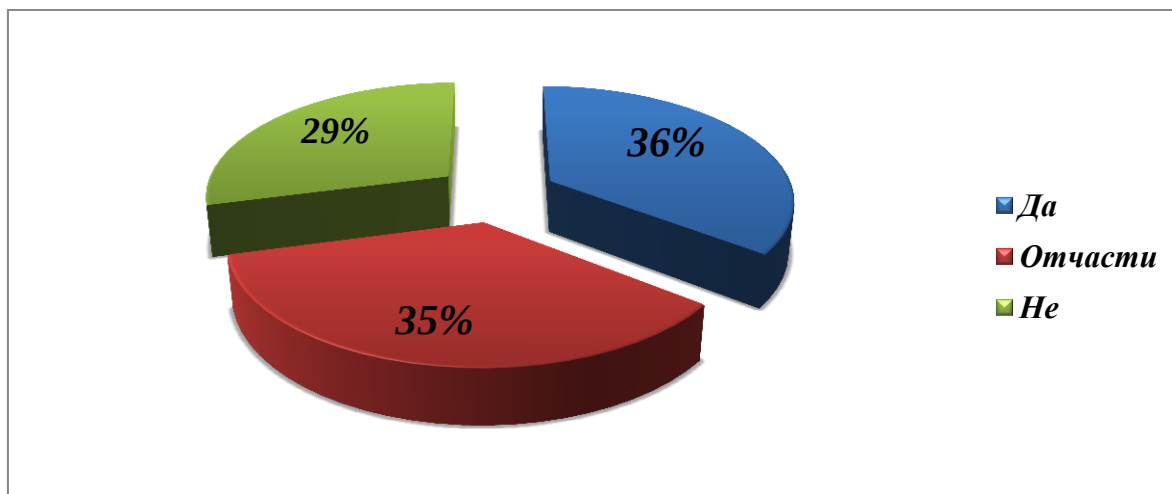
Подобни са и отговорите на въпроса, свързан с преддипломния стаж. Тук старшите лаборанти оказват малко по-голямо съдействие и подкрепа на студентите, за сметка на преподавателите. Това се обяснява с факта, че студентите по време на преддипломния си стаж са придобили основните знания и умения, както и самочувствието, че могат да се справят с

възложените задачи. Наставниците и тук оказват слаба подкрепа – едва 15 студента са посочили този отговор (Фиг. 35).



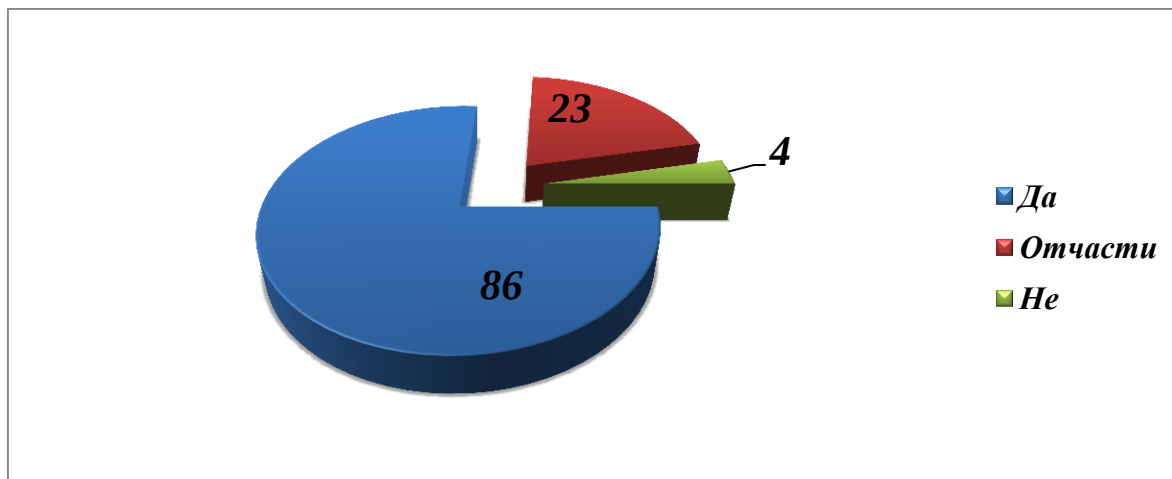
Фигура 35. От кого получавате най-голяма подкрепа по време на преддипломния стаж

Отношението на наставника при обучението на студентите е ключово, особено при преддипломния стаж. По време на учебната практика е приемливо студентите да очакват и да получават най-голяма подкрепа от своите преподаватели, тъй като връзката преподавател-студент е много здрава, има голямо доверие между двете страни, преподавателят е човекът, който ги насърчава за бъдещо развитие. Но по време на учебната практика наставникът е този, който трябва да заеме мястото на преподавателя. В специализираните медицински лаборатории, каквато е и патохистологичната лаборатория, е задължително участието на наставник в обучителния процес. В повечето случаи преподавателят не може да е запознат с тънкостите в патохистологичните изследвания и не може да предаде нужните познания и умения за работа в такава лаборатория. Това поставя въпроса за подготовката на лабораториите, които приемат на обучение студенти от специалността „Медицински лаборант“. Много често старши лаборантите имат допълнителни административни ангажименти, което не им позволява да отделят нужното време за обучение на стажантите и прехвърлят това задължение на редовите лаборанти. Освен богат опит в хистологичната лаборатория, от учителя се изисква да притежава и определен набор от комуникативни и управленски умения. На първо място е умението за представяне на устно изложение, придружено с примери от практиката, с цел да грабне вниманието на студентите и да успее да го задържи през цялото време на обучението. Трябва да притежава и ефективни умения за слушане, което е ключово при осъществяване на обратната връзка наставник – студент. Не на последно място, наставникът трябва да умее добре да управлява времето, с което разполага, за да съумее да каже най-важните неща, да ги подкрепи с примери, както и да остане време за демонстрация и практическо изпълнение на задачи. Наставникът трябва да следи за правилното изпълнение на поставените задачи, да коригира при нужда, както и да похвали при правилно изпълнение на задачата. Всичко това показва, че наставникът трябва да премине през обучение, което ще му позволи да разгърне потенциала си в една друга посока – на обучител.



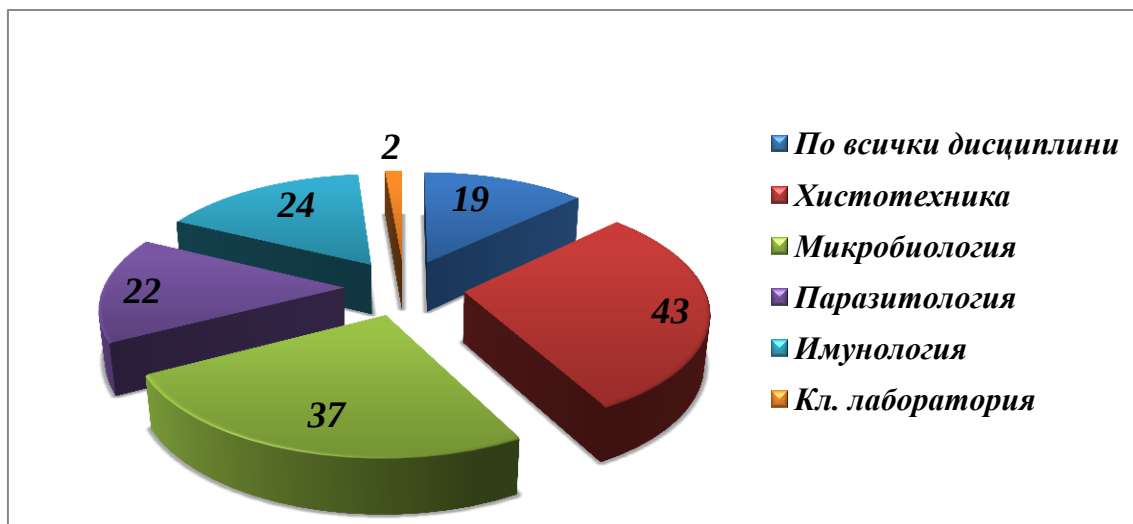
Фигура 36. Считате ли, че часовете по практическа подготовка по хистотехника са достатъчни за усвояване на учебния материал?

На въпроса „Считате ли, че часовете по практическа подготовка по хистотехника са достатъчни за усвояване на учебния материал?“, само 1/3 от студентите смятат, че часовете са достатъчни за усвояване на хистологичните техники (Фиг. 36). Останалите имат желание за увеличаване на тези часове, като 109 от тях смятат, че това би имало положителен ефект върху тяхното обучение. (Фиг. 37)



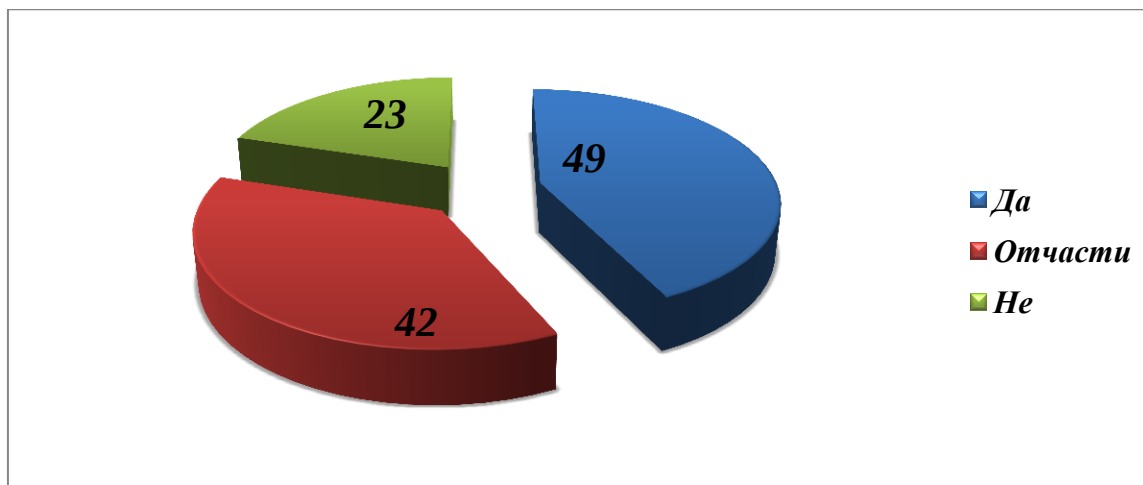
Фигура 37. Според Вас, увеличаването на часовете по практика по хистология и хистотехника ще има ли положителен ефект върху обучението Ви?

Това се доказва и с отговорите на следващият въпрос: „Според Вас, необходимо ли е увеличаване на часовете по практика и ако ДА, по кои дисциплини?“. Повечето от студентите имат желание за повече часове по практика по всички дисциплини, а конкретно за хистотехника положителен отговор са дали 43-ма студенти (29%) (Фиг. 38). Това може да се обясни с факта, че дейностите в хистологичната техника са предимно мануални. Много малка част от процесите са автоматизирани. Протоколите за работа с апаратура днес не могат да затруднят нито един студент. Когато се налага ръчна работа, обаче, винаги е необходимо много повече време за усвояване на процедурите.



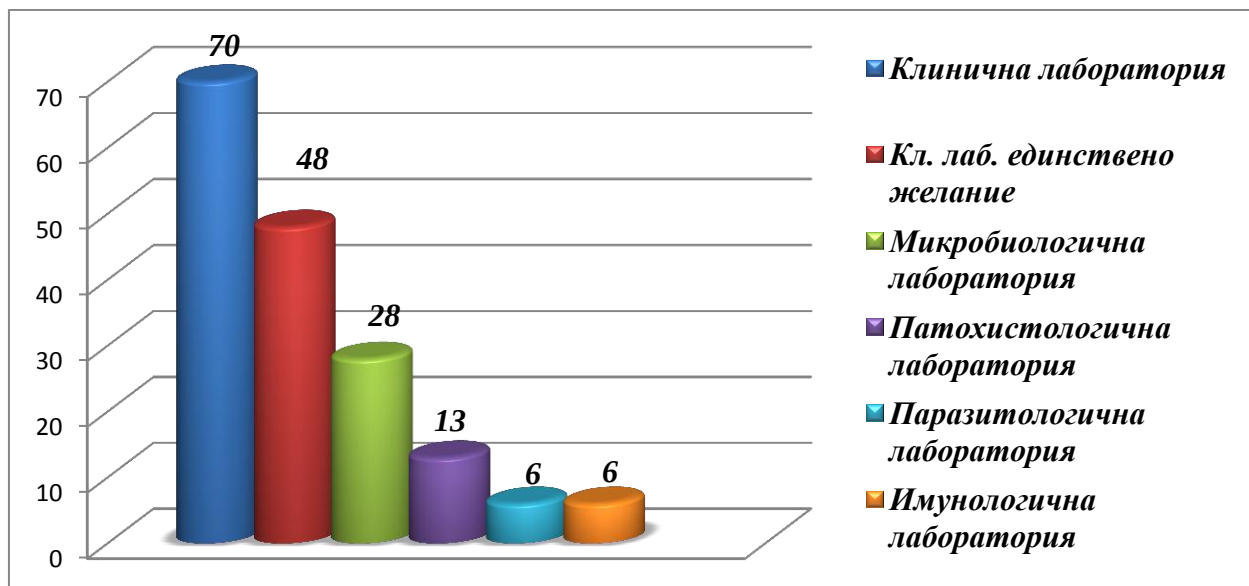
Фигура 38. Необходимост от увеличаване на часовете по практика

Относно теоретичните часове по хистотехника, студентите също декларират желание за увеличаването им, като смятат, че това ще има положителен ефект върху тяхното обучение. Както се вижда от графиката, само 23 студента смятат, че теоретичните часове по хистотехника са достатъчни. (Фиг. 39)



Фигура 39. Според Вас, увеличаването на часовете по теория по хистология и хистотехника ще има ли положителен ефект върху обучението Ви?

На въпроса, в каква медицинска лаборатория биха желали да се реализират след дипломирането си, 70 от анкетираните студенти са посочили клинична лаборатория, като за 48 от тях това е единствено желание. Следва микробиологичната лаборатория с 28 желаещи да работят в тази сфера, а патохистологичната лаборатория е сред непопулярните места за реализация – едва 13 от анкетираните студенти са я писали като вариант за работа, като само един студент е посочил като единствено желание. (Фиг. 40)



Фигура 40. В каква медицинска лаборатория бихте желали да се реализирате след дипломирането си?

От анкетите се вижда, че въпреки интереса към дисциплината „Хистотехника“ в процеса на обучение, много малко студенти споделят желание да продължат професионално в хистологична лаборатория. Изразено в проценти, желанията изглеждат по следният начин: 87% от анкетираните искат да се реализират в клинична лаборатория, като за 50% от тях това е единствено желание. 22,4% са посочили микробиологична лаборатория като място, където биха желали да работят, а патохистологичната лаборатория е на последно място с едва 10% от анкетираните студенти.

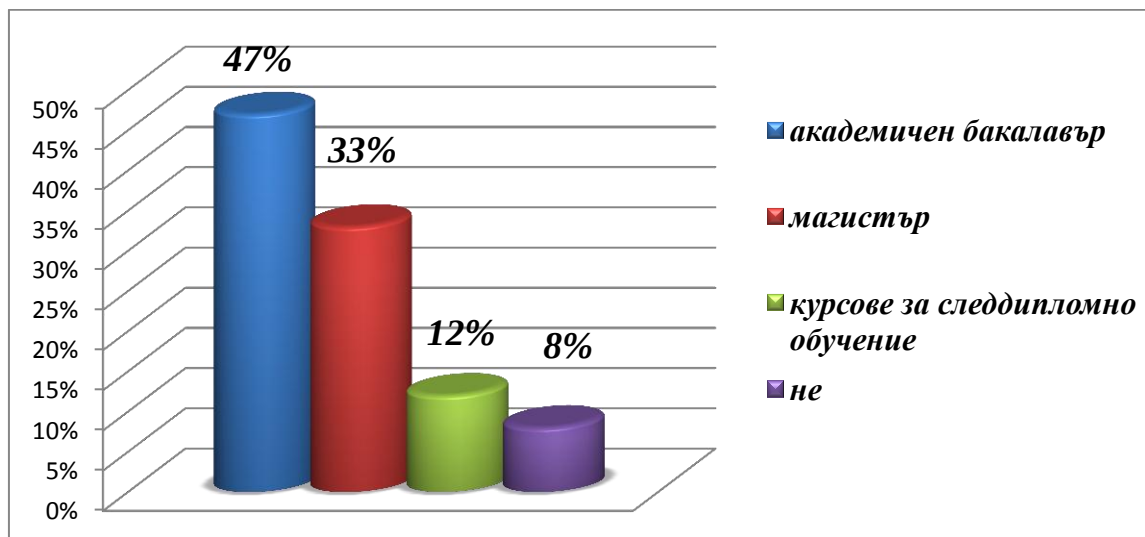
Това може да се обясни с няколко причини:

1. Липса на автоматизация в работния процес.
2. Вредна среда
3. Ниско заплащане
4. Недобро познаване същността на дейностите

Един добър наставник, обаче, би могъл да промени статистиката. Работата в патохистологична лаборатория има много предимства, но ако няма кой да те запознае с тях, ще си остане непривлекателно място за реализация. Освен работното време – 6 часов работен ден, без нощни и празнични дежурства, които са плюсове от битов характер, тази професия има изключително важна роля в диагностичната сфера. Хистологичната диагностика става все по-търсена, и точно поради факта, че много от процесите ме могат да бъдат автоматизирани, професията „Хистологичен лаборант“ е едновременно трудна, но и предизвикателна. В хистологичните лаборатории се извършват както рутинни изследвания на доброкачествени заболявания, така и прецизни изследвания за типизиране на злокачествени новообразувания и генетични техники за определяне на персонализирана терапия на всеки един пациент. Това изисква висока организация на работата от страна на хистологичния лаборант, овладяване и прилагане на утвърдени и стандартизирани работни процедури, обучение в най-новите технологии, което води до подобряване на качеството на работата и висока удовлетвореност от положения труд.

На следващия въпрос: „След приключване на обучението си в специалност „медицински лаборант“ бихте ли продължили да се обучавате?“ 47% от студентите отбелязват, че биха

продължили обучението си в степен „Академичен бакалавър“, 33% - в степен „Магистър“ и само 12% са наясно, че след завършване на професионалното си образование трябва да поддържат и повишават нивото си на познания и умения през целия трудов път. 8% от анкетираните студенти нямат никаква амбиция за придобиване на нови знания и умения. (Фиг. 41)

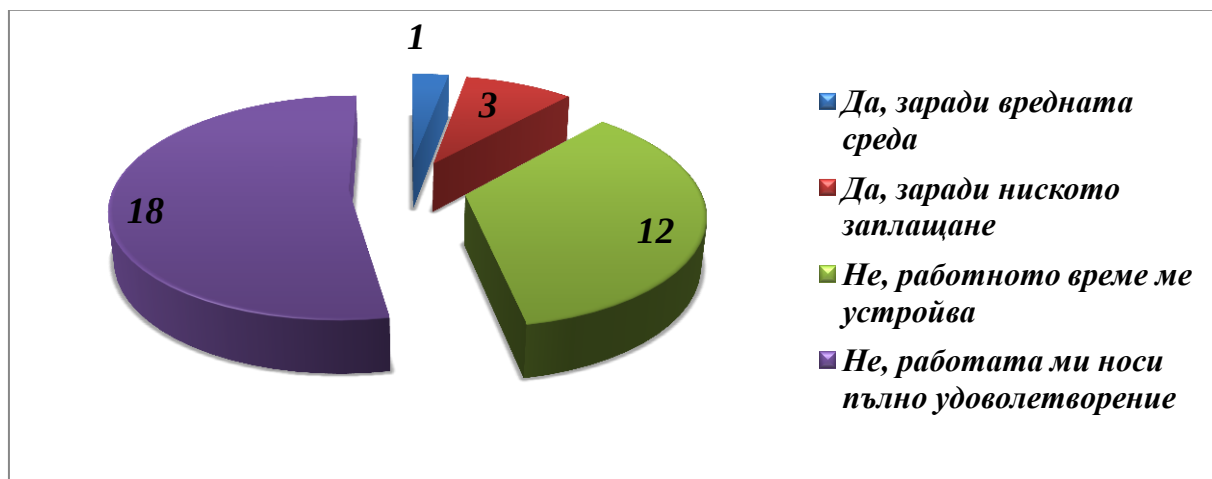


Фигура 41. Желание за следдипломно и продължаващо обучение

2.5. Мнение на хистологични лаборанти относно необходимостта от продължаващо обучение и в частност необходимостта от допълнителна квалификация за извършване на ИХХ и ИФ изследвания

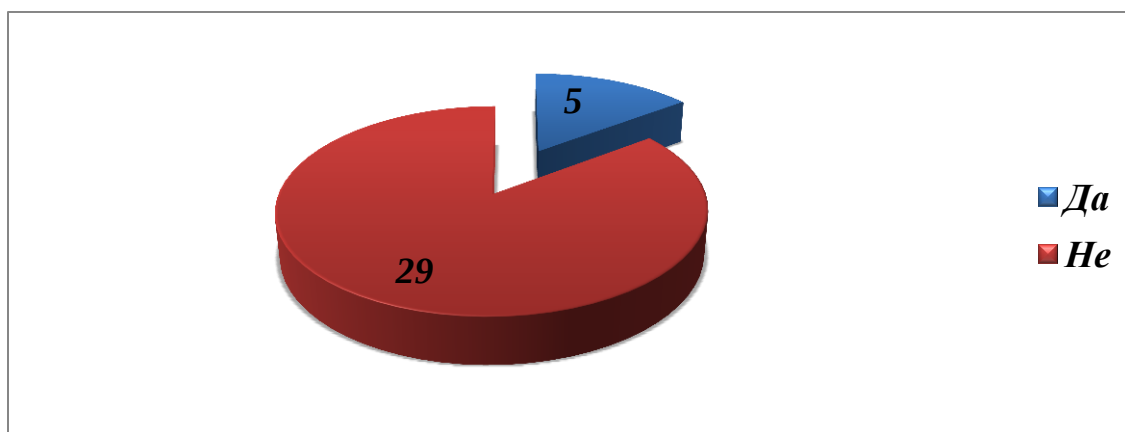
Във връзка с проучване ролята на обучението на медицинските лаборанти и отражението му върху качеството в патохистологичната лаборатория бяха анкетирани 34 хистологични лаборанта.

На въпроса „Бихте ли избрали да работите в друг вид лаборатория и защо?“, 53% от анкетираните са заявили, че работата им носи пълно удовлетворение и не биха я заменили за друга. От всички анкетирани само четирима лаборанти са склонни да сменят работата си, като причината е ниското заплащане и вредната среда, в която се работи (фиг. 42).



Фигура 42. Бихте ли избрали да работите в друг вид лаборатория?

Въпреки факта, че от 34 анкетираните лаборанта, само пет са доволни от заплащането, има и други фактори, които влияят върху избора им да останат да работят в патохистологична лаборатория (Фиг. 43).

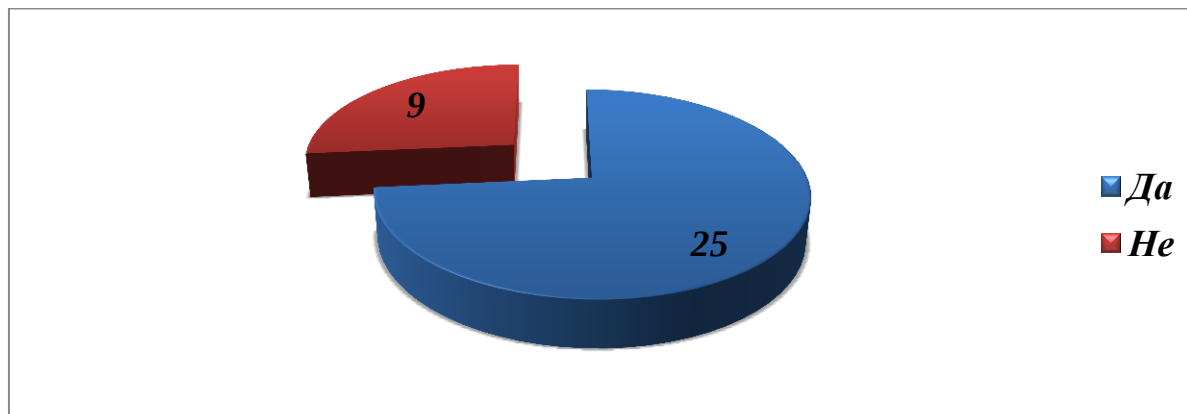


Фигура 43. Удоволетвореност на лаборантите от заплащането

За голям брой от тях работното време е изключително примамливо, но най-много от анкетираните споделят, че работата им носи пълно удовлетворение.

На въпроса „Какво в работата в хистологична лаборатория Ви носи най-голямо удовлетворение?“ отговорите са свързани най-вече с ролята на лаборанта при диагностициране на редица заболявания, както и с факта, че работят в добър екип от професионалисти.

Отговорите на следващите въпроси показват, че лаборантите в трудоспособна възраст се стремят да отговарят на високите изисквания за участие в такъв екип и смятат, че имат нужда от постоянно повишаване на своята квалификация.



Фигура 44. Смятате ли, че са необходими допълнителни курсове за повишаване на квалификацията Ви?

На въпроса „Смятате ли, че са необходими допълнителни курсове за повишаване на квалификацията Ви?“, отговор „Да“ е даден от 25 лаборанта, което представлява 74% от анкетираните (Фиг.44).

Университетските болници и тези в по-големите градове не срещат трудности с наемането на хистологични лаборанти, но в по-малките градове проблема е наболял. Липсата на съвременно

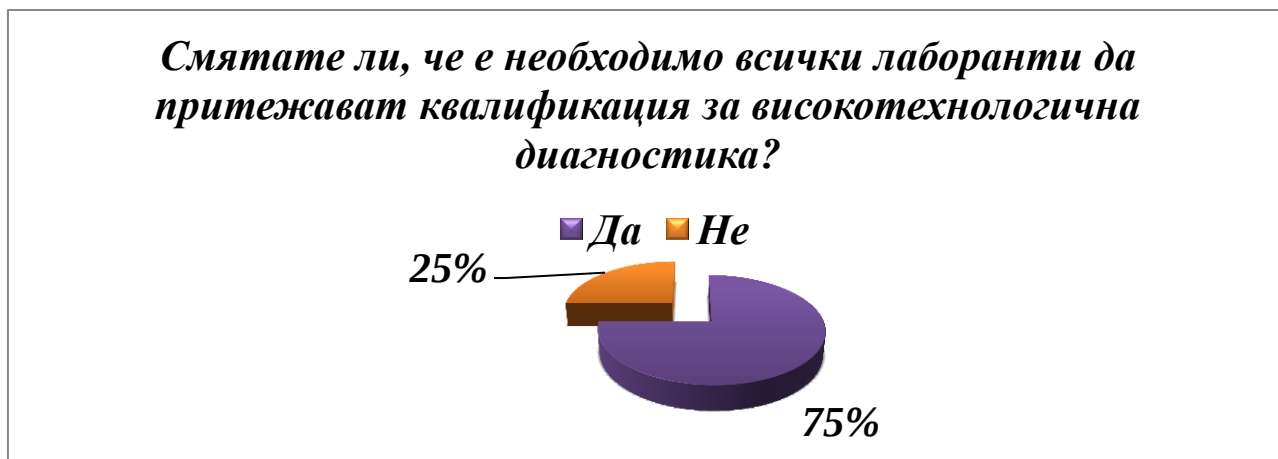
оборудване в лабораториите води до по-голяма натовареност на лаборантите, дори и при малък обем от диагностична дейност. Студентите провеждат клиничната си практика и преддипломния си стаж в университетски болници, които са снабдени с тъканни процесори за обработка на хистологичния материал, с оцветителна апаратура за изготвените парафинови срези. Те неминуемо сравняват условията и предпочитат местата с по-добри условия на труд, с възможности за избягване излагането на вредните емисии от реактивите, с които се работи. Затова и в много от тези градове работещите лаборанти са или на пенсионна възраст, или много близо до нея. Те са тези 9, които са дали отрицателен отговор на въпроса „Смятате ли, че са необходими допълнителни курсове за повишаване на квалификацията Ви?“ и не проявяват интерес към обучение в нови методики с мотива, че „Няма за кога“. От друга страна цената на имунохистохимичните изследвания е висока и малките болници нямат средствата да закупят необходимите за това реактиви. Голяма част от тези болници са решили проблема с имунохистохимичните изследвания на своите пациенти, като са сключили договори с университетските болници във Варна, Плевен, Пловдив, София и Стара Загора.

Относно финансовата страна на обучението виждането е в пряка връзка с удовлетвореността на лаборантите от заплащането. На въпроса „Кой трябва да поеме разходите за обучение?“, всички, посочили, че са доволни от възнаграждението което получават (5-ма от анкетираните), считат, че могат сами да заплащат участието си в курсове за продължаващо обичание. Малка част от анкетираните (6-ма лаборанта) смятат, че е редно разходите за обучението да бъдат споделени с работодателя. Но повечето от тези, които са посочили, че оценяват заплащането на труда си като „ниско“ (15 лаборанта), смятат, че е задължение на работодателя да поеме всички разходи за обучението им (Фиг. 45).



Фигура 45. Мнение на лаборантите относно финансирането на обучителните курсове

Анкетиран бяха и 8 началници на патоанатомични отделения и лаборатории. В три от тези структури всички лаборанти владеят най-новите методики за диагностика, а в останалите има и персонал, който не е обучен в тях. Мнението на шестима от анкетираните ръководители (75%) е, че е необходимо всички лаборанти да се обучават периодично в новостите, които навлизат в патохистологичната диагностика (Фиг. 46).



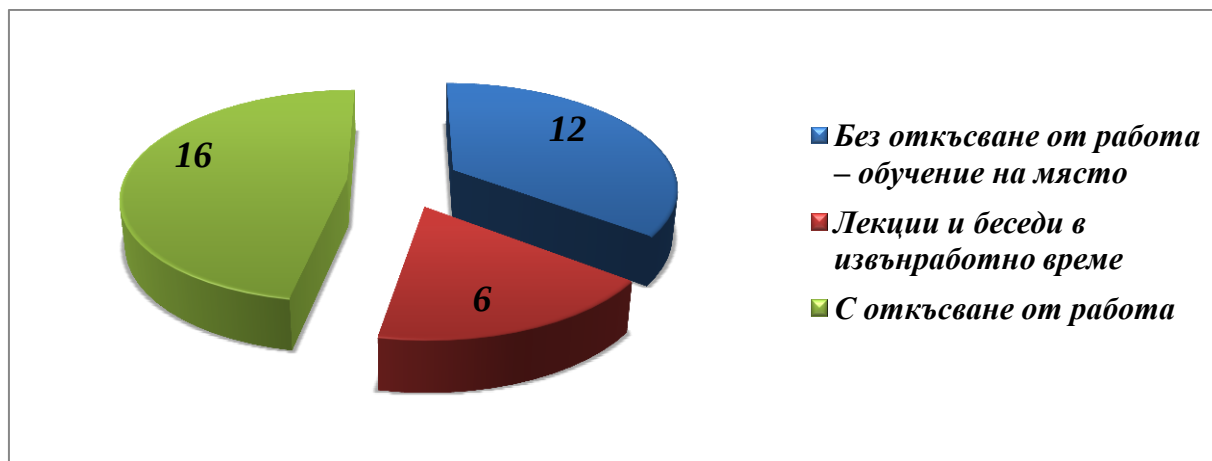
Фигура 46. Мнение на началници на патохистологични лаборатории относно необходимостта от повишаване на квалификацията на хистологичните лаборанти

На въпроса „Кой трябва да поеме съответното заплащане за обучение на лаборантите?“, мнението на повечето от началниците съвпада с това на лаборантите, като споделят, че финансирането трябва да се поеме от работодателя или от фирми, доставчици на апаратура и реактиви за работа в хистологични лаборатории (Фиг. 47).



Фигура 47. Мнение на началници на патохистологични лаборатории относно финансирането на обучителните курсове за хистологични лаборанти

Относно формата на обучение, предпочитените методи са демонстрация на място (12) или във по-високоспециализирана лаборатория (16), като само трима души споделят, че предпочитат лекционни курсове. Всички анкетирани са заявили готовността си да инвестират в обучението си част от свободното си време (Фиг. 48).



Фигура 48. Предпочитани форми на обучение по мнение на хистологичните лаборанти

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На база проведените проучвания се установи непълнота в обучението на студентите в специалност „Медицински лаборант“ в медицинските колежи, а също така и ограничени възможности за участие в курсове за продължаващо обучение сред практикуващите професията хистологичен лаборант. Това от една страна създава затруднения при въвеждането в работа на новоназначени медицински лаборанти, а от друга се явява косвена причина за възникване на т.нар. лабораторни грешки, което води до занижаване качеството на медицинските услуги в частта лабораторни дейности. С цел по-бързо интегриране на новоназначените хистологични лаборанти, както и повишаване качеството на лабораторните диагностични изследвания бяха изработени следните алгоритми и протоколи:

- Алгоритъм за предварителна подготовка на препарати за имунохистохимично изследване;
- Алгоритъм за отстраняване на грешки, свързани с инкубацията на анти тяло;
- Алгоритъм за отстраняване на грешки при неспецифично фоново оцветяване;
- Протокол за действие при липсваща или слаба имунохистохимична реакция;
- Протокол за подготовка, съхранение и транспортиране на биологичен материал за хистологично и цитологично изследване.

ИЗВОДИ

1. Изследването на информацията в достъпната научна литература и административни документи, демонстрира непълнота по отношение на детайлизиране и всеобхватно описание на поддържането на качеството в патохистологичните лабораторни структури в страната, което се явява и един от основните проблеми за възникването на т.нар. „лабораторни“ грешки. Не се откриват предходни проучвания описващи връзката между значението на обучението на студентите от специалност „Медицински лаборант“, залегнало в ЕДИ и следдипломното обучение на назначени хистологични лаборанти, и качеството на изпълнение на съществуващите протоколи и модифицираните такива.
2. Най-честите проблеми по време на извършването на хистологичното изследване в преданалитичния стадий са пряко свързани с вероятността от възникване на „лекарска грешка“ в аналитичния стадий, което може да бъде избегнато при спазване на строга последователност в съответните протоколи за провеждането на подобни изследвания или модифицирането на такива и утвърждаването им по отношение на диагностична и научно-изследователска дейност.
3. Съществува зависимост между спазването на съществуващи протоколи и възникването на грешки по време на фиксацията и обработка на тъканите, оформянето на парафиново блокче, изготвянето на парафинови срези и анализа на получените резултати, както и провеждането на последващи ИХХ и молекулярно-патологични изследвания.
4. Съществува зависимост между провеждането на ИХХ при възникването на грешки по време на: антигенно възстановяване, апликация на анти тяло и визуализираща система, контраоцветяване и включване на готовия препарат и анализа на получените резултати.
5. Обучението на студенти от специалност „Медицински лаборант“ е от съществено значение за свеждане на грешките в работата до минимум, което е в пряка връзка с периода и конкретно темите на обучение.

6. Обучението на студенти от специалност „Медицински лаборант“ в дисциплината „Хистотехника“ е недостатъчно, като се регистрира необходимост от увеличаване на часовете, най-вече за практическа работа.
7. Продължаващото обучение на хистологичните лаборанти е в пряка връзка с провеждането на рутинните хистологични, ИХХ и ИФ изследвания, спазването на протоколите и добрата медицинска практика, но и влияе положително както върху качеството на лабораторните изследвания, така и на икономическия ефект и себестойност при провеждането им.

ПРИНОСИ

1. Научно-теоретични приноси

- 1.1. За пръв път е извършено прецизно проучване на причините за грешки в патохистологичните лаборатории, като са систематизирани начините за тяхното предотвратяване или отстраняване във всеки един от етапите от преданалитичния процес;
- 1.2. За пръв път е проведено синхронно проучване обхващащо студенти в специалност „Медицински лаборант“ и работещи хистологични лаборанти, относно ролята на обучението на медицинските лаборанти, значението на последващото следдипломно обучение, икономическата удовлетвореност и кариерното развитие;

2. Научно-практически приноси

- 2.1. Описани са детайлно и са представени най-честите грешки в различните етапи от обработка на материалите за хистологични и ИХХ изследвания, даващи систематизиран достъп за „бърза справка“ относно тези грешки;
- 2.2. Изработени са алгоритми, подпомагащи вземането на компетентно решение при откриване на грешки, допуснати при ИХХ изследвания и възможността същите да бъдат поправени;
- 2.3. Изработен и предложен за внедряване е „Протокол за медицински грижи при подготовка, съхранение и транспортиране на биологичен материал за хистологично и цитологично изследване“

ПРЕПОРЪКИ

1. Към ръководители на лечебни заведения и медико-диагностични лаборатории:

- Въвеждане на протокол за фиксация на тъканни проби;
- Осигуряване на възможности за обучение на персонала на патохистологичните лаборатории в нови методики и периодично провеждане на квалификационни курсове;

2. Към МОН и ръководствата на медицински колежи:

- за промяна на ЕДИ относно хорариума по практическа подготовка на студентите от специалност „Медицински лаборант“ в дисциплината „Хистотехника“.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- Dinkova, K . Significance of pre-analytical phase in pathohistological diagnostic process—the role of laboratory technician in quality assurance. Knowledge-International Journal, 2022, 55.4: 717-721.

Научни доклади от национални и международни конференции

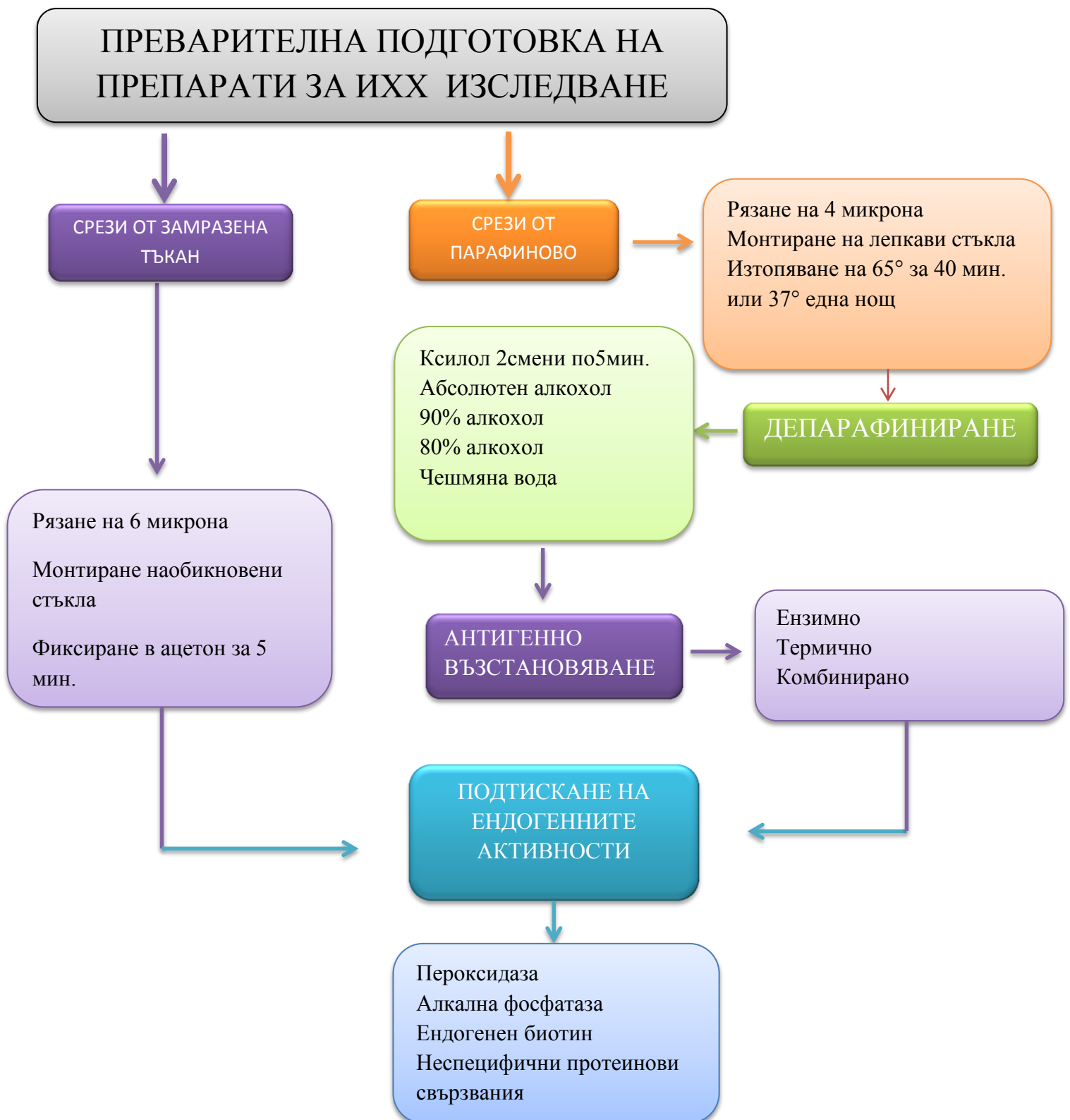
- Ananiev, Y; Dinkova, K ; Velev, V; Gulubova, M. The impact of TGF-beta1 expression and-509C/T polymorphism in HER2 negative gastric cancer patients. VIRCHOWS ARCHIV, 2018, Volume: 473 Pages: S176-S176 Supplement: 1 Meeting Abstract: PS-20-074.
- Ivanova, K; Zdraveski, A; Kisiova, E; Dinkova, K; Gulubova, M. Role of VEGF, CD1a-and CD83-positive cells in development of papillary thyroid cancer. VIRCHOWS ARCHIV, 2018, Volume: 473 Pages: S104-S104 Supplement: 1 Meeting Abstract: PS-09-021
- Aleksandrova, E ; Ananiev, J; Ivanova, K; Ganeva, I; Gulubova, M. Differential expression of IL-17A gene with relation to KRAS mutation status and clinicopathologic characteristics of colorectal cancer patients. VIRCHOWS ARCHIV ,2018, Volume: 473 Pages: S137-S138 Supplement: 1 Meeting Abstract: PS-15-033.

Участие в национални проекти

- “Грелин-положителни структури в стомашен карцином, и жлъчен мехур и жлъчни пътища” с ръководител проф. М. Гълъбова, дм -2017 г.
- “Имунни клетки и цитокини при хронични възпалителни заболявания и в туморната микросреда със специално внимание върху дендритните клетки, IL-17 и FOXP3” с ръководител проф. М. Гълъбова, дм -2016 г.
- "Имунни клетки и цитокини в туморната микросреда (със специално внимание върху IL-6, IL-17 и дендритни клетки)" Ръководител проф. Татяна Влайкова, дб –2018г

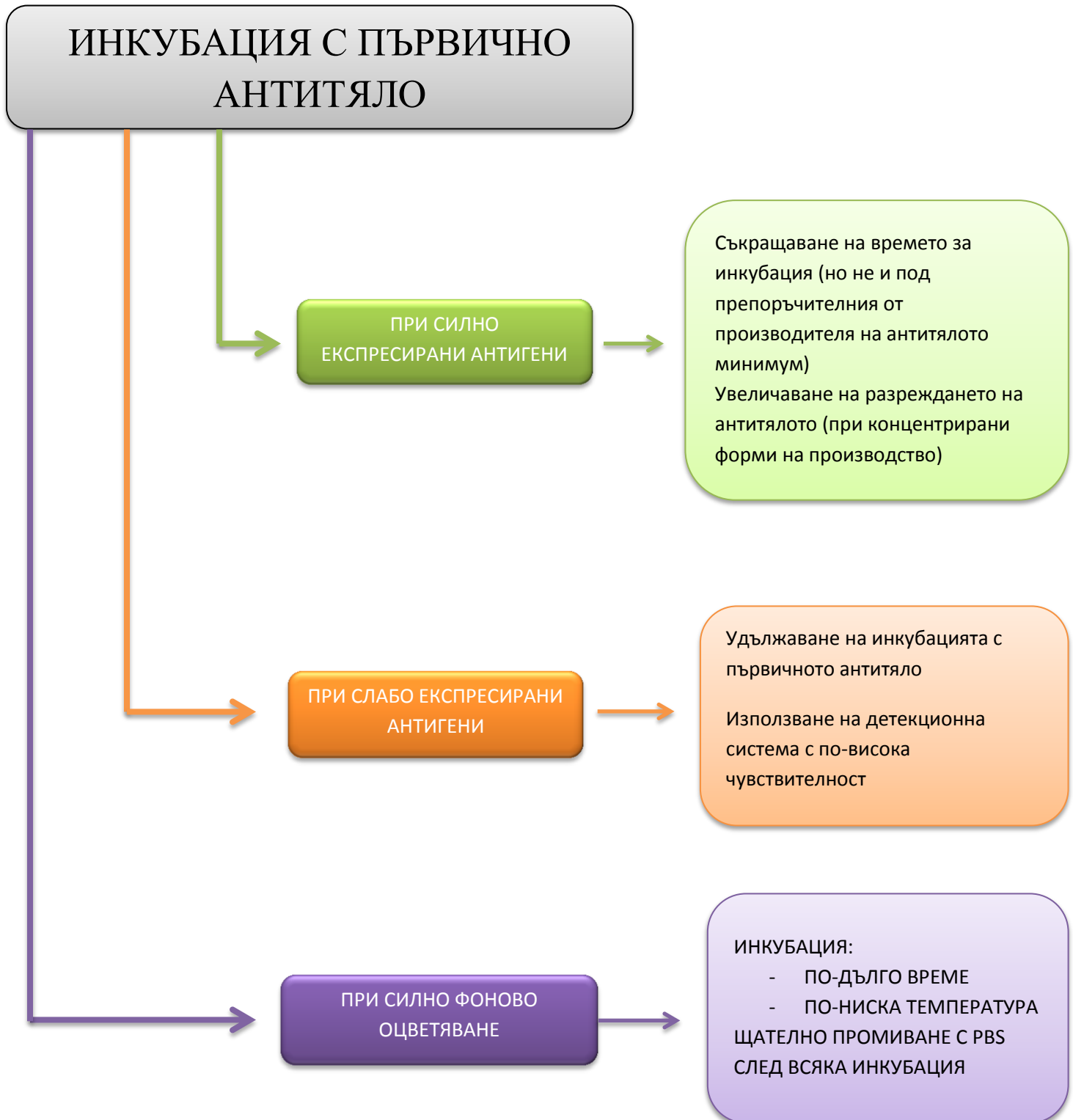
ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Алгоритъм за предварителна подготовка на препарати за имунохистохимично изследване



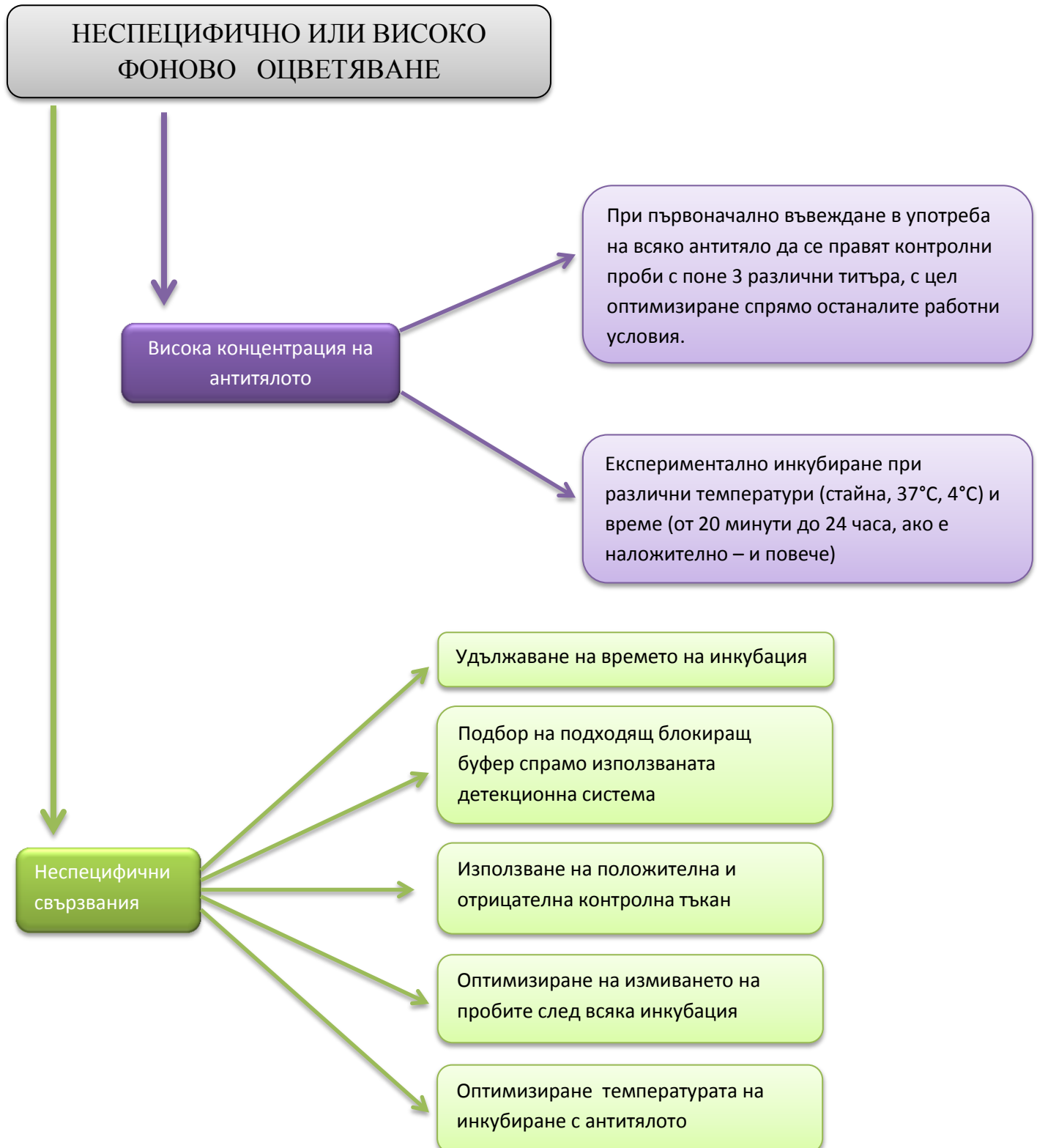
ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Алгоритъм за отстраняване на грешки, свързани с инкубацията на анти тяло



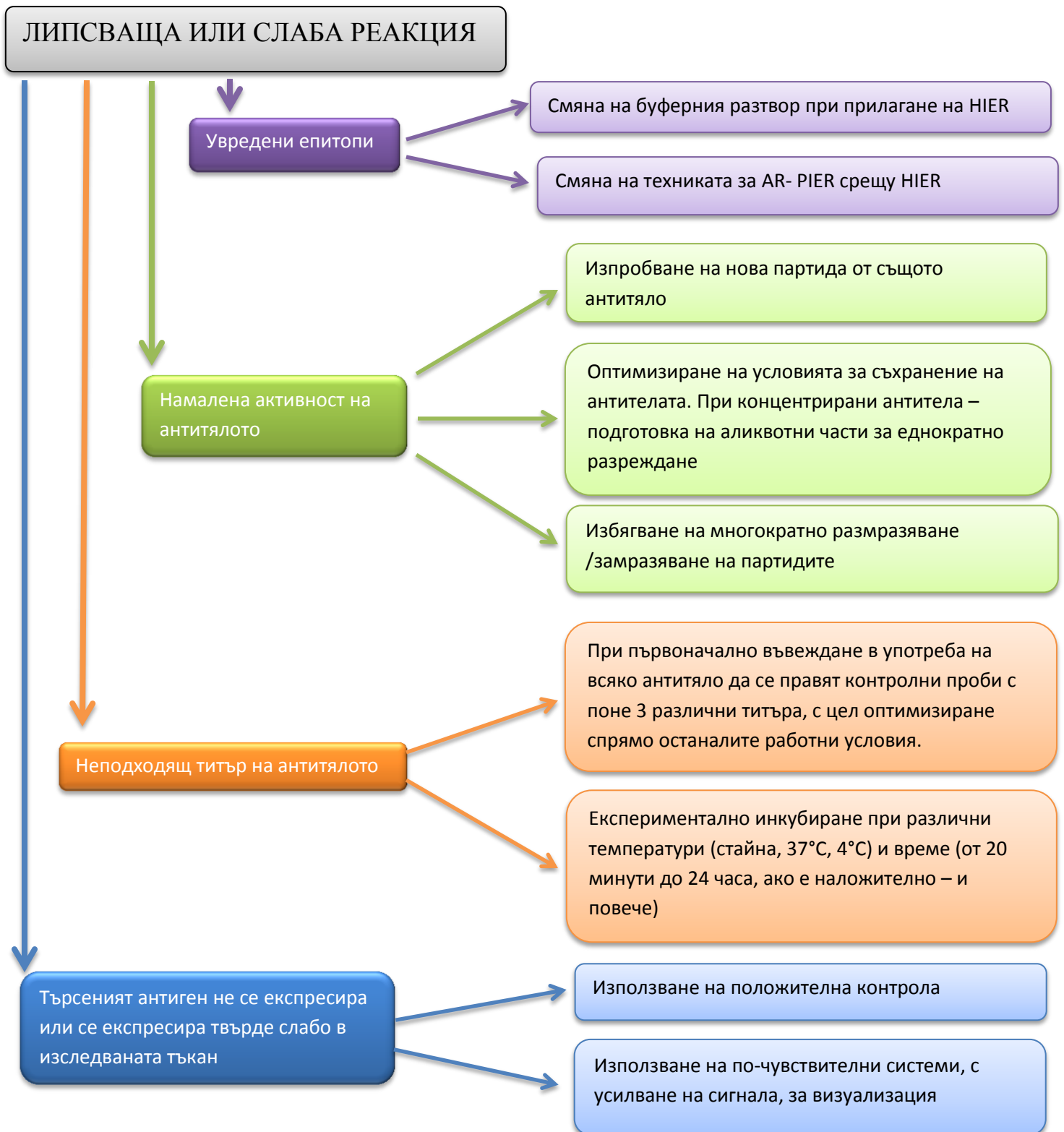
ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Алгоритъм за отстраняване на грешки при неспецифично фоново оцветяване



ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Протокол за действие при липсваща или слаба имунохистохимична реакция



ПРИЛОЖЕНИЕ 5

ПРОТОКОЛ

за подготовка, съхранение и транспортиране на биологичен материал за хистологично и цитологично изследване

I. Цели на протокола

1. Повишаване качеството на медицинските диагностични дейности при подготовка, съхранение и транспортиране на биологичен материал за хистологично и цитологично изследване.
2. Ограничаване до минимум на евентуални грешки при подготовка, съхранение и транспортиране на биологичен материал за хистологично и цитологично изследване.
3. Подпомагане на новопостъпили здравни специалисти в процесите на обучение и самоподготовка.
4. Икономическа цел – спестяване на време от страна на старшия персонал за обучение на новопостъпилите медицински служители.

II. Общи положения

Клиниката по обща и клинична патология работи с всички клиники и отделения към УМБАЛ „Проф. д-р Стоян Киркович“ АД – Стара Загора и с приемно-консултативния блок.

Всички лекари, работещи в клиниките и отделенията, както и в приемно-консултативния блок могат да изпращат материал за хистологично и цитологично изследване в Клиниката по обща и клинична патология.

Материалите, които се изпращат за хистологично или цитологично изследване трябва да отговарят на следните изисквания:

1. Да бъдат надлежно етикетирани – контейнера с биологичния материал се надписва с трите имена на пациента, клиниката/отделението, от което се изпраща материалът, както и ИЗ на пациента.
2. Да бъдат придружени с фиш-искане за хистологично/цитологично изследване, в който фиш освен паспортните данни на пациента се вписват:
 - кратки клинични данни;
 - вероятна клинична диагноза;
 - дата на вземане на материала на хистологични изследвания;
 - дата и час на вземане на цитологични материали;
 - използван фиксатор;
 - име и подпис на изпращащият лекар.

III. Съдържание на протокола

- Технически фиш за първична фиксация на биопсичен материал
- Технически фиш за приготвяне на буфериран 10% формалин
- Технически фиш за приготвяне на буфериран 5% формалин
- Технически фиш за изпращане на цитологични изследвания
- Технически фиш за изготвяне на отпечатък от лимфен възел

SUMMARY

With the advancement of the medical technologies, the introduction of molecular pathology, and the opportunities for personalized treatment, the quality control, and the standardization of the processes in the histological laboratories, to include the pre-analytical phase of biological tissue examinations, have become a necessity. In the past few years, the standardization of the immunohistochemical analysis has become ever more important, as the analysis transitions from being qualitative (identifying the presence or absence of a certain antigen) to quantitative.

The immunohistochemical staining is a complex multi-stage process, which hides multiple risk factors that can reflect negatively on the outcome of the analysis. A study of the current protocols for running an immunohistological analysis shows that the most commonly arising problems during the analysis in the pre-analytical phase are directly related to the possibility of a “medical error” during the analytical phase. This can be avoided by strictly following the sequence of the respective protocols for the conduct of such analysis or their modification and affirmation regarding the medical diagnostic program and research.

Following the existing protocols for fixation and processing of the biological tissues, paraffin embedding of the specimen, preparation of paraffin sectioning and histological staining have direct effect on the analysis of the results, same as on the molecular pathology research.

A retrospective study of the research conducted by the histopathological laboratory of the University Multiprofile Hospital for Active Treatment “Professor Dr. Stoyan Kirkorovich” in Stara Zagora for the period between 2003 and 2022 shows a small but steady increase in the number of performed routine histological analysis – from near 6000 in 2003, to almost 8000 in 2022. Meanwhile, a sharp increase in the number of performed immunohistochemical analysis has been observed – from an average 50 per year for the period between 2003 and 2016, to more than 700 per year in the past few years.

The analysis of the obtained results is directly related to the errors made during the immunohistological reaction during the: antigen retrieval, incubation of antibodies and application of visualization system, contrast dye application and observation of the finished sample.

The pre-analytical factors that influence the ability to localize the targeted antigen when working with a Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue (FFPET) are:

➤ **Fixation and processing of the tissues**

The adaptation of a unified protocol for fixation would guarantee the accuracy, the reliability and the reproduction of the research’s results. This protocol should focus on three fundamental components:

1. Concentration of the aldehyde fixative;
2. The timeframe between the cell death and placing the tissue in a fixative;
3. The duration of the fixation.

➤ **Blocking the endogenous activity**

Blocking the endogenous activity is imperative for all types of sections, whether produced with a frozen or a fixed tissue sample.

- Peroxidase
- Alkaline phosphatase
- Endogenous biotin
- Non-specific protein bindings

➤ **Antigen retrieval**

Depending on the target antigen, and the purpose of the research, one out of the two methods for antigen retrieval is used - protease-induced epitope retrieval (PIER) and heat-induced epitope retrieval (HIER).

However, some antigens require a combined method of retrieval, and the two methods are performed consecutively. Studies have shown that the sequence in which the two methods are applied is not of significance.

➤ **Incubation of the antibody**

When the data shows strong histological staining, a longer period of incubation at a lower temperature is recommended – for example, overnight in a refrigerator. As a measure to reduce the non-specific bindings, if high antibody concentrations are being used, it is recommended to increase the dilution of the primary antibody and prolong the incubation period.

➤ **Visualization**

- Fluorescent molecules – the reaction is observed under a fluorescence microscope.
- Enzyme methods – As a reaction the Peroxidase and Alkaline phosphatase create a colorful sediment, while interacting with a specific chromogen. It is observed under a light microscope.

➤ **Chromogens and contrast dye application**

The most commonly used chromogens when using the HRP (Horseradish Peroxidase) detection systems are:

- DAB (3,3' -Diaminobenzidine). As a contrast dye can be used Mayer's hematoxylin solution (water-based), Methylene green and Methylene blue.
- AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole). As a contrast dye can be used hematoxylin, Methylene green and Methylene blue.

The most commonly used chromogens when using the enzyme alkaline phosphatase are:

- BCIP(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate)/ NBT (Nitro Blue Tetrazolinum). As contrast dye can be used Nuclear Fast Red and Brilliant Green.
- Fast Red. As contrast dye can be used Methylene green and Mayer's hematoxylin, that does not contain alcohol.

➤ **Common mistakes that lead to false results in immunohistochemical (IHC) and immunofluorescence (IF) studies**

False positive results

- using egg albumin or serum as adhesive for the microscope slides;
- poor washing the specimen slides thoroughly after each incubation;
- too thick sections;
- application on frozen, not fixed, sections;
- low antibody titer (when working with concentrated antibodies);
- applying visualization systems based on strept(avidin) on thyroid tissue.

False negative results

- improper storage of the antibodies

The proper storage of the antibodies and the other laboratory reagents for IHC will lessen the problems related to inaccurately reported samples. Failure to adhere to the temperature requirements can be one of the reasons for false negative IHC reactions. The use of unclean containers and pipettes when diluting and dispensing, leads to the contamination of the reagents, which can lead to false results.

- high antibody titer or unsuitable dilution buffer (when working with concentrated antibodies);
- using antibodies with low sensitivity or specificity – the antigen retrieval influences the sensitivity, but not the specificity of the reaction;

- working with finished (pre-prepared) paraffin sections, stored for a long period at improper conditions;
- using a detection system with low sensitivity when testing for poorly expressed antigens.

In connection with researching the role of educating the medical laboratory technicians and its impact on the quality in the histopathology laboratory, it has been established that continuous training of the histology technicians is directly related to carrying out the routine histological, IHC and IF tests, and have positive effect on the quality of the laboratory tests, as well as on the research's cost.

Careful study of the requirements toward the medical technician in the histology laboratory suggests that the hours dedicated to training related to the field of histotechnology are far too insufficient, all while underlining the necessity of an increase in practical training.

The education of students in the field of Medical Technician is of significant importance to reducing the errors committed during the performance of laboratory tests as much as possible. This relates directly to the training's time frame and subjects.