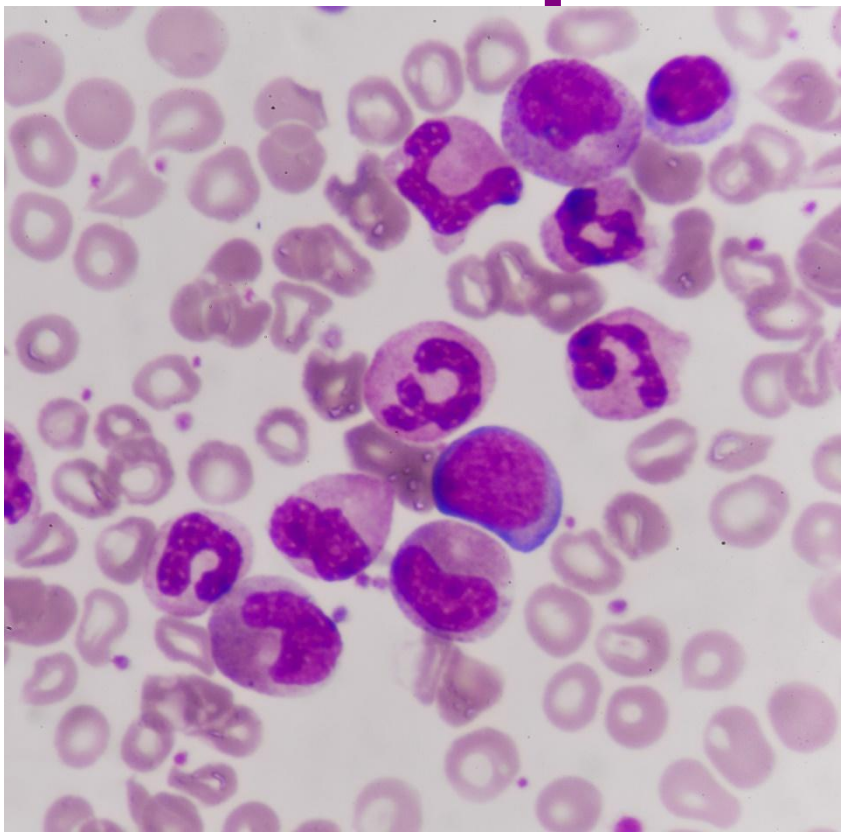
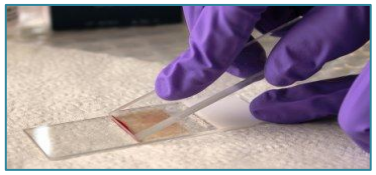
Методы окраски мазков крови

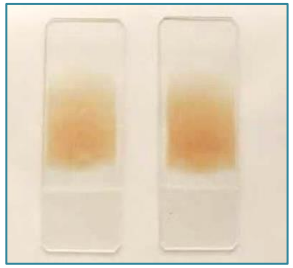


Этапы

1. Приготовление мазка



2. Высушивание (и маркировка)



3. Фиксация

4. Окрашивание

Начало

Чеслав Иванович **Хенцинский** (1851-1916) – российский патологоанатом, эпидемиолог

- Метиленовый синий + эозин
- Двухцветная окраска

Дмитрий Леонидович **Романовский** (1861-1921) – российский военный врач, гематолог, инфекционист

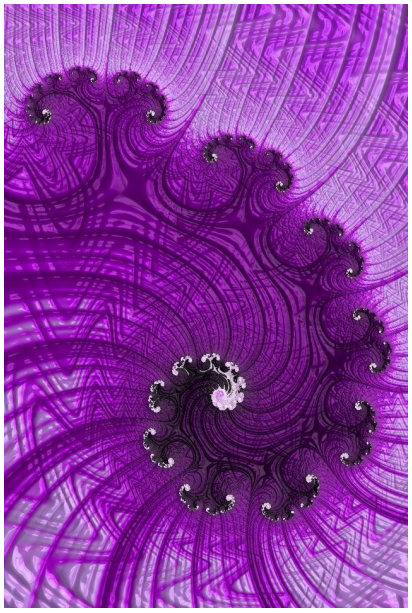
- Метиленовый синий + эозин **+ Азур В**
- **Полихромная** окраска

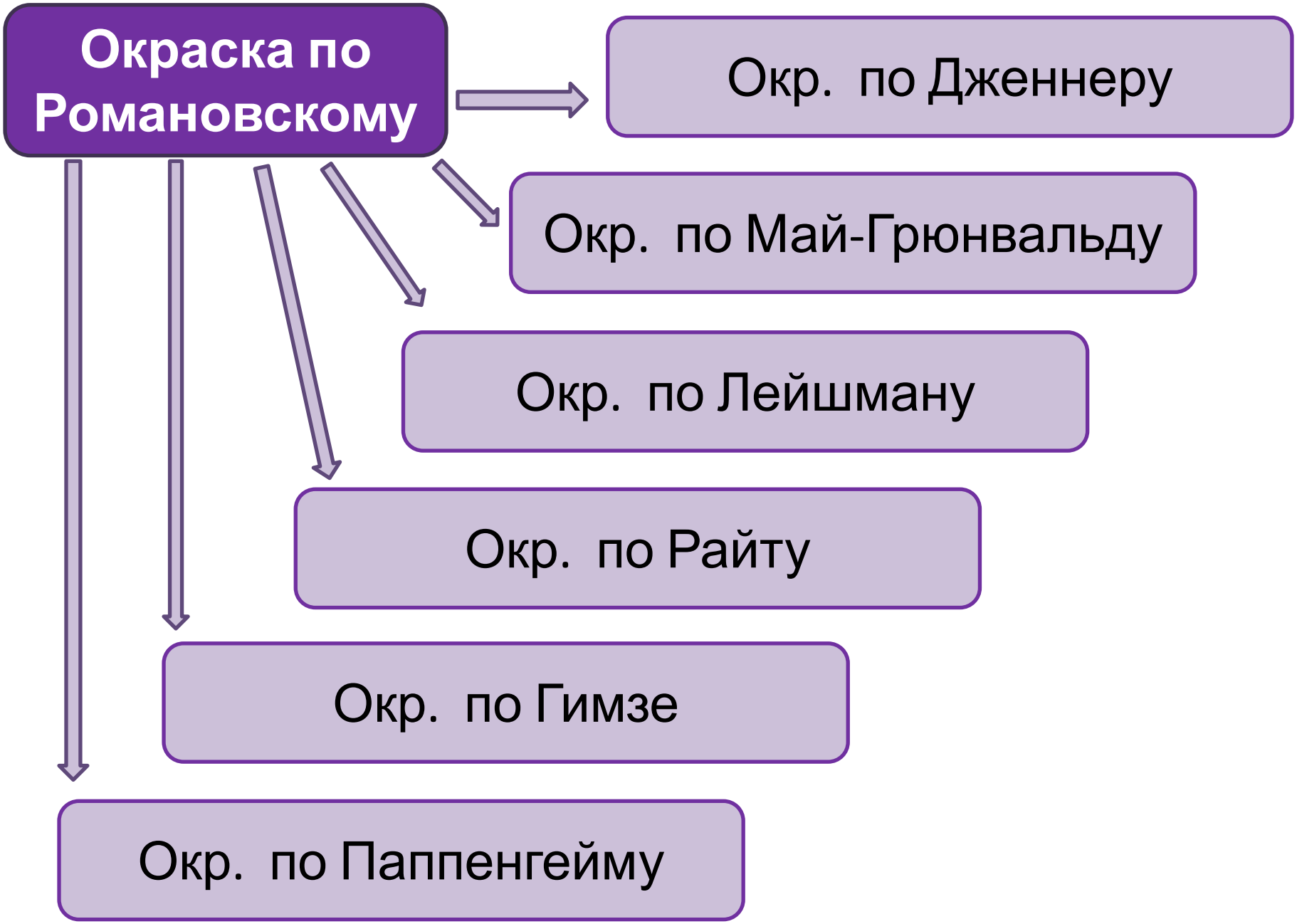
Дмитрий Леонидович Романовский

- Русский ученый-маляриолог, терапевт, гематолог
- В 1891 году предложил состав нового красителя - **Азур**

«Эффект окрашивания Романовского заключается в том, что синий катионный краситель азур В и красно-оранжевый анионный краситель эозин Y при взаимодействии с биологическими субстратами дают больше цветов чем только синий и красно-оранжевый. Пурпурно-фиолетовый (Purple) – самый важный цвет, который характеризует эффект Романовского.»

ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). British Journal of Haematology, 1984, 57, 707-710




Окраска по Романовскому
Окр. по Дженнеру
Окр. по Май-Грюнвальду
Окр. по Лейшману
Окр. по Райту
Окр. по Гимзе
Окр. по Паппенгейму

Модификации методики

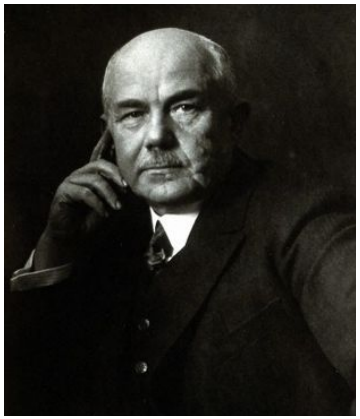
Вильям Буг Лейшман (1865-1926) – шотланд. патолог

1901 – Лейшман
1902 - Райт

Фиксация **в метаноле**

?

Дж.Райт (1871-1928) – америк. патолог



Густав Гимза (1867-1948) – немецкий химик и бактериолог

1904 – Гимза

Стандартизация растворов красителя, добавление **глицерина**

Модификации красителя

Изначально краска Романовского готовилась на ВОДЕ (краска Романовского-Райта)

Гимза (1904) – добавление ГЛИЦЕРИНА

Лейшман и Май-Грюнвальд (1901) – добавление МЕТАНОЛА в краску

В настоящее время **готовый краситель азур-эозин по Романовскому** готовится на **метиловом спирте с добавлением глицерина**

Метиленовый синий (метиленовый голубой)

↓

Азур I (синонимы: Азур А, Азур метиленовый, диметилтионина хлорид)

↓

Азур II (синонимы: Азур В, триметилтионин)

Азур II = азур I (1 ч.) + метиленовый синий (1 ч.)

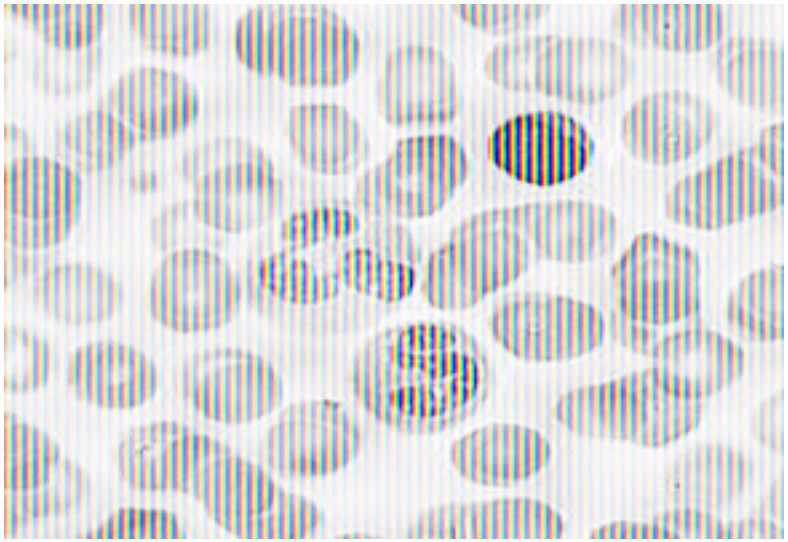
Азур II-эозин — смесь азур-эозина и эозин-метиленового синего.

«Красители в биологии и медицине» (Е. Селиванов)

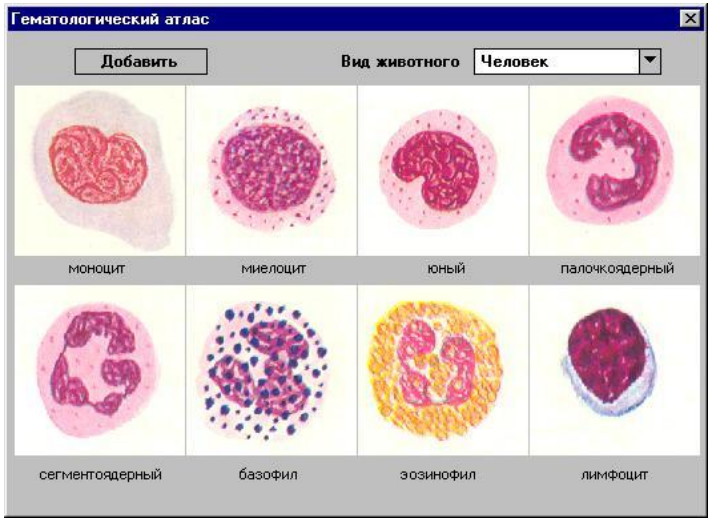
Азур-эозиновый краситель - **Краска Романовского**

- Краска Романовского сочетает в своем составе **эозинат** (химически восстановленный **эозин**) с **азуром Б (II)** (продукт окисления метиленового синего)

- Окрашивает **ацидофильные** образования в различные оттенки красного цвета, **базофильные** — в



Краска Романовского



Ацидофильные («любящие кислоту») компоненты клетки имеют ЩЕЛОЧНУЮ реакцию, поэтому воспринимают кислый краситель **эозин**.

Базофильные («любящие основания») участки обладают КИСЛОЙ pH, поэтому взаимодействуют с щелочным красителем **метиленовый синий (азур)**)

Наиболее распространенные красители для гематологических исследований:

- Краска Романовского-Гимза

- Краска-фиксатор Май-Грюнвальд (или Лейшмана)

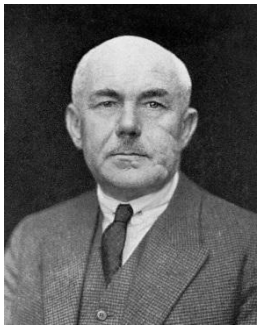
Качество окраски клеточных элементов зависит от:

- его концентрации;
- продолжительности окраски;
- возраста окрашиваемого препарата (препараты от 6 ч до неск. дней давности теряют мелкие структурные особенности);
- pH среды (6.8 – 7.2)

Современные модификации окраски мазков крови

Окраска по Романовскому (Романовскому-Гимзе)

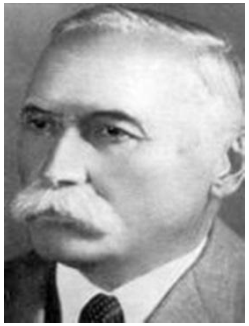
Д.Л. Романовский



Г. Гимза

Окраска по Паппенгейму (Паппенгейму-Крюкову)

А.Паппенгейм (1870-1916) – немецкий терапевт



Александр Николаевич Крюков (1878-1952) – совет. гематолог

Окраска по Нохту

Бернард Нохт (1857-1945) – нем. врач, спец. по тропич. медицине, создатель Института тропич. медицины

ОКРАСКА ПО РОМАНОВСКОМУ(-ГИМЗЕ)

- Сухие мазки **фиксируют в метиловом спирте** (3-5 мин) или в этиловом (30-40 мин);
- Погружают в рабочий раствор **готовой краски Романовского-Гимза*** на 15-30 мин;
- Промывают дистиллированной водой, высушивают, исследуют при иммерсии.

* Для приготовления РАБОЧЕГО раствора краску Романовского разводят в фосфатном буфере (обычно на 1 мл буфера 1-2-3 капли краски)

ОКРАСКА МАЗКОВ ПО ПАППЕНГЕЙМУ(-КРЮКОВУ)

- На высушенный мазок наливают краску-**фиксатор Май-Грюнвальда*** (или Лейшмана) на 2-3 мин.;
- Не сливая краски добавляют тоже количество дистил. воды;
- Через 1 мин краску сливают и сразу добавляют рабочий раствор **готовой краски Романовского**-Гимза на 8-15 мин. (или рабочий раствор краски по Нохту);
- Промывают дист. водой и высушивают.

* Состав: краска-фиксатор: 0,25-0,30 %-ный метанольный раствор смеси красителей метиленового синего, азура I и эозина

- В состав раствора по Май-Грюнвальду входит метанольный раствор 0,25% концентрации. Раствор представляет собой смесь красителей метиленового синего, эозина и азура I

- В состав раствора типа Лейшмана входит метанольный раствор 0,15% концентрации. Раствор представляет собой смесь красителей метиленового синего, эозина и азура I

НАПРИМЕР:

- Краситель Азур-Эозин по Романовскому (МиниМед-Р) представляет собой 0,76 % раствор сухого красителя азур-эозин по Романовскому в смеси метанол-глицерин (1:1).

- Краситель-фиксатор эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду (МиниМед-М-Г) представляет собой 0,25% раствор сухого красителя эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду в метаноле.

- Краситель-фиксатор Эозин метиленовый синий типа Лейшмана (МиниМед-Л) представляет собой 0,20% раствор сухого красителя эозин метиленовый синий типа Лейшмана в метаноле.

ОКРАСКА ПО НОХТУ

- Сухие мазки фиксируют в **метиловом спирте (5 мин)** или в этиловом (30-40 мин);
- Погружают в рабочий раствор **краски по Нохту*** на 20-45-30 мин (готовится непосредственно в лаборатории);
- Промывают дистиллированной водой, высушивают, исследуют при иммерсии.

* Для окраски по Нохту чаще всего используют 2 водных раствора, которые смешиваются непосредственно перед окраской:

1) 1-промилльный раствор азура II;
2) 1-промилльный раствор эозина.

Фосфатный буфер (концентрат)

РАБОЧИЙ раствор фосфатного буфера

+

Готовый краситель Романовского (концентрат)

РАБОЧИЙ раствор краски Романовского

Сравнение модификаций

	По Романовскому	По Паппенгейму	По Нохту
Мазки			
Фиксация			
Время фиксации			
Краситель			
Растворитель краски			
Время окраски			

Сравнение модификаций

	По Романовскому	По Паппенгейму	По Нохту
Мазки	Высушены на воздухе и промаркированы	Высушены на воздухе и промаркированы	Высушены на воздухе и промаркированы
Фиксация	Спирт (метиловый, этиловый)	Краска-фиксатор Май-Грюнвальда	Спирт (метиловый, этиловый)
Время фиксации	Метил. – 5-10 мин Этил. – более 30 мин	2-3 мин	Метил.– 5-10 мин Этил. – более 30 мин
Краситель	Готовый раствор Романовского-Гимзы	Готовый раствор Романовского-Гимзы	Краска готовится в лаборатории из сухого Азура II и эозина калия
Растворитель краски	Метанол +глицерин	Метанол +глицерин	Вода
Время окраски	20-30 мин	8-15 мин	20-45 мин