

1 День (11.06.19)

Сегодня наша бригада пришла на производственную практику в КГБУЗ «Красноярское краевое патологоанатомическое бюро».

Я ознакомилась с нормативной документацией и техникой безопасности.

ИНСТРУКЦИЯ 1. Общие требования к безопасности

1.1 При работе в отделении возможно воздействие на персонал следующих опасных и вредных производственных факторов:

- повышенная нагрузка на органы зрения;
- повышенный уровень содержания в воздухе рабочей зоны токсических и химических веществ (формалина, толуола, хлороформа, органических и синтетических красителей, эфира, этилового спирта, ртутных соединений и др.)
- повышенное напряжение в электрической цепи, замыкание которой может пройти через все тело человека.

1.2 Персонал отделения обязан:

- владеть приемами оказания первой медицинской помощи
- знать правила пожарной безопасности и места расположения средств пожаротушения.

1.3 Администрация учреждения обязана обеспечивать работников санитарной одеждой, спецодеждой, спецобувью, другими предохранительными приспособлениями. Персонал отделения обязан выполнять правила личной гигиены и ношения санитарной одежды, обуви, др средств индивидуальной защиты.

1.4 Вырезка биопсийного и секционного материала должна производиться в фартуке и резиновых перчатках. Вся санитарная одежда и обувь должна храниться в отдельном шкафу в предсекционной или секционной.

2 День (12.06.19)

Методический день заполнения дневника.

3 День (13.06.19)

Сегодня я изучала организацию рабочего места лаборанта-гистолога.

Организация рабочего места.

Организация рабочего места во многом определяет эффективность и качество работы лаборанта. Рациональная расстановка и размещение лабораторной посуды, инструментария, необходимых растворов и реактивов позволяют без суеты, с наименьшей затратой усилий выполнить за одно и то же время большой объем работы.

Рабочий стол. При отсутствии специальных столов для лаборанта с успехом может быть приспособлен любой стол (желательно с ящиками) с площадью рабочей поверхности не менее 60 x 120 см.

Лаборант должен содержать свой стол в надлежащем порядке: не загромождать рабочую поверхность лишней посудой и предметами, не применяемыми в данный момент в работе. По окончании рабочего дня лаборант обязан проверить, выключены ли электроприборы, с которыми он работал.

4 День (14.06.19)

С целью правильной диагностики и успешного лечения различных заболеваний в медицинской практике используется метод прижизненного взятия материала из органов для гистологических исследований.

Хорошие гистологические препараты, изучают в световом микроскопе, должны соответствовать следующим требованиям:

- Исследуемая ткань должна в максимальной степени сохранять свое прижизненное строение
- Срезы должны быть достаточно тонкими и прозрачными для того, чтобы через них свободно проникали лучи проходящего света
- Изучаемые микроструктуры должны быть контрастными, то есть отчетливо выделяться на общем фоне препарата

Этапы обработки.

1. Взятие материала
2. Фиксация
3. Обезвоживание
4. Уплотнение материала
5. Заливка
6. Изготовление срезов
7. Окрашивание срезов
8. Просветление и заключение срезов

Занималась заливкой материала на блоки:



5 День (15.06.19)

Методический день заполнения дневника.

6 День(17.06.19)

Ходили на вырезку операционного материала.

Техника вырезки материала.

1. Кусочки органов следует вырезать острым ножом. Нельзя сдавливать кусочки, скоблить или протирать их поверхность.
2. Кусочки вырезают толщиной 0,5-1 см, длина и ширина может быть различной обычно (1× 1,5 см) с таким расчетом, чтобы получаемый срез поместился под стандартное покровное стекло.
3. Кусочки сразу же помещают в фиксирующую жидкость. Недопустимо обмывание кусочков водой перед фиксацией.

7 День(18.06.19)

Фиксация материала.

Взятый для гистологического исследования материал сразу же должен подвергаться фиксации. Фиксация – метод обработки ткани с целью закрепления ее прижизненной структуры. Это достигается путем воздействия на ткань специальных растворов (фиксаторов). Наиболее существенным изменением, происходящим в тканях под воздействием фиксатора является процесс свертывания (коагуляции) белков. Количество фиксатора следует брать в 20-100 раз больше объема кусочка фиксируемого материала.

Существуют фиксаторы простые и сложные.

К простым относятся 10-20% раствор формалина, 96 ° спирт, 100 (абсолютный) спирт, 1-2% раствор осмиевой кислоты и др.

Сложные фиксаторы: спирт – формол (спирт 70° — 100 мл. и формалин 2-5 мл.) жидкость Ценкера (сулема – 5 г, серноокислый натрий — 1 г., двуххромовокиолюый калий – 2,5 г, дистиллированная вода – 100 мл., ледяная уксусная кислота 5 мл.) и др.

Продолжительность фиксации – от нескольких часов до 1 суток и более в зависимости от свойств фиксатора и характера исследуемого материала. Ходили на вскрытие.

8 День (19.06.19)

Обезвоживание.

Перед заливкой материала в парафин или целлоидин его необходимо обезвоживать. Существует несколько традиционных способов обезвоживания. Самым распространенным является обезвоживание в спиртах восходящей концентрации, начиная с 70%. Обычно применяют батарею спиртов, состоящую из двух порций 96% и двух - 100% спирта. Продолжительность процесса обезвоживания в спиртах в среднем 48 ч в зависимости от качества материала (содержания жира в ткани) и размера кусочков, а также от их количества. При использовании автомата для заливки количество спиртов увеличивают, а при проведении кусочков по спиртовой батарее вручную их осторожно промокают фильтровальной бумагой или салфеткой из марли, что позволяет реже менять спирты в батарее.

Процесс обезвоживания можно ускорить, периодически встряхивая кусочки в банках со спиртами или поместив их в термостат при 37°C. Спирты в батарее необходимо своевременно заменять. Контролировать пригодность спирта позволяет проба с водой. В отлитое из банки небольшое количество спирта добавляют 1 каплю воды. Помутнение раствора свидетельствует о необходимости замены спирта в батарее.

При отсутствии 100% спирта в батарею включают еще одну порцию 96% спирта. Однако в этом случае всегда есть опасность недостаточного обезвоживания и возникновения трудностей при получении срезов.

9 День (20.06.19)

Уплотнение (заливка).

При заливке кусочки предварительно пропитываются теми жидкостями, которые служат растворителями для парафина (ксилол или толуол). Заливка в парафин. При заливке в парафин кусочки из абсолютного спирта переносятся в смесь абсолютного спирта с хлороформом или ксилолом, взятых поровну, затем чистый ксилол и, наконец, в расплавленный насыщенный раствор парафина в хлороформе, где они находятся в термостате при температуре 37° до 1 суток и более.

Дальнейшая заливка проводится в термостате при температуре 54° -56° в трех порциях парафина. Окончательная заливка проводится в парафин с добавлением воска, который наливают в специальные бумажные коробочки или стеклянные чашки, а затем эти коробочки или чашки после появления на поверхности парафина пленки, погружают в воду. Происходит полное затвердение парафина. Кусочки с окружающим их парафином извлекают из коробочек и с помощью расплавленного парафина, наклеивают на деревянные кубики, получаются парафиновые блоки. Уплотнения также можно добиться замораживанием кусочка органа (срочная биопсия).

10 День (21.06.19)

Заливочная станция THERMO SCIENTIFIC EC-350 Станция для заливки EC350 включает два модуля: комбинированный модуль подогрева и дозирования парафина и модуль охлаждения. EC350 обеспечивает цепочку безошибочного перенесения проведенных образцов в парафиновый блок, исключая путаницу в нумерации. Станция оснащена функцией программируемые рабочие часы, которая позволяет заранее подготовит прибор к началу рабочего дня. Комбинированный модуль оснащается эргономичными лотками для кассет и блоков и легко очищаются. Объем лотков и форм 2,2 л. Объем бака для парафина 5 л. На комбинированном модуле, рядом с дозатором находятся шесть подогреваемых лунок для щипцов, а также охлаждаемый участок для ориентации образцов. Независимый нагрев всех подогреваемых элементов модуля осуществляется в диапазоне 50-70°C Модуль дозирования и нагрева оснащен встроенным освещением, широкопольным увеличителем, индикацией параметров. Дозирование парафина можно проводить с помощью ножного привода для дозирования. Модуль охлаждения оснащен большой охлаждаемой платой. Регулировка температуры на модуле охлаждения от -15°C до 0°C. Установка температуры осуществляется просто и отражается на дисплее. В станции для заливки присутствует специальное устройство для сбора конденсата.

Заливала материал на блоки:



11 День (22.06.19)

Методический день заполнения дневника.

12 День (24.06.19)

Подготовка предметных стекол.

Предметные стекла, применяемые для получения гистологических препаратов, необходимо предварительно подготовить. Исключение составляют готовые к использованию и специально упакованные импортные предметные стекла. Предметные стекла моют в теплой мыльной воде или кипятят в 2 — 3 % растворе гидрокарбоната натрия, затем ополаскивают горячей водой и промывают в течение нескольких часов в проточной воде. Вымытые стекла протирают чистой хлопчатобумажной тканью и на несколько дней помещают в 96 % спирт. Обезжиренные стекла извлекают пинцетом из этой смеси, протирают чистой тканью и складывают в коробочку. Для лучшей фиксации срезов на стекле его предварительно смазывают смесью белка с глицерином или сывороткой. Для нанесения на стекло раствора используют планшетку. На планшетку выкладываются стекла матовой стороной. Через одно стекло чистой палочкой наносят каплю раствора. Затем стекла натирают друг о друга.

Ходила на вырезку материала.

13 День (25.06.19)

Сегодня я производила срезы на санном микротоме гистологических блоков, залитые в парафин.

Гистологические срезы.

Парафиновый блок фиксируют в объектодержателе микротомы. Укрепленные блоки подвергают обрезке с двух боковых поверхностей и оставляют только узкую полоску до 2 см на стороне обратной ножи и противоположной ей.

Во избежание скручивания срезов их придерживают за передний край кисточкой. Полученную ленту аккуратно снимают и переносят в баню с теплой водой. Срезы кладут, блестящей стороной в теплую воду на ее поверхности все хорошо расправляется.

Для наклеивания расправленных срезов в баню отпускают предметное стекло в воду, подводят под срез и подхватывают его удерживающей иглой. Стекло оплавливают в термостате при 37 градусах не менее 2 часов или оплавливают на специальном столике. После этого можно приступать к окраске.

14 День (26.06.19)

В лаборатории препараты окрашивают аппараты, стоящие в отдельной комнате. Сегодня я запускала препараты на окраску гематоксилин-эозином.

Гистологический процессор замкнутого типа **Tissue-Tek® VIP™ 5 Jr** предназначен для гистологической обработки (проводки) образцов тканей человека. Максимальная загрузка процессора составляет 150 кассет.

Аппарат оснащен угольными фильтрами, которые предотвращают испарение реактивов в атмосферу лаборатории. **Tissue-Tek® VIP™ 5 Jr** позволяет пользователю запрограммировать до 9 протоколов проводки.

Гистологический процессор **Tissue-Tek® VIP™ 5 Jr** оснащен удобной и безопасной системой замены реактивов, ультразвуковыми датчиками уровня реактивов в реторте, 4-мя термостатируемыми парафиновыми емкостями. Оборудование обладает традиционными характеристиками приборов Sakura, т.е. высоким качеством, проверенным временем.



Гистологический процессор

15 День (27.06.19)

Для того чтобы окрашенный препарат можно было исследовать в проходящем свете и возможно дольше хранить, он должен быть прозрачным и защищен от высыхания, загрязнения и повреждения. Все эти условия обеспечиваются просветлением и заключением препарата в специальные среды, которые и сохраняют его прозрачность, окраску и структурную целостность.

Среды для заключения можно разделить на две основные группы:

- а) смешивающиеся с водой (глицерин, гуммиарабик, желатин)
- б) не смешивающиеся с водой (различные смолы).

Вещества первой группы являются одновременно просветляющими и не требуют обезвоживания препарата, тогда как перед заключением препарата в смолы, его необходимо тщательно обезводить и просветлить в карболксилоле (толуол, бензол) или оптических маслах (бергамотовое, капутовое, гвоздичное и др.). Несмотря на то что методика заключения препаратов в безводные среды (смолы) более сложная и повышает стоимость препарата, она применяется наиболее часто, так как имеет ряд важных

преимуществ перед методикой заключения в водные среды. Основными из них являются: высокая степень прозрачности препарата, длительное сохранение его окраски и структур без изменений, удобство хранения. Наиболее распространенной смолой для заключения является бальзам (канадский или пихтовый).

16 День (28.06.19)

Общие методы окраски

Окраска гематоксилин–эозином - самый распространённый метод окраски. Сочетает основной и кислый красители. Поэтому позволяет выявить почти все клетки и многие неклеточные структуры. Ядра приобретают сине-фиолетовый цвет, цитоплазма – желтовато-розовый цвет.

Выявление неклеточных структур соединительной ткани.

Окраска по методу ван Гизона. Краситель - смесь растворов пикриновой кислоты и кислого фуксина.

Коллагеновые волокна (содержащиеся в межклеточном веществе соединительной ткани) окрашиваются в ярко-красный цвет, а элементы других тканей (напр., мышечные волокна) - в жёлтый цвет.

Выявление кератина и слизи по Крейбергу

Фиксированный в 10 % растворе формалина материал заливают в целлоидин или парафин.

Для окрашивания готовят алыдиановый синий, сафранин и эритрозин.

1. Алыдиановый синий: 50 мл 1 % водного раствора алыдианового синего + 50 мл 1 % раствора уксусной кислоты + 10 мг тимола.

2. Сафранин: 5 г сафранина смешивают в термостойкой посуде со 100 мл 100 % спирта, затем кипятят на водяной бане 1 ч.

Полученный раствор сливают в бутылку и к осадку добавляют еще 100 мл 100 % спирта. Вновь кипятят, повторяя эту процедуру не менее 5 раз. Полученный экстракт (700 мл раствора позволяют окрасить 1000 срезов) фильтруют и хранят в тщательно закрытой посуде.

3. Эритрозин: на водяной бане готовят 1 % водный раствор эритрозина, затем фильтруют и добавляют 10 мг тимола.

Методика окраски

1. Депарафинированные срезы ополаскивают в дистиллиро-ванной воде.

2. Ядра окрашивают любым гематоксилином без длительной дифференцировки.

3. Очень быстро дифференцируют в 0,5 % растворе соляной кислоты.

4. Тщательно просушивают фильтровальной бумагой.

5. Переносят в раствор эритрозина на 5 мин.

6. Очень быстро ополаскивают в дистиллированной воде, 96 % спирте, дистиллированной воде.

7. Переносят в раствор алыдианового синего на 3 — 5 мин.

8. Быстро обезвоживают в 96 % спирте.

9. Погружают в раствор сафранина — 5 мин.

10. Ополаскивают в 2 сменах 100 % спирта.

11. Просветляют и заключают по любой методике.

Результат: ядра клеток темно-синие, кислые гликозаминогликаны голубые, клетки красные, прочие ткани розовые и фиолетовые.

Окраска по Цилю-Нильсену

1. Фиксированный мазок, депарафинизированный срез, покрывают плоской фильтровальной бумагой и наливают на неё карболовый фуксин Циля. Мазок подогревают над пламенем горелки до появления паров, затем отводят для охлаждения и добавляют новую порцию красителя. Подогревание повторяют 2—3 раза. После охлаждения снимают фильтровальную бумагу и промывают препарат водой.

2. Препарат обесцвечивают путём погружения или нанесения на него 25%-го раствора серной кислоты или 3 % солянокислого спирта в течение 3-х минут, и промывают несколько раз водой.

3. Окрашивают препараты **водно-спиртовым** раствором метиленового синего 1 минуту, промывают водой и высушивают.

При окраске по этому методу кислотоустойчивые бактерии приобретают интенсивно красный цвет, остальная микрофлора окрашивается в светло-синий цвет.



Аппарат для покраски

17 День (29.06.19)

Методический день заполнения дневника.

18 День (01.07.19)

Хранение срезов.

После проведения морфологического исследования гистологические материалы не выбрасывают. Они поступают на хранение в архив. Блоки, на основании которых был поставлен онкологический диагноз, хранятся пожизненно (ранее, взятые до 1999 г. и при СССР блоки хранились 25 лет). Блоки, на основании которых был поставлен доброкачественный диагноз, хранятся в течение 5 лет. Они хранятся при температуре от +10 до +25°C вне холодильника в сухом помещении, в тёмном месте (коробке, футляре). Стёкла в лабораториях сохраняются лишь при наличии онкологической патологии, тоже пожизненно.

Заливала материал парафином на блоци:

