

11.05.2017

День 1

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

Когда мы пришли нас встретил заведующий организационно-методическим отделом Соколов Владимир Дмитриевич ознакомил с лабораторией.

Нормативная документация и техника 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.

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 больший 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.

Если крышка стола не имеет специального покрытия, то его следует сделать из какого-либо влагоустойчивого материала (настольное или толстое оконное стекло, линолеум, пластик или клеенка). Однако участок стола, предназначенный для непосредственной работы по приготовлению препаратов, в любом случае необходимо накрыть стеклом и расположить под ним небольшие (9 x 12 см) листы белой или черной бумаги. Этим создается соответствующий фон, облегчающий работу с окрашенными (белый лист) и неокрашенными (черный лист) объектами. Рекомендуются также на оба листа нанести контуры предметного стекла с обозначением места расположения и размеров покровного стекла. Этот простой прием позволяет рационально разместить на предметном стекле срезы в процессе их заключения.

Для того чтобы удобнее расположить необходимое оборудование, следует иметь двухъярусную полку для реактивов, растворов и посуды, которая устанавливается либо перед работающим (вдоль заднего края стола), либо сбоку в зависимости от расположения стола по отношению к источнику дневного света.

Достаточная освещенность рабочего места является одним из важнейших условий, так как изготовление гистологических препаратов требует значительного напряжения зрения. Необходимо максимально использовать дневной свет. Лучше ставить рабочий стол около окна.

Однако даже при достаточном свете рабочее место должно быть оснащено специальным осветителем к микроскопу или настольной лампой (с наклоняющейся верхней частью) для обеспечения постоянной освещенности препаратов при микроскопировании, так как изменение освещенности неблагоприятно сказывается на восприятии цвета препарата и затрудняет оценку качества его окраски.

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.

15.05.17

День 3

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.

- I. Взятие материала
- II. Фиксация
- III. Уплотнение материала
Обезвоживание
Заливка
- IV. Изготовление срезов
- V. Окрашивание срезов
- VI. Просветление и заключение срезов



16.05.17

День 4

Вырезка 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 покрывное стекло.
3. Кусочки сразу же помещают в фиксирующую жидкость. Недопустимо обмывание кусочков водой перед фиксацией.



17.05.17

День 5

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, сернокислый натрий — 1 г., двуххромовокислый 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.



18.05.17

День 6

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.



19.05.17

День 7

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 затверждение парафина. Кусочки с окружающим их парафином извлекают из коробочек и с помощью расплавленного парафина, наклеивают на деревянные кубики, получают парафиновые блоки.

Уплотнения также можно добиться замораживанием кусочка органа (срочная биопсия).



22.05.17

День 8

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 осуществляться просто и отражается на дисплее.

В станции для заливки присутствует специальное устройство для сбора конденсата.



23.05.17

День 9

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.



24.05.17

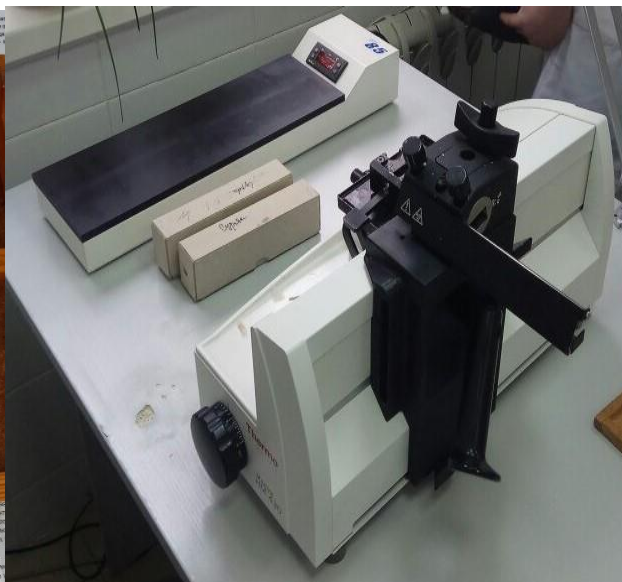
День 10

Резание парафиновых блоков.

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.



Микротомные ножи.

Существует несколько разновидностей микротомных ножей. В основу их классификации положена форма лезвия. Ножи типа А имеют одну поверхность вогнутую, а другую ровную. У ножей типа В вогнутость менее выражена.

Ножи типа С имеют ровную поверхность с обеих сторон. Сужение ножа от спинки к режущему краю довольно значительное, благодаря чему торцовая часть имеет характерный вид, по которому легко определить тип ножа. Режущий край микротомного ножа в отличие от обычной бритвы имеет так называемый фасеточный ш л и ф, т. е. угол сечения лезвия, образующийся в результате заточки лезвия под некоторым углом относительно его поверхности.

Ножи типа А делают из относительно мягкой стали, применяют при резке мелких объектов, залитых в целлоидин и состоящих из тканей малой и средней плотности (железы, стенка внутренних органов и т. д.).

Ножи типа В (имеющие меньшую вогнутость лезвия, чем тип А) изготавливают из более твердой стали и употребляют как для приготовления целлоидиновых срезов, так и при резке материала, залитого в целлоидин-парафин.

Ножи т и п а С (из твердой стали) служат для резки наиболее плотного материала (кость, хрящ, кожа), залитого в различные среды, парафиновых блоков, а также для получения срезов при работе на замораживающем микротоме. Длина ножей может быть различной — от 10 до 50 см.

Следует помнить, что получить хороший тонкий срез можно только при наличии правильно заточенного, очень острого микротомного ножа.

Существует ряд способов точки ножей, но наиболее надежным до сих пор является ручная точка на специальном точильном камне с последующей шлифовкой на ремне.

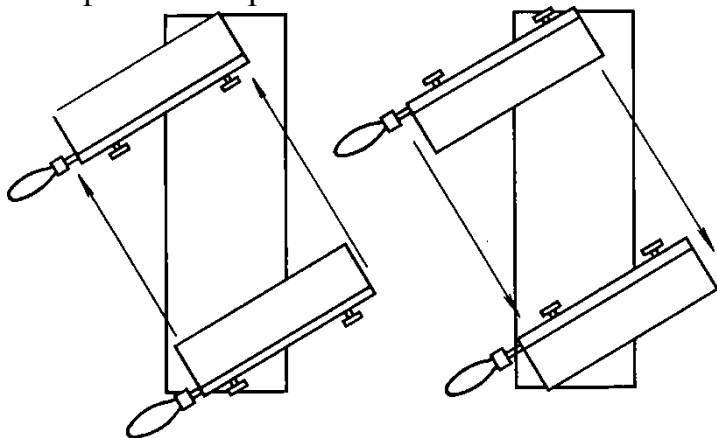


Рис. 1.

Порядок движения микротомного ножа при точке.

Однако этот способ требует большой практики и умения, приобретаемых постепенно в процессе работы.

26.05.17

День 12

Окрашивание срезов.

Изготовленные на микротоме срезы окрашиваются. Перед окраской из парафиновых срезов обязательно удаляют парафин (растворением в ксилоле).

Окрашивание необходимо производить для того, чтобы отчетливо выявить под микроскопом тонкие структуры объекта. В неокрашенных срезах большинство структур одинаково преломляет свет, поэтому рассмотреть их не удастся.

Выявление на срезе гистологических структур основано на неодинаковом их отношении к красителям. Одни структуры среза вступают в реакцию с кислыми красителями и ими окрашиваются (ацидофильные, оксифильные структуры), другие реагируют с основными красителями и окрашиваются преимущественно ими (базофильные структуры). Некоторые структуры окрашиваются и кислыми и основными красителями.

По окрашиванию определенных гистологических структур различают краски ядерные (окрашивание ядра), цитоплазматические (окрашивающие цитоплазму), и специальные, окрашивающие избирательно определенные структуры.

Ядерные краски – гематоксилин, кармин, сафранин, метиленовая синь, азур, тионин.

Цитоплазматические краски – эозин, пикрофуксин.

Чаще всего для окрашивания гистологических срезов применяется окрашивание раствором гематоксилина (приготовленным по методу Бемера) и 1-2% эозином.



29.05.17

День 13

Просветление срезов.

Окрашенные и промытые в воде срезы во избежание помутнения обезвоживают в спиртах (70°, 96°), просветляют в карбол-ксилоле, ксилоле, а затем на предметное стекло, где находится срез, помещают каплю бальзама и срез накрывают покровным стеклом. Бальзам представляет собой растворенную в ксилоле смолу одного из видов сосны, растущей в Канаде (канадский бальзам), смолу пихты (сибирский бальзам) или специальную синтетическую среду.

При исследовании биопсий с целью уточнения диагноза в гистологических лабораториях прибегают к ускоренной обработке материала. Кусочки тканей и органов при этом проходят те же этапы обработки, но за 5-7 дней. Иногда производится так называемая срочная биопсия, когда в течение 15-80 мин. материал фиксирует, получают срезы, окрашивают их и заключают. Быструю фиксацию производят в 10% формалине, подогреваемом пламенем горелки или с использованием СВЧ-печи. Уплотнения добиваются замораживанием (хлорэтилом, углекислотой или с помощью замораживающего микротом).



30.05.17

День 14

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.

БИОПСИЙНО-ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

- Гистологические препараты, относящиеся к онкологическим заболеваниям, а также во всех неясных случаях, хранятся бессрочно
- Парафиновые блоки, относящиеся к онкологическим заболеваниям, а также во всех неясных случаях, хранятся 10 лет. Уничтожаются без составления акта.
- Гистологические препараты, парафиновые блоки и «влажный» архив (в нейтральном растворе формалина) биопсийного материала при травмах органов и тканей хранятся 3 года. Уничтожаются с составлением акта за подписью заведующего и старшего лаборанта.
- Все прочие гистологические препараты и парафиновые блоки хранятся 1 год. Уничтожаются без составления акта.
- «Влажный» архив (в нейтральном растворе формалина) хранится 1 год. Уничтожаются без составления акта. Может быть уничтожен сразу после установки диагноза (кроме онкологических и инфекционных заболеваний и неясных случаев).
- Уничтожение (утилизация) биоматериалов осуществляется в соответствии с действующими нормативами и документами по утилизации биоотходов.