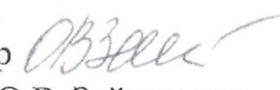


**ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ  
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ**

**СОГЛАСОВАНО**

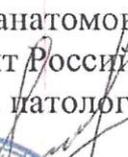
Главный внештатный  
специалист патологоанатом  
Департамента здравоохранения  
города. Москвы,  
д.м.н., профессор

  
\_\_\_\_\_ О.В. Зайратьянц

«16» октября 2024 г.

**РЕКОМЕНДОВАНО**

Российским обществом  
патологоанатомов  
Президент Российского  
общества патологоанатомов,  
д.м.н.

  
\_\_\_\_\_ Ф.Г. Забозлаев



«05» ноября 2024 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
ПО ОБРАБОТКЕ ТКАНЕВЫХ ПРОБ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ  
ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СВЕТОВОЙ  
МИКРОСКОПИИ**

Методические рекомендации № 61

Москва 2024

УДК 314.4  
ББК 53.4  
П41

**Организация-разработчик:** Государственное бюджетное учреждение города Москвы «Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы», организационно-методический отдел по патологической анатомии.

**Составители:**

**Зайратьянц О.В.** (ред.), главный внештатный специалист патологоанатом Департамента здравоохранения города Москвы, главный внештатный специалист-эксперт патологоанатом Росздравнадзора по ЦФО, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, Заслуженный врач РФ, д.м.н. профессор, вице-президент Российского и председатель Московского обществ патологоанатомов;

**Каниболоцкий А.А.**, заведующий организационно-методическим отделом по патологической анатомии ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», заведующий патологоанатомическим отделением ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В.Склифосовского ДЗМ», к.м.н., доцент по кафедре судебной медицины и медицинского права, член Президиума Российского общества патологоанатомов

**Рецензенты:**

**Кактурский Лев Владимирович** — научный руководитель ФГБНУ «НИИ морфологии человека имени А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», главный специалист-эксперт по патологической анатомии Росздравнадзора, почетный член Российского общества патологоанатомов, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор.

**Забозлаев Федор Георгиевич** — профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и патологической анатомии Академии постдипломного образования ФНКЦ ФМБА России, главный внештатный специалист по патологической анатомии ФМБА России, заведующий патологоанатомическим отделением ФНКЦ ФМБА России, президент Российского общества патологоанатомов, Заслуженный врач РФ, д.м.н.

Методические рекомендации по обработке тканевых проб при изготовлении гистологических микропрепаратов для световой микроскопии: методические рекомендации / составители: О.В. Зайратьянц, А.А. Каниболоцкий – М.: ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ», 2024. – 11 с.

Принято решение Экспертным советом по науке Департамента здравоохранения города Москвы и Российским обществом патологоанатомов (Протокол № 14/1 от 05.11.2024 г.) рекомендовать методические рекомендации к печати и последующему внедрению в практику московского здравоохранения.

**Предназначение.** Данные методические рекомендации предназначены для лаборантов, врачей-патологоанатомов и судебно-медицинских экспертов - гистологов, хирургов, врачей других специальностей, главных специалистов органов здравоохранения, руководителей медицинских организаций

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	<i>Стр.</i>
<b>ЭТАП 1. ЗАБОР И ТРАНСПОРТИРОВКА БИОПСИЙНОГО И ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА</b>	4
<b>ЭТАП 2. ВЫРЕЗКА И ФИКСАЦИЯ МАТЕРИАЛА</b>	5
<b>ЭТАП 3. ПРОВОДКА МАТЕРИАЛА</b>	5
<b>ЭТАП 4. ЗАЛИВКА МАТЕРИАЛА</b>	8
<b>ЭТАП 5. МИКРОТОМИЯ, РАСПРАВЛЕНИЕ И ВЫСУШИВАНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ</b>	9
<b>ЭТАП 6. ОКРАСКА ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ</b>	10
<b>ЭТАП 7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ</b>	11
<b>Литература</b>	12

## ЭТАП 1. ЗАБОР И ТРАНСПОРТИРОВКА БИОПСИЙНОГО И ОПЕРАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА

Для забора и дальнейшей транспортировки биопсийного и операционного материала до лаборатории должны использоваться специализированные пластиковые контейнеры, содержащие фиксирующий раствор, с герметично закрывающейся крышкой и унифицированной этикеткой для маркировки.

Этикетка должна содержать:

1. наименование фиксирующей жидкости,
2. поле для записи,
3. наименование производителя, каталожный номер и срок годности.
4. специальный штрих-код (или QR-код), если используются цифровые технологии

В соответствии с нормативно-правовыми документами<sup>1</sup>, в заборе, маркировке и транспортировке материала сотрудники лаборатории не участвуют, но, при необходимости, консультируют соответствующих специалистов. **Ответственность за этот этап пробоподготовки несут средний медицинский персонал и врачи тех клинических отделений, где был взят материал.**

Тканевой материал должен быть помещен в контейнер с фиксирующим раствором немедленно после взятия. В качестве фиксирующего раствора необходимо использовать 10% забуференный нейтральный формалин (рН 6,8-7,4)<sup>2</sup>. **Запрещается использовать для фиксации материала самостоятельно разбавленный и незабуференный раствор формальдегида, а также иные жидкости (спирт и др.), если это не требуется для специальных методов исследования и не согласовано заранее с лабораторией.** Фиксирующий раствор должен быть свежим, ранее не использованным.

При выборе объема контейнера и фиксирующей жидкости необходимо ориентироваться на соотношение объема фиксирующего раствора к объему материала, оно должно быть не менее, чем 20:1.

---

<sup>1</sup> *Стандартные технологические процедуры при проведении патолого-анатомических исследований. Клинические рекомендации. Мальков П.Г., Франк Г.А., Пальцев М.А.*

<sup>2</sup> *Приказ Министерства здравоохранения РФ от 24 марта 2016 г. N 179н "О Правилах проведения патолого-анатомических исследований".*

Контейнер должен содержать необходимый объем фиксирующего раствора и иметь небольшой запас в объеме для предотвращения разлива фиксирующей жидкости за края емкости.

Для стандартизации процедуры забора и первичной фиксации материала рекомендуется приобретение готовых к употреблению транспортных контейнеров с фиксирующей жидкостью.

Для маркировки контейнеров рекомендуется использовать грифельные карандаши или специальные лабораторные маркеры, несмывающиеся в растворителях.

В процессе забора материала оформляется сопровождающая документация (направление) согласно приказу № 179н<sup>1</sup> или приказу № 354н<sup>2</sup> в зависимости от характера материала, а также заполняются соответствующие журналы учета (в печатной и/или электронной форме).

При транспортировке материала следует учитывать требования к температурному режиму и временным параметрам (не допускается замораживание или перегрев, воздействие прямых солнечных лучей, нарушение рекомендованных сроков транспортировки и др.).

## **ЭТАП 2. ВЫРЕЗКА И ФИКСАЦИЯ МАТЕРИАЛА**

Из крупного фрагмента материала, доставленного и принятого по действующим правилам<sup>1</sup> в лабораторию (при нарушении правил этапа 1 в лаборатории оформляется соответствующий протокол и принимаются меры по недопущению дальнейших нарушений), врачу данной лаборатории необходимо вырезать кусочки рекомендованных параметров: толщина 3-4 мм, размер 2x2 см (размер ориентирован на свободное помещение образца в стандартную гистологическую кассету). Для вырезки рекомендуется использовать острое лезвие во избежание сдавления и разрывов тканей. После вырезки материал должен быть помещен в гистологическую кассету (1 кусочек = 1 кассета), которую необходимо промаркировать грифельным карандашом или специальным лабораторным маркером, несмывающимся в растворителях (штрих- или QR-кодами при использовании цифровых технологий). Маркировка может производиться с помощью специальных принтеров.

---

<sup>1</sup> Приказ Министерства здравоохранения РФ от 24 марта 2016 г. N 179н "О Правилах проведения патолого-анатомических исследований".

<sup>2</sup> Приказ Министерства здравоохранения РФ от 6 июня 2013 г. N 354н "О порядке проведения патолого-анатомических вскрытий".

Для мелкого биопсийного материала (например, гастро- или колонобиопсии и т.д.) рекомендуется дополнительно использовать биопсийные прокладки, или мешочки, или специальные биопсийные кассеты с более мелкими отверстиями во избежание потери

материала. Материал в кассете должен быть помещен в свежий, ранее не использованный 10% забуференный нейтральный формалин (рН 6,8-7,4). Соотношение материал : фиксатор должно быть не менее, чем 1:20 или 15-30 мл формалина на 1 кассету. Рекомендованное время фиксации не менее 24 часов и не более 48 часов при комнатной температуре согласно клиническим рекомендациям<sup>1</sup>. **После оформления приема материала в лабораторию за последующие этапы пробоподготовки несет ответственность ее персонал.**

### ЭТАП 3. ПРОВОДКА МАТЕРИАЛА

Фиксированный образец ткани необходимо обезводить и пропитать парафином для микротомии - дальнейшего изготовления тонких гистологических срезов (проводка материала). На этапе проводки материал поэтапно помещается в спирты (этиловый/изопропиловый), промежуточную среду (ксилол, если необходимо) и парафины согласно оптимально подобранному протоколу. Протокол рекомендуется подбирать исходя из типа ткани и размера образца. Для проводки с этиловым спиртом в качестве промежуточной среды необходимо использовать ксилол. Для проводки с изопропиловым спиртом использование ксилола не обязательно. Также в протоколе проводки может использоваться формалин при необходимости отложенного запуска в приборе. При формировании оптимального протокола проводки необходимо учитывать время выдержки в каждом реагенте и температуру нагрева реагентов. Рекомендуется обращать внимание на качество и свежесть реагентов перед проводкой, не использовать загрязненные или некачественные растворы. Температуру нагрева реагентов для проводки следует выбирать исходя из инструкции. Рекомендуется для спиртов и ксилола устанавливать температуру не выше 37°C, для парафина на 3-4°C выше температуры плавления, указанной на упаковке, обычно не выше 56-58°C.

---

<sup>1</sup> *Стандартные технологические процедуры при проведении патолого-анатомических исследований. Клинические рекомендации. Мальков П.Г., Франк Г.А., Пальцев М.А.*

Ниже представлены примеры протоколов для проводки в вакуумном процессоре:

	Для операционного материала	Для биопсийного материала
--	-----------------------------	---------------------------

Шаг	(расширенный ночной протокол)		(сокращенный дневной протокол)	
	Реактив	Время	Реактив	Время
1	Формалин	1 ч	Формалин	5 мин
2	Вода	15 мин	Вода	5 мин
3	Изопреп	40 мин	Изопреп	5 мин
4	Изопреп	40 мин	Изопреп	10 мин
5	Изопреп	50 мин	Изопреп	10 мин
6	Изопреп	50 мин	Изопреп	10 мин
7	Изопреп	1 ч	Изопреп	10 мин
8	Изопреп	1 ч	Изопреп	10 мин
9	Изопреп	1 ч 10 мин	Изопреп	15 мин
10	Изопреп	1 ч 10 мин	Изопреп	15 мин
11	Парафин	1 ч	Парафин	10 мин
12	Парафин	1 ч 15 мин	Парафин	10 мин
13	Парафин	1 ч 15 мин	Парафин	10 мин
14	Парафин	1 ч 30 мин	Парафин	15 мин

#### **ЭТАП 4. ЗАЛИВКА МАТЕРИАЛА**

Материал после проводки необходимо залить в парафин для дальнейшей микротомии и формирования парафиновых блоков, пригодных для многолетнего хранения материала. Для формирования парафинового блока рекомендуется использовать пластиковые или металлические заливочные формы, которые подбираются в соответствии с размером тканевого образца. Не рекомендуется использовать формы меньшего размера, чем образец, во избежание механических повреждений ткани. В качестве основания блока можно использовать основание кассеты, в которой происходила проводка материала, или специальные заливочные кассеты или кольца. Основание блока обязательно должно быть промаркировано.

Тканевой образец необходимо извлечь из кассеты и поместить на дно углубления заливочной формы, куда предварительно налить расплавленный парафин. Фиксация материала за счёт охлаждения непосредственно об металлическое дно формы без парафина недопустима. Особые требования к пространственной ориентации ткани предъявляются при работе с фрагментами стенок полых органов, сосудов, кожи, стенок полостных образований. В данном случае необходимо получить срез, содержащий все

слои стенки, поэтому кусочки в парафиновом блоке должны быть перпендикулярны поверхности будущего среза. После укладки кусочка в правильной ориентации накрыть сверху основанием гистологической кассеты или заливочной кассетой/кольцом, долить парафин до краев формы и перенести блоки на охлаждающую поверхность для застывания. После полного застывания готовые блоки извлечь из заливочных форм. Также необходимо регулярно проверять температуру нагрева частей станции заливки и инструментов во избежание термических повреждений образцов. Она не должна превышать температуры плавления парафина более чем на 3-4 °С (в среднем 60-64 °С).

## **ЭТАП 5. МИКРОТОМИЯ, РАСПРАВЛЕНИЕ И ВЫСУШИВАНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ**

После заливки из парафинового блока необходимо изготовить тонкие гистологические срезы толщиной 3-5 мкм<sup>1</sup>. Это стандартная рекомендованная толщина рабочих срезов при микротомии (исключение составляют специальные методики исследования, где необходима другая толщина). Для изготовления срезов рекомендуется использовать острые одноразовые микротомные лезвия высокого качества. Оптимальный угол наклона лезвия необходимо настраивать в пределах от 1 до 10° в зависимости от микротома, типа лезвия и плотности блока. Перед микротомией блоки необходимо охладить при температуре не ниже - 10°С, затем поместить в держатель блока в микротоме. Рекомендуется для охлаждения блоков использовать специальные охлаждающие столики с регулировкой температуры. В качестве подготовки к изготовлению срезов с поверхности блока нужно удалить лишний парафин и выровнять площадку для резки (произвести тримминг). После - изготовить срезы и перенести их на водяную баню для расправления. Необходимо контролировать температуру воды в водяной бане. Она должна быть на 4-5°С ниже температуры плавления парафина. Парафин не должен плавиться на поверхности водяной бани. Гистологические срезы должны находиться в водяной бане только то время, которое необходимо для их полного расправления (не дольше 5 минут). После расправления срезы необходимо перенести на предметное стекло и высушить в вертикальном положении.

---

<sup>1</sup> *Стандартные технологические процедуры при проведении патолого-анатомических исследований. Клинические рекомендации. Мальков П.Г., Франк Г.А., Пальцев М.А.*

## ЭТАП 6. ОКРАСКА ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

### ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ

Обзорная окраска гематоксилином и эозином условно делится на несколько этапов: депарафинизация, регидратация, окраска, промывка, обезвоживание, просветление. После качественного просушивания срезы необходимо депарафинировать в ксилоле (или его заменителях) и регидратировать в спиртах (изопропанол или этанол) до дистиллированной воды. Важно обращать внимание на качество депарафинизации и при необходимости корректировать время выдержки в ксилоле. Температура ксилола при депарафинизации должна быть не менее 20°C. Затем препараты нужно окрасить гематоксилином и эозином, промывая срезы в проточной воде после каждого красителя. Дополнительно можно использовать специальные подсинивающие растворы для гематоксилина. Длительность окраски на данном этапе зависит от типа гематоксилина (Майера, Карацци, Джилла, Гарриса, Эрлиха) и его качества и может варьировать от 3 до 25 минут. Время окраски эозином зависит от требуемой насыщенности и может составлять от 5 до 60 секунд в случае использования спиртового раствора и от одной до нескольких минут при работе с водным раствором. После окраски срезы необходимо обезвоживать в спиртах (изопропанол или этанол) и просветлить в ксилоле (или его заменителях). При формировании оптимального протокола окраски необходимо учитывать время выдержки в каждом реагенте, а так же температуру реагентов. Рекомендуется обращать внимание на качество и свежесть реагентов перед окраской, не использовать загрязненные или некачественные растворы.

Ниже представлен ориентировочный протокол окраски гематоксилином и эозином:

Шаг	Реагент	Время
1-3	Ксилол	3 смены по 3 мин
4-6	Спирт	3 смены по 2 мин
7	Дистиллированная вода	2 мин
8	Гематоксилин	3-25 мин (в зависимости от вида)
9	Проточная вода	1-5 мин
10	Эозин	5 сек - 5 мин ( в зависимости от вида)
11	Дистиллированная вода	1 мин
12-14	Спирт	3 смены по 3 мин
15-17	Ксилол	3 смены по 1 мин

## **ЭТАП 7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

После окраски и просветления в ксилоле еще влажный срез необходимо заключить под покровное стекло или пленку. При заключении под покровное стекло дополнительно необходимо использовать монтирующую среду. При заключении под пленку использование монтирующей среды не требуется, в этом случае дополнительно используют ксилол для смачивания пленки. Заключение под стекло можно проводить как автоматизировано, так и вручную, заключение под пленку только автоматизировано с помощью специальных приборов. Рекомендуется для заключения использовать высококачественные расходные материалы. Требования, предъявляемые к средствам для заключения: полная прозрачность, нейтральность по отношению к покрываемым тканям, отсутствие склонности к образованию пузырей, отсутствие собственных оптических эффектов (светопреломления, флюоресценции и пр.), способность длительно сохранять препарат в условиях архивного хранения, не меняя своих свойств.

## Литература

- <sup>1</sup> Стандартные технологические процедуры при проведении патолого-анатомических исследований. Клинические рекомендации. Мальков П.Г., Франк Г.А., Пальцев М.А. Издательский дом "ПРАКТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА", 2017 г. - 137 стр.
- <sup>2</sup> Приказ Министерства здравоохранения РФ от 24 марта 2016 г. N 179н "О Правилах проведения патолого-анатомических исследований".
- <sup>3</sup> Приказ Министерства здравоохранения РФ от 6 июня 2013 г. N 354н "О порядке проведения патолого-анатомических вскрытий".