



فرم دستورالعمل
Instruction

مرکز آموزشی درمانی امیرالمومنین (ع)

عنوان دستورالعمل:

- دستورالعمل نحوه انجام آزمایش های که در آزمایشگاه پاتولوژی انجام میشود.

شماره دستورالعمل: IN-LA ۰۵۵

تاریخ اولین ابلاغ:

تاریخ بازنگری:

تاریخ بازنگری بعدی:

هدف دستورالعمل:

- فیکسسیون

- پذیرش

- برش بافت توسط پزشک پاتولوژی

- پروسیسینگ بافت

- بلوک بافت

- برش با میکروتوم

- فروزن سکشن

- رنگ آمیزی

- بایگانی لام و بلوک ها

دامنه کاربرد دستورالعمل:

- پاتولوژی

منابع / مراجع:

- کتاب مرجع: کتاب شیخ الاسلامی

- کتاب BANCROFT

- دستگاه ها شامل: تیشو پروسوسور- میکروتوم - ست دیسپنسر هات پلیت کولد پلیت - سایتو سانتر فیوژ - میکروسکوپ - فروزن

- مواد شامل: گزیلول - الکل - اسیدنیتریک - کلریدریک - سیتریک - رنگهای OG, EA, HEMETOXILIN, EOSIN - انواع کیت

های رنگ آمیزی تخصصی - پارافین - تیشو تک - سبد و جار رنگ آمیزی - لام ولامل - چسب سیتولوژی - چسب فروزن

مسئولیت اجرای این دستورالعمل:

- خانم طیبه والی

قوانین و مقررات مرتبط:

- همگی مراحل کار با دستگاه ها را بررسی کرده و در دفتر کنترل کیفی ثبت میکنیم.

تعاریف:

- عبارتهای بکار رفته در این سند کاملاً گویا بوده و نیازی به تعریف ندارند.



فرم دستورالعمل
Instruction

مرکز آموزشی درمانی امیرالمومنین (ع)

شرح اقدامات:

| مرحله | فعالیت هایی که باید انجام شود |
|-------|-------------------------------|
| ۱ | ضمیمه ۱ |

بایگانی سوابق:

- کلیه مدارک و سوابق این دستورالعمل در پاتولوژی به مدت ۱۵ سال نگهداری میشود.

گیرندگان نسخ:

پیوست ها:

- دارد

ضمیمه ۱:

روش تکنیکی پاتولوژی:

تمام مراحل کاری از ابتدای پذیرش نمونه در آزمایشگاه پاتولوژی تا آماده سازی لام و بررسی آن در زیر میکروسکوپ به عنوان روش های تکنیکی آسیب شناسی در نظر گرفته می شود که شامل ده مرحله جداگانه است:

۱) فیکساسیون،

۲) پذیرش

۳) نمونه برداری یا پاس دادن،

۴) آبگیری و آغشتگی،

۵) قالب گیری،

۶) برش با میکروتوم،

۷) رنگ آمیزی و

۸) مونتاژ لام و لامل

۹) فروزن سکشن

۱۰) بایگانی

در ادامه توضیح درباره هر یک از این مراحل پرداخته می شود:

۱) فیکساسیون (fixation)

این مرحله صرفاً جهت حفظ ساختمان فیزیکی بافت و برای جلوگیری از اتولیز (Autolysis) آن انجام می شود. نمونه جراحی شده باید بلافاصله درون ماده فیکساتیو قرار بگیرد. برای این کار باید نوع بافت، درجه حرارت دوران پروسه، زمان فیکساسیون و pH محلول های به کار برده شده را در نظر داشت. برای مثال مایع پایدارکننده یا فیکساتیو، باید سلول زنده را هر چه سریعتر کشته و به سرعت در بافت نفوذ نماید و در صورت امکان ساختمان طبیعی سلول و بافت را تغییر ندهد و همچنین بعضی از مواد نیمه جامد و کلوئیدی را با عمل فیکساسیون تبدیل به مواد نیمه جامد (gel) کند.

در مجموع ماده فیکساتیو را باید طوری انتخاب کرد که در بافت و همچنین در رنگ آمیزی آن خللی ایجاد نکند. برای انجام این کار فیکساتیوهای مختلفی وجود دارد ولی فرمالین ۱۰٪ معمول ترین فیکساتیو به کار گرفته شده است. زمان ماندن نمونه در فرمالین



فرم دستورالعمل Instruction

مرکز آموزشی درمانی امیرالمومنین (ع)

فرم آلدئید) بستگی به حجم و نوع نمونه دارد به طوری که هر ۴ ساعت ۲/۷ میلی متر فرمالین داخل بافت نفوذ می کند ولی معمولاً " نمونه ها را ۲۴ ساعت در فرمالین قرار می دهند. البته لازم به ذکر است نمونه هایی مانند استخوان، دندان و به طور کلی بافت هایی که دارای رسوبات آهنی باشد باید پیش از فیکساسیون، دکلسیفیه شود تا بتوان آن را برای مراحل بعدی آماده کرد. دکلسیفیکاسیون به معنی آزاد کردن مواد معدنی (کلسیم) از بافت استخوانی و شامل مراحل زیر است:

الف) تهیه نسوج ،

ب) فیکساسیون،

ج) دکلسیفیکاسیون،

د) خنثی کردن ،

ه) شستشو با آب،

محلول دکلسیفیکاسیون باید دارای خصوصیات زیر باشد:

الف) کلسیم را به طور کلی از بافت آزاد کند،

ب) به بافت اصلی آسیبی وارد نکند و

ج) در رنگ آمیزی اختلال ایجاد نکند.

۲) پذیرش:

تمامی نمونه ها با فرم شماره یک هویت بیمار در بخش پاتولوژی پذیرش میشوند. در مورد نمونه های ارجاعی این مرکز که شامل بیوپسی کلیه و IHC میباشد با رعایت دستورالعمل نمونه های ارجاع که در بخش موجود میباشد ارسال میگردد.

۳) نمونه برداری یا پاس دادن:

برای اجرای این مرحله، نمونه باید از لحاظ اندازه کاملاً مناسب باشد. چنانچه نمونه بزرگتر از حد معمول باشد مواد آنگیر مانند گزلیول، الکل و ... نمی تواند در آن نفوذ کند و چنانچه خیلی کوچک باشد تهیه نمونه و به دنبال آن برش و تهیه لام و ... مشکل خواهد شد. برای هر کدام از نمونه ها باید مشخصات بافت را به طور کامل گزارش کرد. این مشخصات شامل: ابعاد، ضخامت، رنگ، ترشحات و ... است. همین طور برای جدا کردن نمونه ها از یکدیگر و شناسایی آنها باید شماره نمونه همراه با سال نمونه برداری را به وسیله مداد روی کاغذ نوشته و همراه با بافت داخل ظروف مخصوص گذاشته و نمونه را برای مراحل بعدی آماده کرد.

۴) آنگیری و آغشتگی:

این کار توسط دستگاهی به نام تیشو پروسسور (Tissue Processor) انجام می شود که شامل دوازده ظرف حاوی محلول های مختلف است .

این محلول ها ۳ وظیفه بر عهده دارد:

الف) آنگیری،

ب) شفاف کردن و

ج) آغشتگی با پارافین

حجم کلی هر ظرف ۱۰۰۰ میلی لیتر است و ترتیب آنها بدین صورت است:



فرم دستورالعمل Instruction

مرکز آموزشی درمانی امیرالمومنین (ع)

ظروف شماره ۱ و ۲ حاوی فرمالین ۱۰٪ است. نمونه برش داده شده حدود ۳ ساعت در فرمالین قرار می‌گیرد. (چنانچه این زمان بیشتر باشد اشکالی ایجاد نمی‌کند). در بعضی موارد، در ظرف شماره ۲ هم از فرمالین استفاده می‌شود. مدت زمان قرار گرفتن نمونه در ظرف شماره ۲ یک ساعت است.

ظرف‌های سوم تا ششم شامل الکل (متانول) است، ظرف شماره ۳ الکل ۷۰٪ و ظرف شماره ۴ الکل ۸۰٪، ظرف شماره ۵ الکل ۹۰٪ و ظرف شماره ۶ الکل ۹۶٪ است. علت صعودی انتخاب کردن این الکل‌ها این است که آب‌گیری به آرامی انجام شود. زمان قرار گرفتن نمونه در هر کدام از این الکل‌ها یک ساعت است. به طور کلی اتانول بهتر از متانول آب‌گیری می‌کند ولی به علت هزینه بالاتر، از متانول استفاده می‌شود. در عین حال متانول خاصیت رنگبری هم دارد. این مرحله بسیار مهم است و چنانچه آب‌گیری با الکل به خوبی انجام نشود مراحل بعدی نیز دچار اشکال شده و سبب چروکیدگی بافت‌ها خواهد گردید.

ظروف شماره‌های ۷ و ۸ حاوی الکل متانول مطلق ۱۰۰٪ است که در مجموع ۴ ساعت آب‌گیری آنها به طول می‌انجامد. ظروف ۹ و ۱۰ گزیلول است که وظیفه شفاف‌سازی بافت و خارج کردن الکل از آن را به عهده دارد.

ظروف شماره ۱۱ و ۱۲ حاوی پارافین است. پارافین در دمای آزمایشگاه جامد است و باید به دمای ذوب (۶۰ درجه سانتی‌گراد)، برسد برای همین منظور دو ظرف آخر دارای المنتی است که باعث تولید حرارت در ظرف و ذوب شدن پارافین می‌شود. بعد از اینکه نمونه داخل پارافین مذاب قرار گرفت. این ماده داخل بافت نفوذ کرده و بافت به حالت آغشتگی می‌رسد. پارافین در شکاف و درز بافت نفوذ می‌کند و در دمای آزمایشگاه بافت سفت و سخت شده و قابل برش با میکروتوم خواهد شد. لازم به ذکر است که ماده آغشتگی با ماده قالب‌گیری باید یکی باشد.

دستگاه تیشو پروسور مجهز به دکمه‌های خودکار تنظیم زمان (Timer)، دکمه‌های روشن و خاموش و بالا و پائین و چرخشی و چراغ‌هایی برای اطمینان از روشن بودن دستگاه و همچنین دکمه‌های تنظیم برنامه و تعیین سیکل دستگاه است تا معمولاً حدود ۱۸ ساعت طول می‌کشد که یک سیکل کامل شود.

۵) قالب‌گیری:

برای قالب‌گیری باید ماده آغشتگی (پارافین) را در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد داخل فور ذوب کرده و مقداری موم به نسبت ۱ به ۱۰ به آن اضافه کرد. از موم برای قالب‌گیری محکم استفاده می‌شود. در صورتیکه فقط از پارافین استفاده شود قالب‌ها بسیار شکننده خواهند شد. پس از این مرحله کار روی نمونه‌ها وارد مسیر جدیدی می‌شود که شامل قالب‌گیری، برش و رنگ‌آمیزی و در نهایت مونتاژ لام و لامل است. برای قالب‌گیری باید نمونه‌های آب‌گیری شده را به وسیله پنبست داخل ظرف مخصوص قالب‌گیری قرار داده، روی آن محلول موم و پارافین ریخت و بعد از گذشت چند دقیقه شماره نمونه‌ها را روی آن‌ها قرار داد. این عمل در اصطلاح کوله کردن نمونه‌ها نامیده می‌شود و نیاز به دقت کافی دارد. برای کامل‌تر شدن این مرحله قالب‌ها تا شروع زمان برش داخل یخچال قرار می‌گیرد.

۶) برش با میکروتوم:

برای شروع این مرحله به چند دستگاه جداگانه نیاز است که این دستگاه‌ها و وسایل شامل: میکروتوم، تیشوفلوت، چراغ مطالعه و قلم الماس است.

میکروتوم: دستگاهی است که از آن برای تهیه برش‌های نازک از بافتی که به صورت بلوک در آمده، استفاده می‌کنند. این دستگاه دارای توانایی برش بافت در ضخامت‌های گوناگون است و آن را به دو بخش بیرونی و درونی تقسیم می‌کنند. در بخش درونی دستگاه، چرخ دنده‌های مختلفی تعبیه شده است که به وسیله دسته میکروتوم به چرخش در می‌آید و میله تنظیم میکرومتر،



فرم دستورالعمل Instruction

مرکز آموزشی درمانی امیرالمومنین (ع)

درجه تنظیمی را به داخل منتقل می کند. با چرخش دسته می توان برش هایی به ضخامت ۱ تا ۳۰ میکرون و حتی بالاتر تهیه کرد. قسمت بیرونی دستگاه شامل دسته، گیره بلوک، پیچ تنظیم زاویه بلوک، جای نگهدارنده چاقوی میکروتوم، پیچ تنظیم کننده زاویه تیغ میکروتوم، درجه میکرومتر و پیچ یا دسته جلوبرنده چاقو به وسیله دست است. بر روی دسته، میله ای تعبیه شده که به وسیله آن می توان دسته را قفل نموده تا کاملاً ثابت شود و بدین وسیله احتمال آسیب به دست یا خراب شدن بلوک کم می شود.

• تیشوفلوت

این دستگاه در واقع ظرفی است که در آن آب ریخته می شود و قسمتی در زیر یا اطراف آن تعبیه شده که محل قرارگیری گرمکن دستگاه است و به وسیله کلید کنترل کننده، دمای آب به دلخواه تنظیم می شود که این دما به پارافین اطراف نمونه بستگی دارد. لازم به توضیح است که داخل ظرف باید تیره باشد. بدین منظور معمولاً به وسیله تفلون یا رنگ کوره ای سیاه پوشانده می شود. در واقع این دستگاه برای برطرف کردن چین و چروک بافت های برش خورده است.

چراغ مطالعه: این وسیله بر روی میکروتوم و آب و الکل و تیشوفلوت احاطه داشته و نور مناسب و کافی آن از خستگی مفرط چشم جلوگیری می کند.

قلم الماس: همان طور که از نامش پیداست، برای نوشتن به کار می رود. نوک قلم باید از الماس باشد تا بتواند شماره نمونه ها را به طور خوانا روی لام که جنس شیشه دارد حک کند.

همانطور که گفته شد مرحله پنجم از هستیوتکنیک برش با میکروتوم است. در این مرحله نمونه های قالب گیری شده را به وسیله میکروتوم به ضخامت ۵ میکرون برش می دهند. میکروتوم موجود در آزمایشگاه ها معمولاً از نوع دواری است که برای برش بهتر لازم است نمونه ها را حدود یک دقیقه روی یخ قرار داد؛ البته بعضی از میکروتوم ها از نوع انجمادی است. طوریکه گاز ۲CO از داخل محفظه ای آزاد شده و این گاز ایجاد سرما می کند و برش بافتها به طور خود به خود در انجماد صورت می گیرد. ۶) رنگ آمیزی بافت ها:

این مرحله شامل دو نوع روتین و اختصاصی است:

۷) رنگ آمیزی روتین: روش رنگ آمیزی که در آزمایشگاه های پاتولوژی به طور معمول و روتین استفاده می شود، روش هماتوکسیلین-ائوزین است. با این روش هسته سلول رنگ بنفش و سیتوپلاسم رنگ صورتی به خود می گیرد.

در این رنگ آمیزی، ابتدا ۳ حمام گزیلول موجود است که برای شفاف سازی و از بین بردن پارافین باقی مانده در اطراف بافتها استفاده می شود. نمونه ها در هر ظرف گزیلول به مدت ۵ دقیقه قرار داده می شود. بعد از گزیلول ۴ ظرف الکل درجه بندی شده قرار دارد. نمونه ها را در هر کدام به مدت ۲-۱ دقیقه گذاشته و بعد با آب شستشو داده می شود و بعد بلافاصله در ظرف حاوی هماتوکسیلین قرار می گیرد. زمان قرار گرفتن در هماتوکسیلین ۱۵-۱۰ دقیقه است که این زمان بستگی به تازه یا کهنه بودن رنگ دارد. لازم است بعد از این مرحله نمونه ها با آب شستشو داده شده و بافت های اضافی اطراف آنها پاک شود. بعد از تمیز کردن لامها، آن ها را داخل اسید الکل شناور کرده تا رنگ های اضافی داخل بافت از بین برود. بعد از اسید الکل نوبت به کربنات کلسیم می رسد. وظیفه این محلول، رنگ آمیزی زمینه بافت است و باعث می شود هسته آبی به نظر برسد. ظرف بعدی ائوزین است که باعث قرمز شدن سیتوپلاسم می گردد. بعد از چند ثانیه که نمونه ها داخل ائوزین قرار گرفت آن ها را با آب شستشو داده، بعد به ترتیب داخل ۴ ظرف الکل قرار می گیرد. این الکل ها هم درجه بندی شده و به ترتیب ۷۰-۸۰-۹۰ و ۹۶ درجه است و بافتها در هر کدام، حدود ۳-۵ ثانیه قرار می گیرد. ۲ ظرف آخر شامل گزیلول است که برای شفاف تر شدن بافتها استفاده می شود. زمان قرارگیری نمونه ها در گزیلول در حدود ۳-۵ دقیقه است.



فرم دستورالعمل Instruction

مرکز آموزشی درمانی امیرالمومنین (ع)

رنگ آمیزی اختصاصی: در این رنگ آمیزی هر جزء از سلول رنگ خاصی به خود می گیرد.

رنگ آمیزی اختصاصی شامل:

▪ رنگ آمیزی برش های انجمادی،

▪ رنگ آمیزی بافت همبندی،

▪ رنگ آمیزی نمونه های دستگاه عصبی،

▪ رنگ آمیزی برای برخی مواد سیتوپلاسمیک،

▪ رنگ آمیزی برای آنزیم ها،

▪ رنگ آمیزی برای میکروارگانسیم ها و

▪ رنگ آمیزی سیتولوژیک.

رنگ آمیزی های اختصاصی دارای روش های مختلفی است که هر کدام توسط پزشک معالج درخواست و در آزمایشگاه پاتولوژی بسته به شرایط موجود انجام می شود. در شکل شماره (۵) ظروف رنگ آمیزی مشاهده می شود.

۸) مونتاژ لام و لامل:

برای این کار ابتدا لازم است پشت لام ها را خشک کرده و بعد لاملی را که قبلاً روی آن یک تاد و قطره چسب مخصوص ریخته شده، با پنس روی لام قرار داد. بعد اطراف لام را کاملاً تمیز کرده و اجازه داد تا در دمای آزمایشگاه خشک شود. در آخر شماره نمونه ها روی برچسب نوشته شده و با دقت روی لام ها چسبانده می شود. سپس لام ها همراه با برگه درخواست آنها در اختیار پاتولوژیست برای تشخیص نهایی قرار گیرد.

۹) بررسی پاتولوژیک بافت به روش Frozen Section

روشی است که جراح در حین عمل جراحی برای اطلاع از تشخیص سریع و دقیق نوع تومور (بد خیم یا خوش خیم بودن) و تعیین نوع عمل جراحی درخواست می کند. بنابراین در این مسیر سرعت عمل نقش بسیار مهمی ایفا می کند. Frozen Section در زمینه های مختلف مورد استفاده است به عنوان مثال وقتی قسمتی از روده جهت بررسی نوع تومور توسط جراح خارج می شود جهت اطمینان از آناتوموز دو انتهای آزاد روده، جراح درخواست آزمایش Frozen می دهد. لذا برای جلوگیری از عمل مجدد و صرفه جویی در وقت و هزینه و... از این روش تشخیصی استفاده می شود.

به طور کلی Frozen Section به مجموعه عملیاتی گفته می شود که روند آمادگی بافت جهت تشخیص پاتولوژیک را کوتاه و زمان تشخیص را برای آگاهی جراح سریعتر می کند. به علاوه اجزای سلولی مانند چربی ها می تواند با روش های رنگ آمیزی خاص، زیر میکروسکوپ دیده شود. برای انجام این کار از دستگاهی به نام کرایو استیت (Cryostat) استفاده می شود. در این دستگاه میکروتوم، بافت و چاقو همگی در یک اتاقک با کنترل دما که سطح آن با پلی اورتان عایق بندی شده، قرار دارد. اصول کار بدین صورت است که نمونه ای از بافت مورد نظر بیمار جدا شده و بلافاصله از اتاق عمل به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده می شود. قطعه مورد نظر توسط پاتولوژیست از بافت جدا و برای شروع عملیات آماده می شود. سپس نمونه در دستگاه قرار داده شده، پس از منجمد شدن برای برش آماده می گردد.

میکروتوم های Cryostat می تواند جهت بریدن نمونه های بافتی با مقاطعی به ضخامت ۵۰-۱ میکرومتر تنظیم شود. بعد از برش، نمونه برای رنگ آمیزی آماده است. برای این کار باید ابتدا نمونه را با الکل ۹۵ درجه فیکس کرد، بعد از گذشت چند ثانیه نمونه در محلول هماتوکسیلین قرار داده می شود، زمان برای این محلول ۳-۲ دقیقه است. کربنات و ائوزین محلول های بعدی است که زمان



فرم دستورالعمل
Instruction

مرکز آموزشی درمانی امیرالمومنین (ع)

برای هر کدام از این محلول‌ها حدود ۳-۲ ثانیه است. بعد نوبت به ۴ الکل درجه بندی شده (۷۰-۸۰-۹۰-۹۵) می‌رسد. نمونه در هر کدام از این محلول‌ها حدود ۱ تا ۲ ثانیه شناور می‌شود و در نهایت برای شفاف تر شدن، نمونه در دو ظرف گزیلول قرار داده شده و برای مونتاژ و تشخیص آماده می‌شود و در انتها جواب آزمایش توسط پاتولوژیست تلفنی به جراح اطلاع داده می‌شود تا روند صحیح ادامه عمل پیگیری شود.

تفاوت روش روتین با روش Frozen Section در بررسی نمونه‌های بافتی به شرح ذیل است:

(۱) اختلاف نمای مرفولوژیک از نظر طرح بافتی و نوع سلولی، بین نمونه فروزن و پرممنت وجود دارد که در ارگانهای مختلف شدت این موضوع متفاوت است.

(۲) به دلیل افزایش اندازه هسته‌ها و سلول‌ها امکان خطای تشخیص و عدم امکان رسیدن به تشخیص نهایی در روش Frozen بیشتر است.

(۳) در این روش ممکن است نوع سلول کاملاً شبیه انواع دیگری از سلول‌ها شده و امکان تشخیص دقیق فراهم نباشد، به عنوان مثال ممکن است ماکروفاژ به شکل اپیتلیال دیده شود.

(۱۰) بایگانی:

تمامی لام‌ها بلوکها جوابها و دفاتر ثبت در کمد های مخصوص بایگانی به مدت ۱۵ سال بایگانی میشوند.