**Приложение 1**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования «Красноярский государственный медицинский

университет имени профессора В.Ф. Войно - Ясенецкого»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фармацевтический колледж

**Дневник**

производственной практики

по модулю «Проведение лабораторных гистологических исследований»

Козакова Юлия Витальевна

ФИО

Место прохождения практики: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно - Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации Фармацевтический колледж

(медицинская организация, отделение)

с «21» Мая 2020 г. по «11» Июня 2020 г.

Руководители практики:

Общий – Ф.И.О. (его должность) \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Непосредственный – Ф.И.О. (его должность) \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Методический – Ф.И.О. (его должность) \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Красноярск, 2020

**Содержание**

1. Цели и задачи практики

2. Знания, умения, практический опыт, которыми должен овладеть студент

после прохождения практики

3. Тематический план

4. График прохождения практики

5. Инструктаж по технике безопасности

6. Содержание и объем проведенной работы

7. Манипуляционный лист (Лист лабораторных / химических исследований)

8. Отчет (цифровой, текстовой)

**Цели и задачи практики:**

1. Закрепление в производственных условиях профессиональных умений

и навыков по методам гистологических исследований.

2. Расширение и углубление теоретических знаний и практических

умений по методам гистологических исследований.

3. Повышение профессиональной компетенции студентов и адаптации их

на рабочем месте, проверка возможностей самостоятельной работы.

4. Воспитание трудовой дисциплины и профессиональной

ответственности.

5. Изучение основных форм и методов работы в гистологических

лабораториях.

**Программа практики.**

 В результате прохождения практики студенты должны уметь

самостоятельно:

1. Организовать рабочее место для проведения лабораторных

гистологических исследований.

2. Подготовить лабораторную посуду, инструментарий и оборудование

для анализов.

3. Приготовить растворы, реактивы, дезинфицирующие растворы.

4. Провести дезинфекцию биоматериала, отработанной посуды,

стерилизацию инструментария и лабораторной посуды.

5. Провести прием, маркировку, регистрацию и хранение поступившего

биоматериала.

6. Регистрировать проведенные исследования.

7. Вести учетно-отчетную документацию.

8. Пользоваться приборами в лаборатории.

9. Выполнять гистологические манипуляции по соответствующим

методикам.

**По окончании практики студент должен представить в колледж следующие документы:**

1. Дневник с оценкой за практику, заверенный подписью общего

руководителя и печатью ККПАБ.

2. Характеристику, заверенную подписью руководителя практики и

печатью ККПАБ.

3. Текстовый отчет по практике (положительные и отрицательные

стороны практики, предложения по улучшению подготовки в

колледже, организации и проведению практики).

4. Выполненную самостоятельную работу.

**В результате производственной практики обучающийся должен:**

**Приобрести практический опыт:**

- приготовления гистологических препаратов

**Освоить умения:**

- готовить материал, реактивы, лабораторную посуду и аппаратуру для

гистологического исследования;

- проводить гистологическую обработку тканей и готовить микропрепараты

для исследований;

- оценивать качество приготовленных гистологических препаратов;

- архивировать оставшийся от исследования материал;

- оформлять учетно-отчетную документацию;

- проводить утилизацию отработанного материала, дезинфекцию и

стерилизацию использованной лабораторной посуды, инструментария,

средств защиты.

**Знать:**

- задачи, структуру, оборудование, правила работы и техники безопасности в

патогистологической лаборатории;

- правила взятия, обработки и архивирования материала для

гистологического исследования;

- критерии качества гистологических препаратов;

- морфофункциональную характеристику органов и тканей человека.

**Тематический план**

**4/6 семестр**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № | Наименование разделов и тем практики  | Всего часов |
| **4/6 семестр** | **108** |
| 1 | Ознакомление с правилами работы в ККПАБ:-изучение нормативных документов, регламентирующих санитарно -противоэпидемический режим в ККПАБ.-ознакомление с правилами работы в гистологических лабораториях. | 6 |
| 2 | Подготовка материала к гистологическим исследованиям:- прием, маркировка, регистрация биоматериала.- устройство микроскопов и техника микроскопирования.-устройство санного микротома и микротомных ножей. | 12 |
| 3 | Организация рабочего места:- приготовление реактивов, подготовка оборудования, посуды для исследования | 6 |
| 4 | Техника приготовления гистологических препаратов:- приготовление гистологических срезов;- уплотнение материала;- обезвоживание;- фиксация;- техника окрашивания срезов:а) предварительная подготовка парафиновых срезов перед окраской.-предварительная подготовка целлоидиновых срезов перед окраской.б) проведение окрашивания срезов, наклеенных на предметные стекла исвободноплавающих срезов.в) просветление и заключение срезов в специальные среды (смолы) ;- обработка биопсийного материала;- приготовление препаратов для электронно – микроскопическогоисследования | 66 |
| 5 | Регистрация результатов исследования. | 6 |
| 6 | Выполнение мер санитарно-эпидемиологического режима в ККПАБ :- проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекции лабораторнойпосуды, инструментария, средств защиты;- утилизация отработанного материала. | 6 |
| **Вид промежуточной аттестации** | Дифференцированный зачет | 6 |
|  **Итого** | **108** |

**График прохождения практики.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **№ п/п** | **Дата** | **Часы** | **оценка** | **Подпись****руководителя.** |
| **1** | **21.05.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **2** | **22.05.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **3** | **25.05.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **4** | **26.05.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **5** | **27.05.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **6** | **28.05.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **7** | **29.05.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **8** | **30.05.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **9** | **01.06.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **10** | **02.06.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **11** | **03.06.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **12** | **04.06.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **13** | **05.06.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **14** | **06.06.2020 7** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **15** | **08.06.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **16** | **09.06.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **17** | **10.06.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |
| **18** | **11.06.2020 г** | **8:00 - 14:00** |  |  |

**Лист лабораторных исследований.**

**4/6 семестр**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Исследования.** | **Количество исследований по дням практики.** | **итог** |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |  |
| изучение нормативныхдокументов |  5  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | **5** |
| прием, маркировка,регистрациябиоматериала. | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 33 | 13 | 23 | 65 | 11 | 26 | 57 | 9 | 10 | **275** |
| организация рабочегоместа | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 33 | 13 | 23 | 65 | 11 | 26 | 57 | 9 | 10 | **275** |
| приготовление срезов | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 33 | 13 | 23 | 65 | 11 | 26 | 57 | 9 | 10 | **180** |
| уплотнение материала | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 33 | 13 | 23 | 65 | 11 | 26 | 57 | 9 | 10 | **175** |
| обезвоживание | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 | 12 | 22 | 11 | 33 | 11 | 23 | 14 | 6 | 14 | **150** |
| фиксация | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 3 | 1 | 5 | 1 | 33 | 1 | 12 | 32 | 1 | 11 | 22 | 4 | 11 | **140** |
| предварительнаяподготовка парафиновыхсрезов перед окраской | 1 | 2 | 3 | 5 | 5 | 3 | 5 | 2 | 2 | 12 | 5 | 11 | 12 | 11 | 11 | 11 | 5 | 11 | **83** |
| предварительнаяподготовкацеллоидиновых срезовперед окраской | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 22 | 32 | 23 | 32 | 32 | 23 | 32 | 2 | 33 | **160** |
| окрашивание срезов | 5 | 3 | 5 | 3 | 5 | 3 | 5 | 5 | 3 | 11 | 13 | 12 | 13 | 12 | 11 | 21 | 2 | 11 | **90** |
| просветление изаключение срезов вспециальные среды(смолы) | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 7 | 8 | 1 | 22 | 31 | 32 | 21 | 33 | 11 | 11 | 1 | 1 | **110** |
| Обработка биопсийногоматериала | 3 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 2 | 2 | 1 | 3 | 15 | 12 | 13 | 17 | 48 | 11 | 1 | 9 | **132** |
| приготовлениепрепаратов дляэлектронно –микроскопическогоисследования | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 | 1 | 3 | 3 | 1 | 2 | 2 | 3 | 6 | 3 | 1 | **42** |
| микроскопия | 5 | 2 | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 4 | 5 | 24 | 33 | 22 | 24 | 22 | 13 | 23 | 4 | 3 | **60** |
| регистрация результатовисследования | 6 | 5 | 2 | 2 | 3 | 7 | 5 | 8 | 3 | 7 | 8 | 3 | 9 | 8 | 5 | 22 | 2 | 1 | **90** |
| утилизацияотработанного материала | 2 | 6 | 7 | 8 | 9 | 5 | 8 | 8 | 9 | 11 | 13 | 14 | 16 | 27 | 22 | 11 | 1 | 2 | **70** |

**Приложение 2**

**ОТЧЕТ ПО ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ ПРАКТИКЕ**

Ф.И.О. обучающегося Козакова Юлия Витальевна

Группы **305-1** специальности **31.02.03 -Лабораторная диагностика**

Проходившего (ей) производственную практику с **«21» Мая 2020** г по «**11» Июня 2020 г**

За время прохождения практики мною выполнены следующие объемы работ:

1. **Цифровой отчет**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **№** | **Виды работ** | **Количество** |
| 1 | -изучение нормативных документов, регламентирующих санитарно-противоэпидемический режим в ККПАБ. - ознакомление с правилами работы в гистологических лабораториях | **5** |
| 2 | - прием, маркировка, регистрация биоматериала.-устройство микроскопов и техника микроскопирования.-устройство санного микротома и микротомных ножей. | **500** |
| 3 | - приготовление реактивов, подготовка оборудования, посудыдля исследования | **455** |
| 4 | - приготовление гистологических срезов;- уплотнение материала;- обезвоживание;- фиксация;- техника окрашивания срезов:а) предварительная подготовка парафиновых срезов передокраской.-предварительная подготовка целлоидиновых срезов передокраской.б) проведение окрашивания срезов, наклеенных напредметные стекла и свободноплавающих срезов.в) просветление и заключение срезов в специальные среды(смолы);- обработка биопсийного материала;- приготовление препаратов для электронно –микроскопического исследования | **1085** |
| 5 | Регистрация результатов исследования. | **90** |
| 6 | проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекциилабораторной посуды, инструментария, средств защиты;- утилизация отработанного материала. | **70** |

**2. Текстовой отчет**

**1. Умения, которыми хорошо овладел в ходе практики:** Прием и маркировка биоматериала, регистрация результатов исследования, подготовка материалов к исследованию, приговорка препаратов, фиксирование препаратов, микроскопия готовых препаратов, предварительная подготовка целлоидиновых срезов перед исследованием, предварительная подготовка лабораторной посуды, инструментария, средств защиты для проведения исследования, работа с нормативной документацией при выполнении исследование, окрашивание срезов, утилизации отработанного материала.

**2.Самостоятельная работа:** Изучение нормативной документации, прием и регистрация результатов исследования, фиксирование препаратов, подготовка инструментов и посуды для исследования, микроскопия приготовленных препаратов, маркировка биоматериала, утилизация отработанного материала, проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты, обработка биопсийного материала, проведение окрашивания срезов, наклеенных на предметные стекла и свободноплавающих срезов, просветление и заключение срезов в специальные среды (смолы), приготовление реактивов, подготовка оборудования, посуды для исследования, приготовление гистологических срезов, уплотнение материала, предварительная подготовка парафиновых срезов перед окраской, окраска срезов сложными и простыми фиксаторами.

**3.Помощь оказана со стороны методических и непосредственных руководителей:** Помощь в заполнение дневника, предоставления теоретического материала для заполнения дневника и повторения пройденного материала за год обучения гистологии.

**4. Замечания и предложения по прохождению практики:** Замечания нет.

Общий руководитель практики \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 (подпись) (ФИО)

М.П.организации

**Приложение 3**

**ХАРАКТЕРИСТИКА**

Козакова Юлия Витальевна

ФИО

обучающийся (ая) на 3 курсе по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика успешно прошел (ла) производственную практику по профессиональному модулю:

**Проведение лабораторных гистологических исследований**

в объеме 108 часов с «21» Мая 2020 г. по «11» Июня 2020 г.

в организации: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно - Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Фармацевтический колледж.

За время прохождения практики:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № ОК/ПК | Критерии оценки | Оценка(да/нет) |
| ПК 5.1, ОК13 | Быстро и правильно готовит рабочее место в соответствии с методикой. | **Да** |
| ПК5.2ОК 2 | Соблюдает методику при выполнении унифицированных исследований.Правильно интерпретирует результаты исследований. | **Да** |
| ПК 5.3 | Соблюдает форму заполнения учетно-отчетной документации (журнал, бланки). | **Да** |
| ПК 5.4,ОК 11 | Проводит мероприятия по стерилизации и дезинфекциилабораторной посуды, инструментария, средств защиты.Утилизирует отработанный материал в соответствии с инструкциямии СанПин. | **Да** |
| ОК 1 | Демонстрирует интерес к профессии.Внешний вид опрятный, аккуратный. | **Да** |
| ОК 6 | Относится к медицинскому персоналу и пациентам уважительно, отзывчиво, внимательно. Отношение к окружающим бесконфликтное. | **Да** |
| ОК 7 | Проявляет самостоятельность в работе, целеустремленность,организаторские способности. | **Да** |
| ОК 9 | Способен освоить новое оборудование или методику (при ее замене) | **Да** |
| ОК 10 | Демонстрирует толерантное отношение к представителям иныхкультур, народов, религий. | **Да** |
| ОК 12 | Способен оказать первую медицинскую помощь при неотложныхситуациях | **Да** |
| ОК14 | Соблюдает санитарно-гигиенический режим, правила ОТ ипротивопожарной безопасности. Отсутствие вредных привычек. Участвуетв мероприятиях по профилактике профессиональных заболеваний | **Да** |

«11» Июня 2020 г

подпись непосредственного руководителя практики

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_/ФИО, должность

м.п.

Подпись общего руководителя практики

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_/ФИО, должность

**День 1**

**Организация рабочего места лаборанта гистолога, прием, маркировка и регистрация биоматериале**

**Лаборант** - гистолог должен знать всю цепь действий по приготовлению гистологических препаратов

**Обязан** - знать правила забоя и вскрытия экспериментальных животных

**Рабочий стол**

При отсутствии специального стола может быть приспособлен любой стол (желательно с ящиками) с площадью рабочей поверхности не менее 60 \*120 см.

Если крышка стола не имеет специального покрытия, то его следует сделать из какого - либо влагоустойчивого материала. Однако участок стола, предназначенный для непосредственной работы по приготовлению препаратов, в любом случае необходимо накрыть стеклом и расположить под ним небольшие (9\*12 см) листы белой или черной бумаги. Этим создаете» соответствующий фон, облегчающий работу с окрашенными (белый лист) и не окрашенными (черный лист) объектами. Рекомендуется также на оба листа нанести контуры предметного стекла с обозначением места расположения и размеров покровного стекла. Этот простой прием позволяем 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 относительно источника света.

**Необходимая лабораторная посуда**

 - широкогорлые банки с притертыми пробками различной вместимости от 50 до 200 мл

 - используют для составления гистологических батарей, предназначенных для подготовки кусочков тканей к заливке различными средами. Более крупные банки применяют для фиксации и хранения кусочков тканей в фиксирующих жидкостях, обработки предметных стекол, 6 приготовления нейтрального формалина и пр. Вместо банок с притертыми пробками можно использовать небольшие хозяйственные банки с жестяными завинчивающимися крышками разного объема.

 - бюксы

 - небольшие круглые стеклянные стаканчики различного диаметра и высоты со шлифованными крышками.

 - биологические стаканчики - круглые, овальные или четырехугольные (как и высокие бюксы) применяют для проводки гистологических срезов, монтированных на предметных стеклах. Для придания устойчивости и обеспечения порядка в расстановке их помещают в специальные стойки, изготовленные из дерева или пластмассы, по нескольку жук в ряд зависимости от методики обработки.

- чашки Петри - широкие, плоские стеклянные чашки с крышками - пригодны для различных манипуляций (окраска свободно плавающих и наклеенных на предметные стекла срезов, использование в качестве подставок под бюксы и т.д.).

 - мерная посуда - цилиндры и мензурки различной емкости (от 10 до 250- 500 мл) воронки различных размеров.

- химические стаканчики - круглые стеклянные стаканчики без крышек вместимостью 50-100 мл - находят широкое применение при проведении химических реакций, окраски срезов наклеенных на стекла и т.д.

- колбы (плоскодонные) вместимостью от 50 до 2 л. Малые колбы применяют для приготовления и хранения растворов различных красителей, большие - под дистиллированную воду и прочие жидкости, расходуемые в больших количествах.

- пипетки обычные (предназначенные для закапывания лекарств) используют для накалывания на срезы красителей и различных жидкостей, градуированные (вместимостью 0,1-100 мл) применяют для отмеривания малых количеств различных жидкостей. Можно использовать в настоящее время широко используемые автоматические пипетки различной вместительности.

 - предметные стекла - прямоугольные пластины размером 76\*25мм толщиной 1 мм. предназначенные для размещения гистологических срезов, расположенных на предметных стеклах. Размеры предметных стекол выбирают в зависимости от площади объекта.

**Инструменты**

Инструменты, используемые в гистологической лаборатории, включает пинцеты, скальпели, кровоостанавливающие зажимы, корцанги, шпатели, препаровальные иглы - прямые и изогнутые, металлические и стеклянные. Стеклянные иглы необходимы при импрегнации серебром, когда металлическими иглами пользоваться нельзя, также необходимо иметь спиртовку, волосяную кисточку для снятия срезов с микротомного ножа, фильтровальную бумагу, иголки» нитки, плотную бумагу для этикетирования материала, лейкопластырь и карандаш по стеклу.

**Правила взятия гистологического материала**

При микроскопическом исследовании тканей и органов большое значение имеет техника взятия материала. Соблюдение приведенных правил взятия материала позволит уменьшить количество артефактов и ошибок при гистологическом исследовании.

1. Кусочки органов следует вырезать острым ножом или бритвой. Пользоваться ножницами во избежание размятия тканей не рекомендуется. Нельзя сдавливать кусочки, скоблить или протирать их поверхность, особенно слизистую и серозную оболочки.

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. Ввиду медленного проникновения фиксатора в глубину ткани взятие на исследование более толстых кусочков не рекомендуется.

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

**Взятие материала**

 Материалом для гистологического исследования могут служить кусочки органов экспериментальных животных, материал, полученный путем прижизненного иссечения у человека кусочков тканей (биопсии), трупные материалы, мазки жидких исследуемых материалов (крови, костного мозга).

 Для гистологического исследования берут кусочки органов и тканей величиной не более 1 см3. Материал желательно получать как можно раньше после смерти людей (метод исследования материала трупа человека — аутопсия). С диагностической целью материал для гистологического исследования может забираться у людей прижизненно с помощью специальных инструментов или во время операций. Этот способ получения материала носит название биопсии.

Перед взятием материала у экспериментальных животных их умерщвляют.

Для этого используют передозировку наркоза, внутривенное или внутрисердечное введение воздуха, обескровливание (под наркозом), 8 декапитацию (отсечение головы). Затем тело животного быстро фиксируют положение на спине, используя для этой цели специальные станки или оцинкованные, или окрашенные доски с прибитыми по краям гвоздями, к которым привязывают животное. Для вскрытия брюшной полости кожу нижней части живота по средней линии приподнимают пинцетом и надсекают ножницами. Затем, тупую браншу ножниц вводят в брюшную полость, делают разрез кожи и брюшной стенки по средней линии до грудины. На края кожи и брюшной стенки накладывают зажимы Пеана и отбрасывают их в стороны, раскрывая тем самым брюшную полость. Вскрывая грудную полость, делают два разреза ребер по обе стороны от грудины. Грудину с покрывающими ее мягкими тканями удаляют. Материал, предназначенный для исследования, следует иссекать острым инструментом очень бережно, превышая во всех направлениях необходимый размер на 1-2 мм. После затвердения материала в фиксаторе отсекают ненужные края острой бритвой. Не следует брать ту часть, которую сжимали пинцетом. Если нет особой необходимости брать кусочки больших размеров, следует вырезать кусочки площадью 2-3 см2 и толщиной не более 5 мм. Если материал необходимо отмыть от крови, используют изотонический раствор хлорида натрия (0,9%) или раствор Рингера (не воду!). Раствором Рингера нередко промывают сосуды исследуемого органа прежде, чем ввести в них фиксатор. Состав раствора Рингера: хлорида натрия 0,9 г, хлорида калия 0,42 г, хлорида кальция 0,25 г, дистиллированной воды 1000 мл.

**Доставка, прием и регистрация биологического материала**

Во время транспортировки не допускается контакт предметного стекла (с нативным материалом) и бланка - направления, в соответствии с правилами биологической безопасности. Пробирки с пунктатом костного мозга и высушенные мазки доставляют в лабораторию в день взятия в специальных контейнерах.

Сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить:

- правильность оформления направления: в бланке – направлении указываются данные обследуемого (ФИО, возраст, № истории болезни или амбулаторной карты, отделение, диагноз, проведенная терапия);

 - маркировку мазков и пробирок с материалом (на них должны быть нанесены код или фамилия больного, идентичные коду и фамилии в бланке направления материала для исследования).

Лаборант должен отметить количество мазков и пробирок в бланке - направлении и зарегистрировать получение материала в лабораторном журнале.

**День 2**

**Техника приготовления гистологических препаратов для световой микроскопии**

**Основные этапы приготовления гистологических препаратов:**

1. взятие материала;

2. фиксация;

3. промывка в воде;

4. обезвоживание и уплотнение;

5. заливка;

6. приготовление срезов;

7.окрашивание;

8. заключение срезов.

**Краткая характеристика этапов:**

**1. Взятие материала.**

Для гистологического исследования берут кусочки органов и тканей величиной не более 1 см³. Материал желательно получать как можно раньше после смерти людей (метод исследования материала трупа человека -аутопсия).

С диагностической целью материал для гистологического исследования может забираться у людей прижизненно с помощью специальных инструментов или во время операций. Этот способ получения материала носит название биопсии.

**2.Фиксация.**

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 º спирт, 100 (абсолютный) спирт, 1-2% раствор осмиевой кислоты и др. Сложные фиксаторы: спирт – формол (спирт 70º - 100 мл. и формалин 2-5 мл.) жидкость Ценкера (сулема – 5 г, сернокислый натрий - 1 г., двухромовокиолый 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.

**3.Помывка в воде.**

После фиксации материал промывают (чаще всего в течение нескольких часов в проточной воде) с тем, чтобы избавить его от избытка фиксатора и различных осадков фиксирующих жидкостей.

Изучить с помощью микроскопа такие фиксированные кусочки органов невозможно, т.к. они не прозрачны. Чтобы кусочек органа можно было микроскопировать, его надо разрезать на очень тонкие пластинки - срезы, толщина которых измеряется в микрометрах. Такие срезы получают с помощью специальных приборов – микротомов. Но для того, чтобы резать на микротоме кусочек ткани, ее надо предварительно уплотнить. Это достигается путем пропитывания застывающими жидкостями - расплавленным парафином. Парафин в воде не растворяется, и поэтому промытый после фиксации кусочек ткани необходимо предварительно обезводить, и только затем пропитывать.

**4. Обезвоживание.**

Обезвоживание ткани производятся постепенно (чтобы не произошло сморщивания) путем проведения ее через спирты возрастающей крепости: 50º, 60º, 70º, 80º, 90º, 96º, 100º. В каждом спирте кусочки находятся от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины кусочка.

5.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 37º до 1 суток и более. Дальнейшая заливка проводится в термостате при температуре 54º -56º 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).

**6. Приготовление срезов.**

Срезы с блоков изготовляются на микротоме. Наиболее распространены микротомы санный и замораживающий. В специальных устройствах микротома зажимается парафиновый блок и микротомный нож. Существует механизм, поднимающий объектодержатель с блоком на заданное количество микрометров. Это позволяет при каждом скольжении ножа в плоскости параллельной поверхности блока получать срезы толщиной 5-10 микрометров с парафиновых блоков.

**7. Окрашивание.**

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 удается.

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 происхождению различают краски естественные, к которым относятся краски растительного и животного происхождения, и краски искусственные. Краской растительного происхождения является гематоксилин, который добывается из кампешевого дерева, растущего в Америке и в Армении. К краскам животного происхождения относится кармин, который добывается из насекомых кошенили, живущих на кактусовых деревьях в Мексике, Армении и др. В настоящее время большинство красок готовят синтетически (искусственные краски).

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.

Существуют специальные краски и реактивы: судан Ш (окрашивает жир в оранжевый цвет), осмиевая кислота (импрегнируемый ею жир окрашиватся в черный цвет), резорцинфуксин Вейгерта (дает темно-синюю окраску эластических волокон), орсеин (окрашивает эластические волокна в бурый цвет). Метиленовый синий окрашивает нервные элементы в синий цвет, а при импрегнации серебром они приобретают коричневый цвет.

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

**8. Заключение среза.**

Окрашенные и промытые в воде срезы во избежание помутнения обезвоживают в спиртах (70º, 96º), 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 микротома).

**Техника приготовления замороженных срезов**

 Замороженные срезы получают с помощью замораживающих микротомов или в криостате. Замораживающий микротом снабжен замораживающим столиком, на котором замораживается объект. В столике имеются камера и приспособление для подачи в камеру углекислоты, соединенное специальным шлангом с баллоном, в котором находится углекислота. Баллон закрепляется вверх дном в вертикальном положении на специальной подставке. Вместо углекислотной установки для замораживания тканей может быть использован термоэлектрический охлаждающий столик (ТОС). Более быстро и лучшего качества срезы можно получить в криостате. Криостат представляет собой холодильник, в котором поддерживается температура минус 5°С - 40°С. Чаще всего рабочей температурой является температура минус 14°С - минус 20°С. В холодильник вмонтированы микротом (криотом), имеется освещение. В передней стенке криостата имеется окошечко, в боковых стенках – отверстия с рукавами для рук оператора. Микротом в криостате обычно ротационный, ткани примораживаются к латунным держателям, держатель фиксируется на специальном стержне. Микротомный нож закреплен неподвижно, а объект при резке подводится к ножу. Существуют различные методы дальнейшей обработки срезов:

1) срез снимают на теплое (с температурой, равной комнатной) или холодное (с температурой, равной температуре криостата) покровное или предметное стекло и фиксируют в момент таяния;

2) срез снимают на теплое или холодное покровное, или предметное стекло, дают ему оттаять и подсушивают на воздухе, после чего он может быть фиксирован или не фиксирован в зависимости от дальнейшего исследования; 3) срез переносят в теплый или холодный раствор реактива (инкубационной среды при гистохимическом исследовании ферментов);

4) срез переносят в банку с теплым или холодным фиксатором;

5) срез подвергают лиофильной сушке.

**Правила приготовления препаратов (мазков) из биологического материала для цитологического исследования.**

**Методика приготовления мазка.**

Необходимой предпосылкой для точной оценки морфологических особенностей клеток в мазке является правильно сделанный, качественно фиксированный, хорошо окрашенный и методологически корректно изученный мазок, поступающий в лабораторию в сопровождении необходимых клинико-инструментальных и анамнестических данных. Невыполнение этих условий ведет к неправильному распределению клеток ткани, неполному выявлению их морфологических особенностей, "пропуску" важной диагностической информации на предметном стекле или отсутствию корригирующей клинической информации и, тем самым, к ошибочной оценке цитологической картины, а значит к неполноценному или ошибочному диагнозу. Если мазки были приготовлены вне лаборатории, то в соответствии с теми же требованиями оценивается их макроскопический вид. Сотрудники лаборатории должны постоянно обучать представителей клинических отделений, участвующих в приготовлении мазков.

**Правильно приготовленный мазок из нормальной или патологически измененной ткани должен отвечать следующим условиям:**

1. Мазок должен начинаться на 1 см от узкого края предметного стекла и заканчиваться примерно в 1.5 см от другого края предметного; мазок не должен достигать длинного края стекла, между мазком и краем предметного стекла должно оставаться расстояние примерно 0.3 см.

2. Хороший мазок должен быть максимально тонким (максимально приближающимся к однослойному), равномерной толщины (не волнообразным) на всем протяжении.

3. Мазок из осадка жидкого материала (жидкость из серозной полости, смыв из различных органов, содержимое кистозной полости и т.п.) должен заканчиваться у одного из узких краев предметного стекла в виде следа, оставленного как бы тонкой щеткой.

4. Клетки в мазке должны быть равномерно распределены, все участки мазка должны хорошо просматриваться и не содержать "толстые участки", содержащие не просматриваемые (плохо просматриваемые) скопления или комплексы клеток.

***Правила фиксации мазка****:*

Фиксация мазка проводится в соответствии с методикой, обусловленной биологическим материалом, взятым для цитологического исследования (влажная фиксация биологического материала или подсушивание его на воздухе). При влажной фиксации приготовленный мазок помещается в фиксирующую жидкость, затем подсушивается на воздухе. Недостаточная фиксация мазка ведет к некачественному окрашиванию клеток.

1. Правильная фиксация мазка обусловливает стойкость клеток по отношению к содержащейся в красках воде, которая в нефиксированном мазке изменяет строение клеточных элементов. При фиксации мазка происходит коагуляция белка, в результате чего клетки прикрепляются к предметному стеклу;

2. При фиксации цитологических препаратов должны использоваться фиксаторы, прописи приготовления которых приводятся в соответствующих руководствах.

3. Рекомендуемые фиксаторы: - метиловый спирт; - этиловый спирт; - смесь Никифорова; - фиксатор Май-Грюнвальда; - фиксатор Лейшмана; - ацетон (для иммуноцитохимии). Лучшим фиксатором является метиловый спирт, на основе которого готовят фиксатор Лейшмана и Май-Грюнвальда.

***Правила окрашивания мазка****.*

Качественное окрашивание позволяет правильно идентифицировать клеточные элементы мазка и оценить их особенности при микроскопии. В адекватно окрашенном мазке структуры цитоплазмы, ядра, ядерного хроматина, ядрышек окрашены селективно.

1. При применении любой методики окрашивания мазка важно точно соблюдать последовательность процедур приготовления растворов и временные промежутки в течение процесса окрашивания.

2. Существующие в продаже партии красителя имеют различную интенсивность окраски. Это обязывает опытным путем установить оптимальные концентрации (разведение) и время окрашивания для каждого флакона красителя, которые устанавливают при окрашивании серии препаратов растворами с различной концентрацией красителя, меняя длительность его воздействия. При приготовлении растворов необходимо учитывать рН воды: она должна быть нейтральной (pH 6,8 -7,2), что обеспечивается использованием буферных растворов.

3. Рекомендуемые методы окрашивание цитологических мазков: - азур-эозиновый, (по Романовскому, Лейшману, Май-Грюнвальду, Панпенгейму и др.); - гематоксилиновый; - гематоксилин-эозиновый; - метод Папаниколау.

4. Для уточнения диагноза рекомендуется использование цитохимических и иммуноцитохимических методов анализа в соответствии с принятыми методиками.

**Приготовление стекол**

Стекла для приготовления цитологических препаратов должны быть чистые, обезжиренные и сухие.

1. Стекла тщательно промывают щеткой в теплой мыльной (или с моющим средством) воде.

2. Основательно промывают в проточной теплой воде.

3. Затем кипятят 1-2 часа в воде с добавлением соды (2-3%) или моющего средства.

4. После хорошо ополаскивают в чистой горячей воде и промывают в проточной (1-2 часа).

Обработанные и промытые в воде стекла протирают мягкой тряпкой, держа стекла за края, и хранят в смеси Никифорова (равные части 96° спирта и эфира). По мере надобности пинцетом извлекают стекла из смеси Никифорова и протирают сухой тряпкой. Обработанные таким образом стекла могут быть использованы для приготовления цитологических препара

**День 3**

**Уплотнение материала**

С помощью микроскопа можно изучать только прозрачные срезы, следовательно, они должны быть тонкими (толщиной в сотые или тысячные доли миллиметра). Существуют специальные аппараты - микротомы, позволяющие разрезать материал на пластинки требуемой толщины, но для этого необходимо предварительно кусочек уплотнить. Это делают путем замораживания и резки на замораживающем микротоме или пропитыванием застывающими жидкостями (например, подогретым парафином) и последующей резки на обычном микротоме. После фиксации кусочки промывают, обезвоживают, заливают в парафин и затем режут

Промывка позволяет очистить материал от фиксатора. После фиксации в формалине, хромовых и сулемовых жидкостях материал промывают в проточной воде в течение 1-2 суток. После фиксации в смеси с пикриновой кислотой для промывки используют 70% спирт. От качества обезвоживания зависит качество заливки

Обезвоживание проводят в "батарее" со спиртами, крепость которых постепенно повышается. Обезвоживание ткани производятся постепенно (чтобы не произошло сморщивания) путем проведения ее через спирты возрастающей крепости: 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 96°, 100°: В каждом спирте кусочки находятся от нескольких часов до 1 суток в зависимости от величины кусочка.

На практике можно пользоваться упрощенным расчетом: брать количество спирта в миллилитрах, равное крепости требуемого рабочего спирта, и к нему доливать столько воды, чтобы их сумма соответствовала цифре крепости исходного спирта. Например, исходный спирт 96%. Для получения 60% спирта следует к 60 мл исходного спирта долить 36 мл воды. Исходным материалом для получения абсолютного (100%) спирта служит 96% этиловый спирт. Отнятие воды проводят с помощью извести (СаСОз) или обезвоженного медного купороса. Медный купорос (меди сульфат) удерживает 5 молекул кристаллизованной воды. Химически чистый медный купорос прокаливают в стеклянной или фарфоровой посуде, помешивая стеклянной палочкой до получения белого порошка безводной соли. Для обезвоживания 100 мл спирта, налитого в банку с притертой пробкой, туда помещают 10 г обезвоженного медного купороса. В течение 1-2 дней банку часто встряхивают. Купорос приобретает голубой цвет. Тогда спирт сливают в новую банку, куда насыпают белый порошок купороса, и продолжают его встряхивать. Если купорос слегка посинеет, то спирт сливают в третью банку с белым купоросом. Если после встряхивания купорос перестанет синеть, абсолютный спирт аккуратно сливают или фильтруют в чистую сухую бутылку и закрывают резиновой пробкой. С помощью свежепрокаленной извести спирт можно обезводить быстрее. Для этого его кипятят с негашеной известью 1-2 ч на водяной бане

**Обезвоживание**

Обезвоживание проводят в чисто вымытых и высушенных банках или бутылках с притертыми пробками. Для получения качественных препаратов его необходимо проводить постепенно. Нельзя сразу после промывки водой помещать кусочки в 96% спирт. Если же фиксацию или промывку проводили спиртом, то обезвоживание начинают со спирта более высокой концентрации. Материал последовательно переносят в спирт более крепкий. Время нахождения материала в спиртах зависит от размеров кусочков и характера ткани (1-2 ч для маленьких объектов, 1-2 суток для кусочков толщиной 2 см). Обычно его выдерживают в каждом спирту не менее 24 ч. При переносе кусочков в более крепкий спирт их просушивают фильтровальной бумагой. Спирты быстро загрязняются веществами, которые извлекаются из материала, особенно жиром. Их нужно проверять, смешивая с водой. Если при этом появляется белая густая муть - спирты подлежат замене.

**День 4**

**Фиксация**

Особое внимание должно быть уделено работе с химическими реактивами, красителями, ведению документации, технике безопасности в гистологических лабораториях, предупреждению профессиональной патологии. Рассмотрены современные прописи и рецепты фиксаторов и 9 красителей, подробно изложены технологии проведения гистологических исследований, апробированные при многолетней практике.

**Фиксация**

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., двухромовокислый 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.

**Правила работы с фиксаторами**

Практически все фиксаторы относятся к токсичным веществам (альдегиды, ацетоны» спирты), некоторые ядовиты (сулема, тетраоксид осмия, метанол), поэтому необходимо соблюдать правила техники безопасности при работе с реактивами, которые используют в гистологической практике. Фиксацию и вырезку материала необходимо производить в вытяжном шкафу. Материал, извлеченный из фиксатора, содержащего формалин, желательно в течение нескольких минут промыть в проточной воде, так как пары формалина оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и органов дыхания.

**Промывка в воде**

После фиксации материал промывают (чаще всею в течение нескольких часов в проточной воде) с тем, чтобы избавить его от избытка фиксатора и различных осадков фиксирующих жидкостей. Изучить с помощью микроскопа такие фиксированные кусочки органов невозможно, т.к. они не прозрачны. Чтобы кусочек органа можно было микроскопировать, его надо разрезать на очень тонкие пластинки - срезы, толщина которых измеряется в микрометрах. Такие срезы получают с помощью специальных приборов - микротомов. Но для того, чтобы резать на 11 микротоме кусочек ткани, ее надо предварительно уплотнить. Это достигается путем пропитывания застывающими жидкостями - расплавленным парафином. Парафин в воде не растворяется, и поэтому промытый после фиксации кусочек ткани необходимо предварительно обезводить, и только затем пропитывать

**Характеристика фиксаторов**

**Простые фиксаторы**

Химическая фиксация:

- альдегиды (формальдегид, глутаровый альдегид)

- хромовая кислота - тетраоксид осмия

- спирты (этанол, метанол)

- ацетон

- соли ртути (сулема)

- кислоты (уксусная, трихлоруксусная, пикриновая, азотная)

**Альдегиды** - Можно хранить месяцами, надо всего лишь контролировать рН. **Формалин** - представляющий собой 40% раствор формальдегида.

**Формальдегид** - это газ, растворимый в воде до концентрации 40% по массе. В гистологической практике используют 10% раствор формалина, что соответствует 4% формальдегиду. Продолжительность фиксации 24-48 ч при 20°С. Фиксатор может содержать примеси, в основном метанола (до 16%).

**Методы приготовления свободного от метанола формальдегид**

- 4% формальдегид по Гайеру:

- 2гр. Параформальдегида

- 50мл 0,1М фосфатного буфера (рН 7,4-7,6) = нагревают до 70 °С до просветления раствора, помешивают, охлаждают и фильтруют. Его рН 7,3- 7,5. 40% формальдегид по Глауерт: Готовят 40% параформальдегид (40гр порошка формальдегида + 100мл дистиллированной воды при нагревании до 65С, перемешивая. + несколько капель 40%гидроксида натрия до просветления раствора.

**Фиксатор Лилли для кислых гликозаминогликанов**

- Нитрат свинца 8гр;

- 40% раствор формальдегида 10мл;

- Вода 10мл;

- Этанол 80мл

Продолжительность фиксации 24 часа при комнатной температуре (при 4С2-3дня, 10-14 дней при-25С).

**Фиксатор Жандра для гликогена**

1. Пикриновая кислота, насыщенная в 96% спирте 85 частей

2. Раствор формальдегида 40% 10 частей 12

3. Ледяная уксусная кислота 5 частей

**Тетраоксид осмия**

Не коагулируются, а желатинизируются, ткани не сморщиваются. Одновременно является контрастирующим веществом в электронной микроскопии. Дорогой реагент, поступает в продажу в ампулах по 0,5 - 2 гр. Разбивают в бумаге и помещают в воду больше 24ч для 1-4 % раствора. Хранят я темноте при комнатной температуре месяцами. Для первичной фиксации липидов используют 1% раствор на 0,1 М фосфатном буфере. Для 1 фиксации: 2% ТО в ДВ -5мл; натрия хлорид -850мг; 0,2М фосфатный буфер- 5мл. Для вторичной используют сахарозу вместо натрия.

**Этиловый спирт (80 %, 90 %, 96 % и 100 %)**

Его применяют для осаждения белков, в качестве фиксатора для выявления гликогена, железа, амилоида, но он растворяет липиды. Механизм действия основан на осаждении белков, при этом происходит обезвоживание объектов, что значительно ускоряет проводку. Продолжительность фиксации от 2 часов до 1 суток. Увеличение длительности фиксации, особенно в 100 % спирте, нежелательно, так как материал значительно уплотняется и происходит его пересушивание. Оптимальная температура для фиксации материала в спирте +4°С, но ее можно проводить и при комнатной температуре. Если после спиртовой фиксации предстоит резать ткань на замораживающем микротоме или криостате, то кусочки промывают в течение 1-2 ч до их полного погружения на дно банки, при этом происходит насыщение ткани водой.

**Уранилацетат.**

Используют в электронной микроскопии как третий фиксатор (после альдегида и тетраоксида осмия) и одновременно как контрастер. Хорошо выявляет мембраны благодаря стабилизации фосфолипидов, стабилизации ДНК. Применяют 0.25-2% в воде или в 50-70% спирте (окрашивание 8 минут). Ацетон используют для увеличения скорости фиксации. Применяют 100% ацетон, для получения которого в коммерческий ацетон засыпают прокаленный сульфат меди (медный купорос) или силикагель. В ацетоне фиксируют кусочки толщиной 3 - 4 мм в течение 2 часов при 20 гр. С или 30 мин - 1 часа в термостате при 60 °С в плотно закрытой посуде. Ацетон значительно уплотняет ткань и при увеличении продолжительности фиксации возможно сморщивание объектов. Чаще ацетон применяют для обработки материала срочных биопсий при его заливке в парафин.

**Кислоты**

Азотная, пикриновая, уксусная, трихлоруксусная. Быстро проникают, препятствуют сморщиванию, ослабляют состояние гидратации. Входят в состав декальцинирующих смесей.

**Фиксатор Жандра для гликогена**

- Пикриновая кислота, насыщенная в 96% спирте- 85 частей;

 раствор формальдегида 40% -10 частей;

ледяная уксусная кислота -5 частей

**Жидкость Буэна**

Классический фиксатор для экспериментальных исследований: насыщенный раствор пикриновой кислоты - 75 мл; нейтральный 40 % формалин - 25 мл; ледяная уксусная кислота - 5 мл. Продолжительность фиксации 1-24 часов при 20 °С. Насыщенный раствор пикриновой кислоты готовят заранее из расчета 3 г. кристаллической пикриновой кислоты на 1 л. горячей дистиллированной воды. После фиксации кусочки отмывают от избытка пикриновой кислоты в 70 % спирте, затем заливают в парафин.

**Сулема (дихлорид ртути)**

Сулему применяют в качестве фиксатора с начала развития гистологии. Готовят насыщенный раствор: 10 г сулемы на 100 мл дистиллированной воды или изотонического раствора хлорида натрия доводят до кипения, охлаждают, фильтруют. Продолжительность фиксации кусочков толщиной 3 мм 6-12 часов при 20 °С. При фиксации сулемой возможно появление в тканях кристаллического осадка, который удаляют путем обработки срезов йодированным 70 % спиртом (на 50 мл 70 % спирта - 5-10 капель 5 % спиртового раствора йода до появления оранжевого цвета). По мере обесцвечивания йодированного спирта со срезами его заменяют свежей порцией вплоть до полной потери цвета, затем срезы промывают в 3-4 сменах 70 % спирта.

**Сложные фиксаторы**

Составными частями сложных фиксаторов являются простые. Существует множество вариантов фиксирующих смесей. Ниже приведены наиболее распространенные.

**Спирт - формол по Шаферу**

 - 10 % нейтральный формалин, который готовят из 1 части нейтрального 40 % формалина и - 2-3 частей- 96 % спирта.

 Продолжительность фиксации 24-48 ч. Дальнейшая промывка в воде не требуется, и материал сразу же помещают в 96 % спирт.

**Кальций - формол по Бейкеру**

используют для фиксации липидов. 10 мл 40% формалина + 90 мл дистиллированной воды; 1 г хлорида кальций; растворы смешивают. - Продолжительность фиксации 24-48 ч при 20°С. - Для гистохимических исследований с успехом применяют фиксатор Бейкера, приготовленный из параформальдегида. - К 50 г параформальдегида и 500 мл дистиллированной воды добавляют с одновременным встряхиванием несколько капель 1 н. гидроксида натрия до исчезновения осадка. - 10 г хлорида кальция + 500 мл дистиллированной воды. - Растворы А и Б смешивают, добавляют 0,5 г активированного угля. Перед использованием фильтруют. Продолжительность фиксации 24-48 часов при 20°С.

**Используется также фиксатор Карнуа**, в состав которого входят: 75 мл- 100 % спирта; 25 мл ледяной уксусной кислоты. Условия фиксации те же. В случае отсутствия этилового спирта вместо жидкости Карнуа можно использовать смесь следующего состава: изопропиловый спирт -60мл; пропионовая кислота - 30мл; ацетон 10мл; диоксан - 10мл. Продолжительность фиксации 12-24 ч при 20 °С; для промывки и обезвоживания применяют изопропиловый спирт.

**Жидкость Ценкера** - **сулемовая смесь**

- Бихромат калия -2,5 г;

- сульфат натрия- 1 г;

- дистиллированная вода 100 мл (это-жидкость Мюллера);

- сулема 5 г;

- ледяная уксусная кислота 5 мл.

Ледяную уксусную кислоту можно заменить нейтральным 10 % формалином (фиксатор Максимова, ценкер - формол). Продолжительность фиксации 1-24 часов при 20°С. После фиксации материал в течение 12-24 часов отмывают в проточной воде и помещают в йодированный 70% спирт для удаления остатков сулемы. При добавлении 10 мл 2 % раствора тетраоксида осмия хорошо фиксируются и окрашиваются липиды. В последнее время для гистологических исследований часто применяют глутаровый альдегид, параформальдегид, особенно в тех случаях, когда материал предназначается одновременно для нескольких видов исследования (иммуноморфологического, электронно - микроскопического), а его количество ограничено, например, при пункционных биопсиях.

**День 5**

**Техника окрашивания срезов; предварительная подготовка парафиновых срезов перед окраской.**

**Техника окрашивания срезов.**

1. Перед окрашиванием образцы освобождают от парафина, проводя по батарее растворителей: ксилол, спирт 100 %, 96 %, 80 %, 70 %, 60 %, вода (по 2-5 мин)

2. Для окрашивания предметные стёкла со срезами помещают на короткое время в раствор красителя, промывают водой, обрабатывают раствором другого красителя (если таковой используется тоже) и вновь промывают водой.

3. Препарат опять обезвоживают (проводя по батарее спиртов с возрастающей концентрацией), а затем просветляют (в карбол-ксилоле и ксилоле) - для удаления лишней краски.

4. Наконец, на препарат наносят каплю канадского бальзама (в случае среза) или кедрового масла (на мазки крови) и накрывают покровным стеклом.

**Приготовление парафиновых блоков.**

Пропитанные парафином кусочки ткани выкладывают в специальные формочки и заливают расплавленным в термостате или на водяной бане при 60 °С парафином, в который добавлено 1-3 % воска. Для получения парафиновых блоков нужной формы используют различные приспособления. К ним относятся изготовляемые самим лаборантом бумажные коробочки, на дно которых выкладывают кусочки, а рядом к боковой стенке ставят этикетку номером кнаружи; металлические Гобразные угольники или разъемные формочки, которые перед употреблением смазывают глицерином и помещают на нагретую металлическую пластинку, выполняющую роль дна формочек. Применяют также различные пластмассовые коробочки и формы, в частности используемые в 24 микробиологии, особенно при заливке мелких объектов, таких как материал пункционных биопсий. Специальные импортные аппараты для заливки в парафин (так называемые заливочные центры) снабжены набором различных формочек (кассет) и пинцетов. В них обеспечивается автоматическая подача дробных доз парафина оптимальной температуры. Раскладывание кусочков в формочки и их ориентирование нужно проводить быстро теплым пинцетом. Если материала для заливки много и он быстро остывает, то можно использовать парафин, подогретый на водяной бане до 60 °С. Для охлаждения формочки с материалом рекомендуют помещать в воду при 10-18 °С, но не погружать в нее. При застывании парафина поверхность блока стягивается, и в нем образуется кратерообразное углубление. Это нужно учитывать при заливке кусочков и в дальнейшей работе с блоками. Парафин должен на 3-4 мм выступать над поверхностью блока, если предстоит монтировать его на деревянную колодку. В большинстве руководств рекомендуют после подравнивания и удаления лишнего парафина наклеивать блоки на деревянные бруски с помощью подогретого на спиртовке металлического шпателя или скальпеля. Затем для обеспечения более прочного приклеивания основания блок оплавляют с четырех боковых сторон тем же горячим шпателем или скальпелем.

**Для приготовления препаратов следует:** ксилол 1 (депарафинизация) 56С 10 мин, ксилол 2 56С 10 мин, фильтровальная бумага, спирт 96% 5 мин, спирт 70% 5 мин, фильтровальная бумага, гематоксилин 5 мин, промываем дистиллированной водой, эозин до 2 мин, вода водопроводная, спирт макнуть, фильтровальная бумага, ксилол 56С больше 10 мин (для просветления).

**Приготовление парафиновых срезов.** Блок фиксируют в объектодержателе так, чтобы длинная ось блока располагалась вдоль длинной оси микротома, а поверхность блока горизонтальной. Очень важна правильная установка ножа. Оптимальным углом наклона ножа считается такой, когда плоскость фасетки совпадает с плоскостью среза. На практике угол наклона ножа обычно несколько больше оптимального. Если угол наклона ножа слишком велик, материал будет крошиться, если слишком мал, нож будет 1-2 раза проскальзывать над блоком, а потом срезать толстый срез. Парафиновые блоки режут прямым ножом. При резке парафиновых блоков нож устанавливают перпендикулярно оси микротома или слегка под углом. В последнем случае нельзя получить серийных срезов, но зато очень плотные и трудно режущиеся объекты режется легче. Когда нож установлен, к нему осторожно подводят блокодержатель с блоком и одновременно придвигают нож к блоку. Подачу объектодержателя осуществляют с помощью кремальеры, расположенной в основании объектодержателя, либо рукой, толкая санки объектодержателя вдоль наклонных рельсов. Когда блок и нож сближены, проверяют горизонтальность верхней поверхности блока, которая не должна доходить до лезвия ножа на 0,5-1 мм. После этого устанавливают микрометрическую шкалу на получение толстых срезов (30 мкм) и движением салазок ножа начинают подавать блок вверх до тех пор, пока не начинают получаться первые полные срезы, затем микрометрическую шкалу следует установить на необходимую толщину срезов. Парафиновые срезы делаю толщиной 7-10 мкм. При очень хорошо залитом материале и хорошо наточенном ноже можно получить срезы толщиной 3-5 мкм. Парафиновые срезы режут сухим ножом. Полученные парафиновые срезы осторожно, не прикасаясь к режущему краю ножа, снимают влажной кисточкой или препаровальной иглой и помещают в чашку с теплой водой или сразу наклеивают на предметное стекло. Если блоки небольшие и прямоугольные, при поперечном положении ножа при резке из срезов получают ленточки (серии). Отдельные срезы не снимают с ножа. Края их прикреплены друг к другу, и они располагаются полоской друг к другу. Эту полоску снимают целиком для дальнейшей обработки. Парафиновые срезы всегда сморщены и имеют складки. Эти морщинки и складки необходимо расправить, либо поместив срезы на поверхность теплой (не горячей, чтобы не расплавился парафин!) дистиллированной воды, либо в процесс наклеивания на предметное стекло. Наклеивают парафиновые срезы на чистые обезжиренные предметные стекла, смазанные белком с глицерином. Для приготовления последнего свежий яичный белок взбивают шпателем и фильтруют через смоченный дистиллированный водой бумажный фильтр. К профильтрованному белку добавляют равный объем глицерина, смешивают и кладут для предупреждения загнивания 2-3 кусочка тимола величиной с зернышко пшеницы. В зарытой склянке белок с глицерином наносят на предметное стекло и пальцем размывают тонким слоем по стеклу. Если срезы были помещены в чашку с дистиллированной водой, белок на стекле коагулирует, подержав стекло над спиртовкой белком вверх. Затем расплавленный срез при помощи кисточки выливают из воды и переносят на стекло. Осторожно наклоняя предметное стекло, дают воде стечь и затем на 12-24 ч стекло переносят в термостат с температурой 37°C. Более употребителен другой способ наклеивания и расплавления парафиновых срезов. При этом на смазанное белком с глицерином предметное стекло наносят несколько капель дистиллированной воды, на которую прямо с миротомного ножа переносят срезы. Затем стекло осторожно подогревают над спиртовкой до полного расправления срезов, при этом следует избегать расплавления парафина, так как в противном случае материал портится. Излишнюю воду осторожно удаляют фильтровальной бумагой, и стекла оставляют для просушки при комнатной температуре или в термостате при 37°C. Вместо спиртовки для расправления парафиновых срезов можно использовать специальный электрический прибор «Приспособление для сушки и расправления парафиновых срезов», представляющий собой подогреваемый до нужной температуры столик. На покрытое белком стекло наносят несколько капель дистиллированной воды, кладут стекла на столик и переносят на него срез. После расправления среза лишнюю воду удаляют фильтровальной бумагой и оставляют стекло с наклеенным срезом на столике для досушивания. Правила резки парафиновых блоков и некоторые способы устранения возможных недостатков заключается в следующем. Передвигать салазки ножа нужно равномерно, не нажимая на них. Если материал крошиться, то это можно зависеть от слишком большого наклона ножа или от слишком тугоплавкого парафина и низкой температуры окружающей среды. Правильный угол наклона можно найти эмпирически, попробовав разные углы наклона. На влияние низкой температуры можно, подышав на блок или пристроить настольную лампу таким образом, чтобы она светила на блок и слегка его согревала. Если залитый материал отделяется от парафина или выпадает из него, причина может заключаться в недостаточном удалении из материала спирта или в использовании при заливке слегка охлажденного парафина. В любом случае материал нужно поместить обратно в промежуточную среду (ксилол, хлороформ) и затем повторить заливку. Если срезы разрываются и покрываются бороздками, это означает, что на ноже есть зазубрены. Можно попробовать слегка подвинуть нож, так чтобы на блок приходился другой его участок. Если это не поможет, необходимо точить нож заново. Закручивание срезов и их прилипание к ножу встречаются при очень мягком парафине и высокой температуре окружающей среды. В этом случае пред резкой модно положить блок в холодильник, а во время резки время от времени класть не него кусочек льда, завернутый в марлю. Причиной того, что не каждый срез, а лишь каждый второй годен для исследования, может быть неправильный угол наклона ножа. Возможно также, что срезы слишком тонки на несколько микрометров увеличить толщину среза. Если блок плохо режется, нож подскакивает на поверхности блока и толщина срезов неровная, это объясняется чрезмерным уплотнением материала при фиксации. Исправить этот недостаток нельзя, но можно попробовать подышать на блок и поставить микротомный нож не перпендикулярно, а под углом. Серии срезов при этом получить нельзя, но отдельные срезы режутся лучше. В сухую погоду срезы электризуются и сильно прилипают к ножу. Это можно предотвратить, подышав на нож перед резанием. Маркировка стекол обычно следует за резанием блоков. Для этого при наклеивании срезов на блок один конец стекла оставляют свободным. Надпись на стекло можно наносить с помощью алмазного отметчика, но чаще это делается тушью. Так как тушь размазывается или стирается, следует ее наносить на смазанный белком и высушенный конец стекла. Затем этот конец нагревают над спиртовкой. Надпись при этом фиксируется и в дальнейшем не стирается.

**День 6**

**Предварительная подготовка целлоидиновых срезов перед окраской; устройство микроскопа и техника микроскопирования.**

**Заливка ткани в целлоидин. Целлоидин** - хорошо растворяющаяся в эфире нитроклетчатка. В гистологической практике применяют 2 %, 4 % и 8 % растворы целлоидина, которые готовят из целлоидиновых пластин или отмытой от эмульсии и высушенной рентгеновской пленки. Для приготовления 500 мл 2 % раствора целлоидина 10 г сухого целлоидина заливают 250 мл 100 % спирта и оставляют на 1 сутки, затем добавляют 250 мл. безводного эфира, который растворяет набухший в спирте целлоидин. Для приготовления 4 % и 8 % растворов количество целлоидина увеличивают соответственно в 2 и 4 раза. Растворы хранят в плотно закрытой посуде. Заливка ткани в целлоидин стала в настоящее время менее популярной, чем парафиновая, и ее применяют главным образом для обработки труднорежущихся тканей и объектов больших размеров, с которых трудно получить хорошие парафиновые срезы. Целлоидиновую заливку используют 20 также в тех случаях, когда необходимо избежать воздействия на исследуемый материал высоких температур. Кроме того, заливка материалов в целлоидин позволяет получить лучшие результаты при наличии в объектах больших полостей, лакун и слоев различной консистенции. Эфир и сухой целлоидин огнеопасны, поэтому при работе с ними необходима осторожность. Обезвоженный материал помещают в смесь 100 % спирта с эфиром (1:1) на 4-6ч, переносят в 2 % раствор целлоидина на 2-3 дня, затем в 4 % и 8 % растворы на 5-7 дней в каждый. Пропитанный кусочек заливают свежим 8 % целлоидином и уплотняют в парах хлороформа (в эксикаторе). Уплотненный таким образом материал заливают 70 % спиртом для хранения. Вырезанные блоки наклеивают густым целлоидином на деревянные колодки на 1 суток перед резкой.

Приготовление целлоидиновых срезов. Блок фиксируют в объектодержателе так, чтобы длинная ось блока располагалась вдоль длинной оси микротома, а поверхность блока горизонтальной. Очень важна правильная установка ножа. Оптимальным углом наклона ножа считается 21 такой, когда плоскость фасетки совпадает с плоскостью среза. На практике угол наклона ножа обычно несколько больше оптимального. Если угол наклона ножа слишком велик, материал будет крошиться, если слишком мал, нож будет 1 - 2 раза проскальзывать над блоком, а потом срезать толстый срез. Целлоидиновые блоки режут плосковогнутым ножом. При резке целлоидиновых срезов нож устанавливают под углом. Когда нож установлен, к нему осторожно подводят блокодержатель с блоком и одновременно придвигают нож к блоку. Подачу объектодержателя осуществляют с помощью кремальеры, расположенной в основании объектодержателя, либо рукой, толкая санки объектодержателя вдоль наклонных рельсов. Когда блок и нож сближены, проверяют горизонтальность верхней поверхности блока, которая не должна доходить до лезвия ножа на 0,5-1 мм. После этого устанавливают микрометрическую шкалу на получение толстых срезов (30 мкм) и движением салазок ножа начинают подавать блок вверх до тех пор, пока не начинают получаться первые полные срезы, затем микрометрическую шкалу следует установить на необходимую толщину срезов. Толщина целлоидиновых срезов обычно составляет 12-15 мкм. При резке целлоидиновых срезов поверхность ножа и поверхность блока постоянно смачивают 70% спиртом. Целлоидиновые срезы переносят с ножа в низкий бюкс с 70% спиртом и в дальнейшем окрашивают без наклеивания на предметное стекло, помещая срезы с помощью препаровальной иглы с загнутым концом или стеклянным крючком в соответствующие реактивы.

**Устройство микроскопа:**

• окуляр;

• основание;

• осветитель;

• предметный столик;

• держатель («револьвер») для объективов;

• объективы;

• конденсор;

• диафрагма.



**Техника микроскопирования:** ставим микроскоп на против себя, дезинфицируем 95% спиртом сначала окуляр, объектив, предметный столик и затем уже весь микроскоп. Включаем в сеть, настраиваем. Микроскоп установить перед собой, немного слева на 2-3 см от края стола. Во время работы его не сдвигать; открыть полностью диафрагму, поднять конденсор в крайнее верхнее положение; работу с микроскопом всегда начинать с малого увеличения; опустить объектив в рабочее положение, т.е. на расстояние 1 см от предметного стекла; положить микропрепарат на предметный столик так, чтобы изучаемый объект находился под объективом. Глядя сбоку, опускать объектив при помощи макровинта до тех пор, пока расстояние между нижней линзой объектива и микропрепаратом не станет 4-5 мм; смотреть одним глазом в окуляр и вращать винт грубой наводки на себя, плавно поднимая объектив до положения, при котором хорошо будет видно изображение объекта. Нельзя смотреть в окуляр и опускать объектив. Фронтальная линза может раздавить покровное стекло, и на ней появятся царапины; передвигая препарат рукой, найти нужное место, расположить его в центре поля зрения микроскопа; для изучения объекта при большом увеличении, сначала нужно поставить выбранный участок в центр поля зрения микроскопа при малом увеличении. Затем поменять объектив на 40 х, поворачивая револьвер, так чтобы он занял рабочее положение. При помощи микрометренного винта добиться хорошего изображения объекта. На коробке микрометренного механизма имеются две риски, а на микрометренном винте - точка, которая должна все время находиться между рисками. Если она выходит за их пределы, ее необходимо возвратить в нормальное положение. При несоблюдении этого правила, микрометренный винт может перестать действовать; по окончании работы с большим увеличением, установить малое увеличение, поднять объектив, снять с рабочего столика препарат, протереть чистой салфеткой все части микроскопа, накрыть его полиэтиленовым пакетом и поставить в шкаф.

**День 7**

**Проведение окрашивания срезов, наклеенных на предметные стекла и свободноплавающих срезов.**

При окраске водными красителями срезы переносят из дистиллированной воды, а при окраске спиртовыми – из спирта соответствующей концентрации, непосредственно в красящий раствор (прямое окрашивание) или сначала в жидкость для протравки (непрямое окрашивание). Когда препарат приобретает.

Нужную интенсивность окраски, его промывают в воде (или спирте) для удаления избытка красителя, а затем, если нужно, дифференцируют в соответствующей жидкости. Излишний краситель отмывают до тех пор, пока он не перестает переходить из среза в отмывающую жидкость.

Окрашивание срезов, наклеенных на стекло, проводят путем помещения их в красящий раствор. Для этого специальные кюветы, позволяющие красить одновременно большое количество стекол, проводят по схеме в высоких стаканчиках с краской.

Для того чтобы окрашенный препарат можно было исследовать в проходящем свете и дольше хранить, он должен быть прозрачным и защищен от высыхания, загрязнения и повреждения.

**Все эти условия обеспечивают просветлением и заключением препарата в специальные срезы.**
- Просветление и заключение срезов в специальные среды (смолы).

Просветление делает препараты прозрачными, проходимыми для лучей света и потому удобными для исследования. Различают две группы просветляющих веществ в зависимости от того, способны ли они просветлять срезы после извлечения их из воды или только после обезвоживания спиртом.

Первую группу веществ, т. е. просветляющих срезы после воды, составляет глицерин, глицерин-желатина и т. д. и ряд сложных специально приготовленных сред, как-то: фаррактова жидкость, масса Апатии. Подобные просветляющие вещества обычно употребляют при некоторых специальных методах исследования, например, на липиды, амилоиды. В этом случае окрашенный срез извлекают из воды на предметное стекло, расправляют, удаляют избыток воды вокруг среза тряпкой, кладут каплю глицерина или другое просветляющее вещество из этой группы и покрывают покровным стеклом. Можно применять этот метод и для различных ориентировочных исследований.

Ко второй группе веществ (просветляющих срезы после спирта) относятся ксилол, толуол, эфирные масла, карболксилол, карболтолуол и т. д.

Для просветления срезов чаще всего пользуются веществами второй категории, так как они обладают более высоким просветляющим эффектом и дают прочные препараты. По этой последней причине срезы после окрашивания подвергают спиртовой обработке, то более, то менее тщательной смотря по тому, с каким просветляющим средством приходится работать.

Так, например, ксилол и толуол весьма чувствительны к качеству обезвоживания срезов и поэтому здесь показано применение абсолютного спирта. Креозот, эфирные масла, карболксилол в этом отношении менее чувствительны, они легко просветляют и после 960 спирта. Все просветляющие вещества обладают теми или иными неблагоприятными свойствами, проявляющимися иногда при длительном хранении препаратов. Один из них вызывает пожелтение препаратов (креозот), другие сильно морщат срезы (ксилол, толуол, карболксилол) и, наконец, почти все они, за исключением ксилола и толуола, в той или иной степени извлекают различные синтетические (анилиновые) красители и поэтому имеют ограничения.

На основании вышеизложенного, делаем вывод, что большим достоинством ксилола и толуола является их абсолютно индифферентность к любым красителям.

В практической работе при простых окрасках (гематоксилин-эозин, по Ван-Гизону) и многих специальных методах исследования для целей просветления удобнее всего пользоваться комбинацией просветляющих средств, т. е. просветлять срез вначале веществом, не требующим абсолютного спирта (эфирное масло, креозот, карболксилол), а затем быстро в течение 1 минуты, обрабатывать ксилолом, применяя его повторно. В просветляющем веществе срез держат до тех пор, пока он не станет совсем прозрачным. На черном фоне стола непросветленные участки среза представляют в виде беловатых пятен. Эта операция занимает от 15-20 секунд до нескольких минут. Быстрота просветления препарата зависит от крепости употреблявшегося спирта и тщательности обработки им. При неудовлетворительной спиртовой обработке, а также для более скорого просветления показано повторное применение просветляющего вещества, которое в этом случае часто комбинируют с быстрым просушиванием среза втрое или вчетверо сложенной фильтровальной бумагой.

Просветленные и обработанные ксилолом срезы заключают в специальные срезы.

**Для заключения гистологических срезов используют такие вещества**, как канадский и пихтовый бальзамы, канифоль, гумми - сироп, глицерин и др. Одни из них являются веществами дефицитными, другие обладают существенными недостатками.

Применение пластических масс для заключения гистологических срезов позволяет отказаться от всех перечисленных выше веществ и от покровных стекол, т. к. пластмасса пропитывает срез и одновременно покрывает его тонким слоем сверху, заменяя тем самым покровное стекло.

**День 8**

**Виды биопсий**

 Биопси́я (от др.-греч. βίος - жизнь + ὄψις - внешний вид) - метод исследования, при котором проводится прижизненный забор клеток или тканей (биоптата) из организма с диагностической или исследовательской целью. Биопсия является обязательным методом подтверждения диагноза при подозрении на наличие онкологических заболеваний.

В клинике используют несколько способов взятия биопсийного материала: открытый, пункционный, аспирационный, эндоскопический, трепанобиопсия. Кроме того, важное значение имеет цитологический метод (мазки, отпечатки и т.д.), связанный с минимальной травмой при взятии материала и возможностью проведения исследования в экстренном порядке. Гистологические и цитологические методы взаимно дополняют друг друга.

**Существует сложившийся порядок поступления биопсийного материала в патогистологическую лабораторию**.

**1. Материал**, предназначенный для гистологического исследования, должен иметь четкую маркировку и сопровождаться направлением. Материал от одного больного должен быть помещен в отдельную посуду. Этикетку из плотной, неразмокающей в воде бумаги (лучше фотобумаги) прикрепляют к объекту. Надписи делают только мягким простым карандашом.

**2. Фиксацию** производят в предоперационной, куда заранее доставляют в достаточном количестве 10 % нейтральный формалин.

**3. Стандартный** бланк направления на патогистологическое исследование заполняет и подписывает лечащий врач. При этом в направлении отражают такие клинические данные, как продолжительность заболевания, характер проведенного лечения, результаты предыдущих исследований, если они проводились. При наличии опухоли необходимо указать ее точную локализацию, темпы роста, размеры, консистенцию, отношение к окружающим тканям, наличие метастазов и других опухолевых узлов, специальное лечение и клинический диагноз. Если в направлении отсутствуют необходимые данные, заведующий патологоанатомическим отделением ставит об этом в известность заведующего того отделения, откуда была прислана биопсия, а при повторных случаях сообщает администрации.

**4. При приеме материала в направление и журнал поступлений вписывают** порядковый номер патогистологического исследования каждого объекта и время поступления материала, а также указывают характер биопсии - диагностическая, срочная, операционный материал, количество кусочков, методики окраски.

**5. Материал диагностической биопсии** запрещается делить на части и посылать их в разные патогистологические лаборатории, то же самое относится и к материалу для цитологического исследования.

**6. Ответственность за качество доставленного** в лабораторию материала несет врач, назначивший данное исследование. Подсохший, загнивший, замороженный, нефиксированный материал не принимают в патогистологическое отделение и о таких фактах сообщают администрации лечебного учреждения.

**7. Если по условиям работы** невозможно сразу отправить из операционной материал в патогистологическую лабораторию, то хирург, проводивший операцию, обеспечивает правильную фиксацию материала и его сохранность.

После регистрации из присланного на исследование объекта вырезают необходимое количество кусочков. Материал, полученный методом соскоба, в том числе при гинекологическом исследовании, аспирационных и других биопсиях, а также трепанобиопсии, исследуют целиком.

**Приготовление препаратов для электронной микроскопии**

**Электронный микроскоп** - это прибор для наблюдения и многократного фотографирования увеличенного изображения объекта, в котором вместо световых лучей используют пучки электронов, ускоренных до больных энергий в условиях глубокого вакуума.

Электронная микроскопия может быть трансмиссионной (в проходящем пучке, подобно световой микроскопии) и сканирующей (снимающая рельеф поверхности).

**- срезы для электронного микроскопа используются однократно.**
**- биологические объекты должны быть толщиной не более 0,1 мкм.**

**1.Взятие материала и его фиксация*.*** Фиксация осуществляет в 2 стадии. Кусочки тканей фиксируются сначала в глутаральалдегиде, а затем четырехокисью осмия.
**2. Уплотнение материала*.***Обезвоживаются в спиртах, и заливаться в пластмассы. Заливку производят в специальных формах путем, затвердение смеси происходит путем ее полимеризации в термостате, затвердевшие блоки имеют вид маленьких свечей.
**3. Приготовление срезов**.Блок, заключенный в пластмассу объектом крепится на приборе – ультрамикротоме. Площадь ультратонких срезов 0,1-1 мм2
**4. Окрашивание или контрастирование срезов.**Срезы, смонтированные на сетках с подложкой необходимо дополнительно окрашивать с помощью солей тяжелых металлов (урана, свинца), которые связываясь с внутриклеточными структурами, дают положительное окрашивание. Изображение объектов получают на фотопластинках или на экране компьютера.

**День 9**

**Проведение микроскопического исследования цитологических и гистологических мазков.**

**Гистологические мазки:**

**Гистологическое исследование** - это исследование тканей под микроскопом. С помощью специальных растворов кусочек ткани обезвоживают и делают жирорастворимым для последующей пропитки парафином в специальных формах. С помощью микротома с вмонтированным очень острым ножом, который может снимать слои толщиной от 3 микрометров, выполняют срезы. В последующем срезы монтируют на стекло и проводят их подготовку для окраски, что позволяет сделать видимым под микроскопом клетки и их элементы, а также различные элементы межклеточного вещества тканей. Специалист-патологоанатом по результатам исследования объекта под микроскопом, дает заключение, на основании которого формируется клинический диагноз или выставляет окончательный диагноз

В современной медицине используются два способа проведения гистологического исследования.

При обычном способе полученный биоптат обрабатывают фиксирующим веществом, которое не дает ему распадаться под воздействием ферментов, и уплотняют, заливая парафином. Затем полученный препарат нарезают микротомом на «ломтики» толщиной не более 8 мкм и окрашивают. После этого препарат изучают при помощи микроскопа и выносят заключение. Обычно результаты готовы через 7-10 дней. Дольше всего приходится ждать результатов обследования биоптата костной ткани - около 2 недель.

Однако иногда результаты гистологического исследования нужны врачу немедленно, в течение часа - например, при проведении операции, когда встает вопрос о немедленном удалении или сохранении органа. В этом случае применяется ускоренная методика гистологического исследования, при которой биоптат замораживают, режут микротомом и сразу проводят микроскопию. Исследование занимает всего час или менее

**Выделяются следующие виды микроскопии:**

1) световая микроскопия (наиболее распространенный вид микроскопии, при этом разрешающая способность микроскопа составляет 0,2 мкм);

2) ультрафиолетовая микроскопия (разрешающая способность микроскопа составляет 0,1 мкм);

3) люминисцентная микроскопия (применяется для определения в исследуемом гистологическом препарате определенных химических структур);

4) фазово-контрастная микроскопия (применяется для обнаружения и изучения определенных структур в неокрашенных гистологических препаратах);

5) поляризационная микроскопия (используется в основном для изучения волокнистых структур);

6) микроскопия в темном поле применяется для изучения живых объектов;

7) микроскопия в падающем свете (предназначена для изучения толстых объектов);

8) электронная микроскопия (наиболее современный вид микроскопии, имеющий разрешающую способность 0,1 - 0,7 нм). Имеются две разновидности электронной микроскопии - просвечивающая (трансмиссионная) и сканирующая (или растворная) микроскопия, дающая отображение поверхностных ультраструктур.

**Цитологические мазки:**

**Цитологическое исследование**. Принципиально цитологическое исследование отличается от гистологического тем, что при нём проводится не исследование ткани, а исследование клеток. Так, далеко не всегда удается взять кусочек ткани, да и не всегда это нужно. Выполняется такое исследование с целью раннего выявления или исключения наличия предопухолевых заболеваний. При этом с поверхности подозрительного образования берутся только клетки. После обработки и окрашивания препарата паталогоанатом исследует полученные клетки и дает заключение о том, какой же природы - это образование.

Критерии цитологической диагностики злокачественных новообразований составляются из оценки клетки, ядра и ядрышка.

**Клетка:**

- увеличена в размере, иногда гигантская, редко размер близок к норме, что затрудняет цитологическую диагностику, например, при коллоидном, тубулярном раке, маститоподобном варианте долькового рака молочной железы, фолликулярном раке щитовидной железы, карциноиде, почечноклеточном светлоклеточном раке, высокодифференцированных веретеноклеточных саркомах;

- изменение формы и полиморфизм клеточных элементов;

- нарушение соотношения ядра и цитоплазмы в сторону увеличения доли ядра;

- диссоциация степени зрелости ядра и цитоплазмы, например, молодое ядро в ороговевшей цитоплазме при высокодифференцированном плоскоклеточном раке.

**Ядро:**

- увеличение размера, полиморфизм, бугристость, неравномерный рисунок хроматина, наиболее постоянный признак - неровность контуров, гиперхромия, фигуры клеточного деления в цитологических препаратах сравнительно редки.

**Ядрышко:**

- число ядрышек больше, чем в нормальной клетке, ядрышки увеличены в размере, неправильной формы.

Несмотря на присутствие критериев злокачественности у подавляющего большинства клеток, в некоторых клетках рака эти критерии могут отсутствовать или быть выражены в неполном объеме. Необходимо обращать внимание на особенности взаимного расположения клеток, характер межклеточных связей. Заключение формулируют по совокупности признаков при достаточном количестве клеточного материала. Попытка оценить мазок по неадекватно взятому материалу - наиболее частая причина ошибочных заключений.

**Основные задачи цитологической диагностики состоят в следующем:**

1. Формулировка заключения до лечения.
2. Интраоперационная срочная диагностика.
3. Контроль эффективности лечения.
4. Оценка важнейших факторов прогноза течения заболевания.

**Цитологическое заключение до лечения включает:**

* определение гистогенеза новообразований;
* установление степени дифференцировки опухолевого процесса;
* уточнение степени распространенности опухоли;
* изучение фоновых изменений;
* определение некоторых факторов прогноза;
* возможность исследования бактериальной флоры.

Современное цитологическое заключение не только констатирует наличие рака, но и указывает гистологический тип опухоли и степень дифференцировки согласно общепринятым международным классификациям (МКБ-О и ВОЗ).

Критериями достоверности цитологического метода являются результаты сопоставления с плановым гистологическим исследованием. Наибольший процент совпадений цитологического заключения с окончательным гистологическим заключением наблюдается при исследовании образований кожи, молочной, щитовидной железы, при метастатическом поражении лимфатических узлов. Результаты исследования гиперпластических процессов в эндометрии неудовлетворительны (достоверность 30-50%) и заставляют искать пути совершенствования диагностики. Достоверность цитологической диагностики патологии шейки матки составляет 75-90%. 3-24% исследований, в зависимости от локализации и способа получения материала, оказываются неудачными из-за неадекватно полученного, неинформативного материала.

Интраоперационная цитологическая диагностика - одно из основных направлений цитологического метода исследования. Во время операции, используя цитологический метод, уточняется характер патологического процесса, степень распространенности с выявлением метастазов в лимфатические узлы, печень и другие органы, производится контроль радикальности выполненной операции с исследованием краев резекции. Роль цитологии возрастает при разработке показаний к расширенным лимфоаденэктомиям и при определении так называемых «сторожевых», или «сигнальных», лимфатических узлов, которых может быть шесть, и применение гистологического метода невозможно из-за длительности исследования. По данным ведущих клиник, ошибка срочного гистологического исследования «сторожевых» лимфатических узлов составляет 25%, поэтому они рекомендуют использовать интраоперационное цитологическое исследование отпечатков с поверхности разрезанного лимфатического узла. По нашим данным, достоверность срочного цитологического исследования по выявлению метастатического поражения лимфатических узлов составляет 97-99%.

**- архивировать оставшийся от исследования материал.**

В патолога - анатомическом бюро (отделении) формируется архив, который включает следующие материалы:

- Направления;

- Протоколы;

- Журналы;

- микропрепараты;

- тканевые образцы в парафиновых блоках;

- тканевые образцы в 10%-ном растворе нейтрального формалина;

- материалы, полученные по результатам патолога-анатомических вскрытий, указанные в пункте 34 порядка проведения патолога-анатомических вскрытий, утвержденного приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2013 г. № 354н.

**Сроки хранения в архиве патолога-анатомического бюро (отделения) биопсийных (операционных) материалов и документов, оформленных в рамках патолога-анатомических исследований:**

- Тканевые образцы в 10%-ном растворе нейтрального формалина при наличии опухолевого или опухолеподобного процесса - не менее одного года с даты оформления протокола, в прочих случаях - не менее чем до окончания оформления протокола;

- Микропрепараты и тканевые образцы в парафиновых блоках - в течение срока хранения медицинской документации пациента;

- Направления и протоколы - в течение срока хранения медицинской документации пациента.

**День 10**

**Качественно приготовленный гистологический препарат должен:**

* иметь толщину не более 10 мкм,
* быть хорошо расправленными без образования складок и разрывов;
* при невозможности получить качественный срез допускается изготовление срезов и их фрагментов различной толщины;
* окраска срезов должна быть равномерной с четким дифференцированием различных структур;
* срезы должны быть хорошо просветлены;
* не допустимо загрязнение срезов инородными частицами, кристаллами красителя, а также попадание пузырьков воздуха под покровное стекло;
* из одного объекта изготавливают 1 - 2 среза для одной методики окраски;
* при необходимости число срезов может быть большим, вплоть до серии последовательных срезов;
* после изготовления препаратов на предметном стекле тушью или восковым карандашом обозначают номер экспертного исследования и год изготовления гистологических препаратов.

**Интерпретация результатов гистологического исследования**

Врач - гистолог получает материал и начинает он с описания макроскопической картины. То есть в начале он описывает внешний вид (цвет, плотность, видимые изменения поступившего к нему органа или кусочка ткани). Затем препарат готовится (информация об этом представлена выше) и изучается уже непосредственно под микроскопом. Изучается микроскопическая картина, которой врач-гистолог даёт описание и в конце ставит диагноз. В направлении на гистологию лечащим врачом часто указывается предварительный диагноз или диагноз под вопросом, который, собственно, может подтвердиться или нет.

**День 11**

**Выполнение мер санитарно-эпидемиологического режима в ККПАБ и цитологической лаборатории**

**Средства индивидуальной защиты**

Средствами индивидуальной защиты при работе в лабораториях являются халаты, косынки или шапочки, прорезиненный или полиэтиленовый фартук, резиновые перчатки, защитные очки.

Прорезиненный или полиэтиленовый фартук, резиновые перчатки, защитные очки (должны плотно прилегать к лицу) необходимы при работе с биологическим материалом и едкими веществами.

Халат является формой одежды медицинского персонала, стирается по мере загрязнения, но не реже 2 раз в неделю. В случае загрязнения биологическим материалом обязательно предварительное замачивание в дезинфицирующем растворе в соответствии со стандартом «Дезинфекция и стерилизация в медицинской практике: основные нормы и правила» (60 мин в 0,5% растворе хлорамина).

Перчатки необходимо одевать во время каждой процедуры работы с пациентами или с биологическим материалом. При работе с пациентами и при проведении аналитических манипуляций используются одноразовые диагностическо-смотровые нестерильные перчатки. Для обработки и мойки инструментов используют технические перчатки. Использованные перчатки погружаются в дезинфицирующий раствор на 60 минут.

Маска и очки необходимы при возможности разбрызгивания биологического материла.

Маска должна меняться через каждые 4 часа работы. Очки после каждого использования протирают дезинфицирующим раствором, промывают проточной водой, высушивают.

Проведение мероприятий по стерилизации и дезинфекции лабораторной посуды, инструментария, средств защиты

**Дезинфекция** - комплекс мероприятий, направленных на уничтожение возбудителей болезней и создание условий, препятствующих их распространению в окружающей среде. Лабораторный инструментарий (иглы, скарификаторы, капилляры, предметные стекла, пробирки, меланжеры, счетные камеры, кюветы спектрофотометров, пипетки, наконечники, резиновые груши и т.д.), биологический материал, посуда после каждого использования подвергаются тщательной дезинфекции.

**Дезинфекцию изделий медицинского назначения можно осуществлять следующими методами:**

1. Кипячение в дистиллированной воде в течение 30 минут, или в 2% растворе питьевой соды - 15 мин. Данным методом подвергаются дезинфекции изделия из стекла, металла, термостойких полимерных материалов, резины.

2. Паровой метод - обработка водяным насыщенным паром под избыточным давлением 0,5 кгс/см2 (4,9\*104 Па) при температуре 1100С в течение 20 мин. Таким способом можно дезинфицировать изделия из стекла, металла, резины, латекса и термостойких полимеров.

3. Воздушный метод - сухой горячий воздух при температуре 1200С в течение 45 мин. Применяется для дезинфекции изделий из стекла и металла.

4. Химический метод - растворы химических веществ, температура которых не менее 180С. Данным методом подвергаются дезинфекции изделия из стекла, коррозионностойкого металла, полимерных материалов, резины.

**В качестве химических дезинфицирующих средств можно применять следующие растворы:**

- 3% раствор хлорамина - 60 мин;

- 6% раствор перекиси водорода - 60 мин;

- 6% раствор перекиси водорода с 0,5% раствором моющего средства, разрешенного к применению МЗ РБ- 60 мин;

- 4% раствор формалина (по формальдегиду) - 60 мин;

- 2,5% раствор глютарового альдегида - 30 мин;

- 0,5 раствор дезоксона-1 - 60 мин;

- 0,6% раствор нейтрального гипохлорита кальция - 60 мин; - 0,5% раствор сульфохлорантина-Д - 60 мин.

**Дезинфицирующие растворы используются однократно.** Емкости для проведения дезинфекции должны быть четко промаркированы, иметь крышки. Изделия либо полностью погружают в раствор, либо двукратно протирают салфеткой из бязи или марли с интервалом 15 мин.

При загрязнении раствора кровью его обеззараживающие свойства снижаются, поэтому пипетки, пробирки, капилляры, загрязненные кровью, дезинфицируются в двух емкостях. При дезинфекции изделий, имеющих внутренние каналы, растворы дезинфицирующего средства в объеме 5-10 мл пропускают через канал с помощью груши для удаления остатков крови, сыворотки и т.д.

После дезинфекции способом погружения изделия промывают в проточной воде до полного удаления запаха дезинфицирующего средства. По окончании исследования пробы биологического материала вместе с посудой, в которой они доставлялись в лабораторию, обеззараживаются в автоклаве.

Обеззараживание отработанного биологического материала допускается также химическим способом с использованием дезинфицирующих средств в соответствующих концентрациях, разрешенных к применению МЗ РБ. Отходы крови (сгустки, сыворотки и др.) в специальных емкостях (ведрах, кастрюлях с крышками) засыпают сухой хлорной известью, белильной известью, нейтральным гипохлоритом кальция в соотношении препарата и отходов 1:5, перемешивают и оставляют на 60 мин.

В процессе работы использованные наконечники, планшеты погружаются в емкость с 6%-ым раствором перекиси водорода или 70%-ым спиртом на 2 ч, после чего промываются под проточной водой, затем споласкиваются дистиллированной водой и высушиваются, либо после окончания работы подвергаются паровой дезинфекции в автоклаве.

Кюветы измерительной аппаратуры, пластиковые пробирки и т.д. обеззараживаются 6%-ым раствором перекиси водорода, и промываются проточной водой.

Спектрофотометры и другая аппаратура, содержащая оптику, протирается тампоном, смоченном в 70%-ом спирте, с экспозицией 15 мин. Затем обрабатывается 96%-ым спиртом для удаления влаги.

Рабочие поверхности столов, центрифуг, термостатов, дозаторов, лотков в конце каждого рабочего дня протирают ветошью, смоченной в дезинфицирующем растворе, а в случае загрязнения кровью их немедленно следует обработать дважды с интервалом 15 мин дезинфицирующим средством (перекись водорода – 6,0%). Использованную ветошь сбрасывают в емкость с дезинфицирующим раствором, которую маркируют: «Для использованной ветоши». При загрязнении кровью или секретами мебели, инвентаря, приборов их следует немедленно дважды протереть ветошью, ватными или марлевыми тампонами, обильно смоченными дезинфицирующими растворами.

Перчатки после окончания работы, обеззараживают погружением в 3%ый раствор хлорамина или 6%-ый раствор перекиси водорода на 1 ч, или кипячением в течение 30 мин. Влажная уборка помещений производится горячим (500-600С) мыльным раствором ежедневно. Генеральная уборка помещений проводится один раз в неделю с обязательной дезинфекцией.

**Предстерилизационная очистка лабораторного инструментария**

После дезинфекции лабораторный инструментарий, соприкасающийся с раневой поверхностью или слизистыми оболочками обследуемого, подлежит обязательной предстерилизационной очистке (ручным или механическим способом) и стерилизации.

Предстерилизационная очистка предусматривает удаление белковых, жировых, механических загрязнений и остаточных количеств лекарственных препаратов. Она осуществляется ручным или механическим способом с применением моющих средств. В качестве моющих средств применяют «Биолот» (5 г на 1 л воды), а также растворы, содержащие 0,5% перекись водорода с синтетическими моющими средствами, разрешенными к применению.

**Последовательность ручной предстерилизационной очистки:**

1. Замачивание в моющем растворе при полном погружении изделия.

2. Мойка каждого изделия в моющем растворе при помощи ерша или ватно-марлевого тампона в течение 0,5±0,1 мин.

3. Споласкивание под проточной водой. При применении моющего средства «Биолот» в течение 3,0±1,0 мин.; других моющих средств – 10, ±1,0 мин.

4. Споласкивание дистиллированной водой в течение 0,5±0,1 мин.

5. Сушка горячим воздухом при температуре 85℃ до полного

исчезновения влаги.

**Механическую очистку осуществляют с помощью** специального оборудования струйным, ротационным методами, ершеванием или с применением ультразвука. Моющие средства те же. Качество предстерилизационной очистки изделий оценивают на наличие крови и путем постановки азопирамовой пробы остаточных количеств щелочных компонентов моющего вещества. Самоконтроль в КДЛ проводиться ежедневно, контролю подвергают не менее 1% от одновременно обрабатываемых изделий одного наименования, но не менее 3-5 единиц. При положительной пробе на кровь или моющее средство всю группу контролируемых изделий подвергают повторной обработке до получения отрицательных результатов. Контроль качества предстерилизационной очистки работники санитарно-эпидемиологической службы проводят 1 раз в квартал.

**Утилизация обработанного материала**

В соответствии с п. 37 приказа МЗ РФ от 6 июня 2013 г. № 354н "О порядке проведения патолого-анатомических вскрытий" медицинские отходы, образовавшиеся в результате проведения патолого-анатомического вскрытия, включая гистологические препараты и биологические материалы, утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10. Согласно классификации медицинских отходов (п. 2.1 СанПиН 2.1.7.2790-10), паталого-анатомические отходы относятся к отходам класса Б. Патологоанатомические отходы класса Б (в том числе гистологические препараты), согласно п 4.18 СанПиН 2.1.7.2790-10, подлежат кремации (сжиганию) или захоронению на кладбищах в специальных могилах на специально отведенном участке кладбища в соответствии с требованиями законодательства РФ.

**Отходы класса А,** кроме пищевых, могут удаляться из структурных подразделений с помощью мусоропровода или пневмотранспорта. Не допускается сброс в мусоропровод предметов, которые могут привести к механическому перекрытию (засору) ствола мусоропровода. Сброс отходов в

мусоропровод должен осуществляться в упакованном виде. Конструкция, материалы и устройство мусоропроводов и пневмотранспорта должны обеспечивать возможность проведения их чистки, мойки, дезинфекции и механизированного удаления отходов из мусоросборных камер. Мусоросборные камеры оборудуются контейнерами, подводкой воды и канализационным трапом. Запрещается сброс отходов из мусоропровода (пневмотранспорта) непосредственно на пол мусороприемной камеры. Должен быть обеспечен запас контейнеров для мусороприемной камеры не менее чем на одни сутки. Контейнеры моются после каждого опорожнения, дезинфицируются не реже одного раза в неделю. Чистка стволов трубопроводов, приемных устройств, мусоросборных камер проводится еженедельно.

**Профилактическая дезинфекция, дезинсекция проводятся не реже одного раза в месяц, дератизация - по мере необходимости.**

Крупногабаритные отходы класса А собираются в специальные бункеры для крупногабаритных отходов. Поверхности и агрегаты крупногабаритных отходов, имевшие контакт с инфицированным материалом или больными, подвергаются обязательной дезинфекции перед их помещением в накопительный бункер.

**Отходы класса Б** подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию.

Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, и выполняется при разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

**Отходы класса Б собираются в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокалываемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета или имеющие желтую маркировку.** Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов. Для сбора острых отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокалываемые влагостойкие емкости (контейнеры). Емкость

должна иметь плотно прилегающую крышку, исключающую возможность самопроизвольного вскрытия. Для сбора органических, жидких отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокалываемые влагостойкие емкости с крышками (контейнеры), обеспечивающими их герметизацию и исключающими возможность самопроизвольного вскрытия. В случае применения аппаратных методов обеззараживания в организации, осуществляющей медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, на рабочих местах допускается сбор отходов класса Б в общие емкости (контейнеры, пакеты), использованных шприцев в неразобранном виде с предварительным отделением игл (для отделения игл необходимо использовать иглосъемники, иглодеструкторы, иглоотсекатели), перчаток, перевязочного материала и так далее.

Мягкая упаковка (одноразовые пакеты) для сбора отходов класса Б должна быть закреплена на специальных стойках-тележках или контейнерах.

После заполнения пакета не более чем на 3/4 сотрудник, ответственный за сбор отходов в данном медицинском подразделении, завязывает пакет или закрывает его с использованием бирок-стяжек или других приспособлений, исключающих высыпание отходов класса Б. Твердые (непрокалываемые) емкости закрываются крышками. Перемещение отходов класса Б за пределами подразделения в открытых емкостях не допускается.

При окончательной упаковке отходов класса Б для удаления их из подразделения (организации) одноразовые емкости (пакеты, баки) с отходами класса Б **маркируются надписью, "Отходы. Класс Б**" с нанесением названия организации, подразделения, даты и фамилии ответственного за сбор отходов лица.

**Дезинфекция многоразовых емкостей для сбора отходов класса Б внутри организации производится ежедневно.**

Медицинские отходы класса Б из подразделений в закрытых одноразовых емкостях (пакетах) помещают в контейнеры и затем в них перемещают на участок по обращению с отходами или помещение для временного хранения медицинских отходов до последующего вывоза транспортом специализированных организаций к месту обеззараживания/обезвреживания. Доступ посторонних лиц в помещения временного хранения медицинских отходов запрещается. Контейнеры должны быть изготовлены из материалов, устойчивых к механическому воздействию, воздействию высоких и низких температур, моющих и дезинфицирующих средств, закрываться крышками, конструкция которых не должна допускать их самопроизвольного открывания.

При организации участков обеззараживания/обезвреживания медицинских отходов с использованием аппаратных методов разрешаются сбор, временное хранение, транспортирование медицинских отходов класса без предварительного обеззараживания в местах образования при условии обеспечения необходимых требований эпидемиологической безопасности.

При этом организация, осуществляющая медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, должна быть обеспечена всеми необходимыми расходными средствами, в том числе одноразовой упаковочной тарой.

**Патолога-анатомические и органические операционные отходы класса Б** (органы, ткани и так далее) подлежат кремации (сжиганию) или захоронению на кладбищах в специальных могилах на специально отведенном участке кладбища в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации. Обеззараживание таких отходов не требуется.

Допускается перемещение необеззараженных медицинских отходов класса Б, упакованных в специальные одноразовые емкости (контейнеры), из

удаленных структурных подразделений (здравпункты, кабинеты, фельдшерско-акушерские пункты) и других мест оказания медицинской помощи в медицинскую организацию для обеспечения их последующего обеззараживания/обезвреживания.

**Работа по обращению с медицинскими отходами класса В**, организуется в соответствии с требованиями к работе с возбудителями 1-2 групп патогенности, к санитарной охране территории и профилактике туберкулеза.

**Отходы класса В,** подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) физическими методами (термические, микроволновые, радиационные и другие). Применение химических методов дезинфекции допускается только для обеззараживания пищевых отходов и выделений больных, а также при организации первичных противоэпидемических мероприятий в очагах. Выбор метода обеззараживания (дезинфекции) осуществляется при разработке схемы сбора и удаления отходов. Вывоз необеззараженных отходов класса В за пределы территории организации не допускается.

Отходы класса В, собирают в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокалываемую) упаковку (контейнеры) красного цвета или имеющую красную маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов. Жидкие биологические отходы, использованные одноразовые колющие (режущие) инструменты и другие изделия медицинского назначения помещают в твердую (непрокалываемую) влагостойкую герметичную упаковку (контейнеры). Мягкая упаковка (одноразовые пакеты) для сбора отходов класса В должна быть закреплена на специальных стойках (тележках) или контейнерах. После заполнения пакета не более чем на 3/4 сотрудник, ответственный за сбор отходов в данном медицинском подразделении, с соблюдением требований биологической безопасности завязывает пакет или закрывает с использованием бирок-стяжек или других приспособлений,

исключающих высыпание отходов класса В. Твердые (непрокалываемые) емкости закрываются крышками. Перемещение отходов класса В за пределами подразделения в открытых емкостях не допускается.

 При окончательной упаковке отходов класса В, для удаления их из подразделения одноразовые емкости (пакеты, баки) с отходами класса В, маркируются, **надписью, "Отходы. Класс В"** с нанесением названия организации, подразделения, даты и фамилии ответственного за сбор отходов лица.

Медицинские отходы класса В, в закрытых одноразовых емкостях помещают в специальные контейнеры и хранят в помещении для временного хранения медицинских отходов.

Использованные ртутьсодержащие приборы, лампы (люминесцентные и другие), оборудование, относящиеся к медицинским отходам класса Г, собираются в маркированные емкости с плотно прилегающими крышками любого цвета (кроме желтого и красного), которые хранятся в специально выделенных помещениях.

Сбор, временное хранение отходов цитостатиков и генотоксических препаратов и всех видов отходов, образующихся в результате приготовления их растворов (флаконы, ампулы и другие), относящихся к медицинским **Отходам класса Г,** без дезактивации запрещаются. Отходы подлежат немедленной дезактивации на месте образования с применением специальных средств. Также необходимо провести дезактивацию рабочего места. Работы с такими отходами должны производиться с применением специальных средств индивидуальной защиты и осуществляться в вытяжном шкафу. Лекарственные, диагностические, дезинфицирующие средства, не подлежащие использованию, собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого и красного).