

**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»**

“Қазақстан Республикасы Әділет Министірінің
Сот сараптамалары орталығы”
БАҚЫЛАУ ҮЛГІСІ
ҚР ӘМ ССО ғылыми кеңесінің № 2
« 5 » сәуірсан 2016 ж. хаттамасы
реттік нөмері № 24.1 (2)

**МЕТОДИКА
ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ОКРАСКИ
(шифр специальности – 24.1)**

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика гистологической окраски
2. Шифр специальности методики	24.1(2)
3. Информация о разработчике методики	Оспанова К.Е. - судебно-медицинский эксперт-гистолог, к.м.и. Центр судебной медицины МЗ РК Манекенова К.Б. - заведующая кафедрой патологической анатомии МУА, профессор, д.м.н.
4. Сущность методики	Процесс изготовления гистологического материала для исследования: окрашивание срезов
4.1. Объекты исследования	Аутопсийный материал (фрагменты внутренних органов и частей трупа, забор которых производится во время вскрытия)
4.2. Методы исследования	Гистологический
4.3. Краткое поэтапное описание методики	<p>В основе окрашивания клеток и тканей лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция, абсорбция» растворимость и др.), происходящие как в красителе, так и в микроструктурах. Большое значение имеют плотность ткани и дисперсность красителя, которые определяют последовательность и скорость окрашивания.</p> <p>Целью окрашивания является более отчетливое выявление различных компонентов клеток и тканей. Некоторые красители обеспечивают этот эффект, растворяясь в выявляемых компонентах, например, нейтральных жирах. Другие красители вызывают химическую реакцию, например, выявление железа с образованием берлинской лазури в кислой среде. Во многих случаях процесс окрашивания возможен только при наличии протравы, например, гематоксилин окрашивает ткань в присутствии солей металлов.</p> <p>В гистологической практике применяют основные, кислотные и нейтральные красители. Основные, или ядерные, красители — это основания или их соли, которые окрашивают структуры кислой природы</p>

	<p>(хроматин ядер, ядрышко и др.) и называются базофильными. К ним относятся гематоксилин, тионин, кармин» метиловый зеленый и др. Кислотные красители — это кислоты или их соли, с помощью которых выявляют вещества и структуры основной природы (цитоплазматические структуры клеток, эритроциты и т.д.). Таковыми являются эозин, кислый фуксин, Конго красный (конгорот), эритрозин. Нейтральные красители: судан III, судан IV, метиленовый синий. Процесс гистологического окрашивания условно подразделяют на прогрессивный и регрессивный, прямой и непрямой, простой и сложный. При прогрессивном типе окрашивания процесс идет до тех пор» пока не достигается интенсивное проникновение красителя в ткань. Регрессивный тип основан на первоначальном перекрашивании структур с последующей дифференцировкой до нужного уровня. Если раствор красителя непосредственно действует на ткань, то говорят о прямом окрашивании. Окрашивание после предварительной подготовки ткани (протравливания) называется непрямым. Окрашивание одним красителем - простое, а при использовании нескольких красителей — сложное</p>
5. Дата одобрения методики Ученым Советом Центра судебной медицины МЮ РК	Протокол №2 от 05.12.2016г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Имамбаева Н.Е. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории

ОГЛАВЛЕНИЕ

Методики гистологической окраски

1. Общие положения.....	6
2. Перечень использованных источников.....	37

ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ПОДГОТОВКА СРЕЗОВ К ОКРАШИВАНИЮ

Депарафинирование срезов

Парафиновые или целлоидин-парафиновые срезы перед окрашиванием освобождают от парафина с помощью любого его растворителя - бензола, толуола, ксилола, бензина. Особенно тщательно удаляют парафин перед исследованием ткани в поляризационном микроскопе, так как парафин обладает двоякопреломляющим свойством.

Депарафинирование осуществляют по следующей схеме:

1. ксилол 1 - 10-15 мин., можно в термостате при 37°C
2. ксилол 2 - 3-5 мин.
3. спирт 100% 1 - 1-2 мин.
4. спирт 100% 2 - ополоснуть
5. спирт 96% 1 - ополоснуть
6. спирт 96% 2 - ополоснуть

Дистиллированная вода - 2 смены

После депарафинирования 100-150 препаратов реактивы нужно менять. Депарафинированные препараты готовы к окрашиванию сразу же после промывания в дистиллированной воде, но во избежание отклеивания срезов, особенно при окраске по Ван-Гизону, их лучше подсушить на воздухе. Если окрашивание производят не сразу, то депарафинированные и высушенные препараты аккуратно, чтобы не повредить срезы, складывают в коробки и окрашивают по мере необходимости.

Подготовка целлоидиновых срезов и срезов ткани, залитой в желатин

Для получения хороших результатов окраски препаратов ткани, залитой в целлоидин, не требуется специальная подготовка срезов. Их переносят из 70 % спирта в 50 %, а затем в дистиллированную воду.

В тех случаях, когда применяемый краситель окрашивает целлоидин, его можно удалить из ткани. Для этого целлоидиновые срезы наклеивают на покрытые белком с глицерином предметные стекла, плотно прижимают фильтровальной бумагой, смоченной в 70 % спирте, и заливают гвоздичным маслом. Через 1 мин срез на стекле обрабатывают ацетоном или абсолютным спиртом. После удаления целлоидина срез со стекла переносят в склянку с 70 % спиртом, а затем — в дистиллированную воду.

Желатин невозможно удалить из срезов, если блоки уплотнились в формалине. Желатиновые срезы, не обработанные в формалине, наклеивают на стекло, покрытое белком с глицерином, подсушивают, заливают 2-4% раствором уксусной кислоты и помещают на 10-15 мин в термостат при 37°C. Затем срезы промывают в дистиллированной воде и окрашивают.

ПРОСВЕТЛЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ СРЕЗОВ

Одним из основных условий, определяющих пригодность гистологических препаратов к микроскопическому исследованию, является их прозрачность. Кроме того, препараты должны быть защищены от высыхания и загрязнения. Все

это обеспечивается просветлением и заключением в специальные среды, которые можно подразделить на смешивающиеся с водой (глицерин, гуммиарабик, поливиниловый спирт, желатин) и не смешивающиеся с водой (ксилол, толуол, их смеси с фенолом, эфирные масла).

Смешивающиеся с водой просветляющие вещества одновременно являются средой для заключения и приготовления постоянных препаратов.

Заключение в среды, смешивающиеся с водой

Из этих сред чаще применяют глицерин-желатин. Используют также чистый глицерин, однако этот метод не позволяет готовить постоянные препараты. Р. Лилли рекомендует для этих целей гумми-сироп Апати:

1. чистый гуммиарабик 50г
2. сахар-рафинад 50г
3. дистиллированная вода 50 мл

Смесь растворяют на водяной бане при постоянном помешивании, затем добавляют 500 мг тимола. Используют также поливиниловый спирт.

Среды, смешивающиеся с водой (кроме глицерина), предварительно нагревают на водяной бане, капают нагретой стеклянной палочкой или пипеткой на расправленный срез, слегка подсушивают и покрывают чистым и сухим покровным стеклом. Чистой стеклянной палочкой или обезжиренным пальцем слегка прижимают покровное стекло. При этом излишки среды выдавливаются и их аккуратно удаляют чистой тканью.

Для длительного хранения препаратов, чтобы избежать их высыхания, многие авторы рекомендуют окантовывать покровное стекло тонким слоем парафина или целлоидина. Однако опыт показывает, что заключенные в глицерин-желатин препараты и без окантовки хорошо сохраняются свыше 10 лет.

Просветление препаратов и заключение в среды, не смешивающиеся с водой

Срезы или наклеенные на стекло препараты тщательно обезвоживают в спиртах (70%, 96% и 100%), а затем помещают в любые из просветляющих веществ. Установлено, что для разных исследований предпочтительнее то или иное просветляющее вещество. Так, при окраске по Нисслю и методу Грам-Вейгерта лучшим просветляющим и одновременно дифференцирующим средством является анилиновое масло, но для просветления препаратов при окраске по Ван-Гизону использование недопустимо. Наиболее распространенными и индифферентными по отношению к красителям веществами являются толуол и ксилол, а также их смеси с фенолом (кристаллический фенол расплавляют в термостате при 56°C и смешивают с ксилолом в пропорции 1:4 или 1:6).

Хорошо обезвоженные в спиртах и просветленные в карбол-ксилоле, а затем в чистом ксилоле препараты готовы к заключению в специальные смолы. С этой целью применяют смолы тигельного происхождения — бальзамы (канадский, пихтовый и сибирский кедровый). Все они хорошо растворяются в

толуоле и ксилоле.

Метод растворения: в склянку с сухой смолой заливают толуол, который постепенно растворяет верхние слои смолы. Процесс можно ускорить, если склянку поместить в термостат при 37-40°C. Полученный густой раствор сливают в другую банку и добавляют новую порцию толуола, одновременно помешивая раствор и доводя до консистенции жидкого меда. Слишком жидкий раствор по мере испарения толуола вновь загустевает. Приготовленный бальзам хранят в плотно закрытой посуде.

МЕТОДИКИ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ОКРАСКИ

В основе окрашивания клеток и тканей лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция, абсорбция, растворимость и др.), происходящие как в красителе, так и в микроструктурах. Большое значение имеют плотность ткани и дисперсность красителя, которые определяют последовательность и скорость окрашивания.

Целью окрашивания является более отчетливое выявление различных компонентов клеток и тканей. Некоторые красители обеспечивают этот эффект, растворяясь в выявляемых компонентах, например нейтральных жирах. Другие красители вызывают химическую реакцию, например выявление железа с образованием берлинской лазури в кислой среде. Во многих случаях процесс окрашивания возможен только при наличии протравы, например, гематоксилин окрашивает ткань в присутствии солей металлов.

В гистологической практике применяют основные, кислотные и нейтральные красители. Основные, или ядерные, красители - это основания или их соли, которые окрашивают структуры кислой природы (хроматин ядер, ядрышко и др.) и называются базофильными. К ним относятся гематоксилин, тионин, кармин, метиловый зеленый и др. Кислотные красители - это кислоты или их соли, с помощью которых выявляют вещества и структуры основной природы (цитоплазматические структуры клеток, эритроциты и т.д.). Таковыми являются эозин, кислый фуксин, Конго красный (конгорот), эритрозин. Нейтральные красители: судан III, судан IV, метиленовый синий. Процесс гистологического окрашивания условно подразделяют на прогрессивный и регрессивный, прямой и непрямой, простой и сложный. При прогрессивном типе окрашивания процесс идет до тех пор, пока не достигается интенсивное проникновение красителя в ткань. Регрессивный тип основан на первоначальном перекрашивании структур с последующей дифференцировкой до нужного уровня. Если раствор красителя непосредственно действует на ткань, то говорят о прямом окрашивании. Окрашивание после предварительной подготовки ткани (протравливания) называется непрямым. Окрашивание одним красителем - простое, а при использовании нескольких красителей - сложное.

Техника проведения реакции:

1) Парафиновые срезы, наклеенные на предметные стёкла, освобождают от парафина (депарафинизируют) поочерёдно погружая их в 2 порции ксилола (толуола, бензола) — по 3 мин.

2) Производят гидратацию срезов путём поэтапного помещения их в спирты убывающей концентрации (96°, 80°, 60°, 40°, а затем в дистиллированную воду на 3-4 мин.

В зависимости от целей и задач исследования применяют различные окраски. В повседневной работе во всех случаях обязательна окраска срезов гематоксилином и эозином. В необходимых случаях рекомендуется применять дополнительные окраски.

1. окраска гематоксилином и эозином
2. на липиды (*Судан*);
3. для выявления солей окиси железа (*по Перлсу*);
4. на соединительную ткань (*по Ван-Гизону, или Зербино, или Маллори*);
5. на эластические волокна (*по Вейгерту или Харту*);
6. на выявление «ранних повреждений» кардиомиоцитов (*по Рего, или Ли, или Селье*);
7. на амилоид (*Конго красным или генциановым фиолетовым*);
8. на гликоген (*по Бесту или Шабадашу или реактивом Шиффа*);
9. нервной ткани (*по Ниссену*);
10. для выявления гемоглобинурийных пигментов (*по Ленене*);
11. мазков-отпечатков слизистой верхних дыхательных путей (*по Павловскому*);
12. для определения кровенаполнения микроциркуляторного русла легких при судебно-медицинском исследовании трупов новорожденных (*по Маллори*);
13. для выявления микробов (*метиленовым синим Лефлера или по Грам-Вейгерту*).

ОКРАСКА ГЕМАТОКСИЛИНОМ И ЭОЗИНОМ

Методика окраски гематоксилином и эозином

Процедура окрашивания срезов, полученных на замораживающем микротоме, после парафиновой или целлоидиновой заливки различается лишь по техническим приемам, а порядок проведения окраски одинаков.

1. Дистиллированная вода - ополоснуть
2. раствор гематоксилина - 1-20 мин
3. дистиллированная вода - ополоснуть
4. солянокислый спирт - дифференцировка
5. аммиачная вода - срезы синеют (контроль под микроскопом)
6. проточная вода - 5-10 мин
7. дистиллированная вода - ополоснуть
8. раствор эозина - 10с-3 мин
9. спирт 96 %,
10. карбол-ксилол, заключение.

Результат: ядра синие, цитоплазма и межклеточное вещество розовые.

ОКРАСКА НА ЛИПИДЫ (СУДАН)

Окраска жиров Суданом III-IV или Суданом черным и Шарлахом красным (Шарлахрот).

Для всех жировых красителей единственным общим признаком является отсутствие солюбилизирующих сульфогрупп карбоксильных ($-COOH$)-групп. Это диазокрасители, в основном красного цвета. Судан черный В обладает более выраженными, чем суданы III и IV, красящими свойствами, хотя он может давать и гораздо более слабое окрашивание белков и кислых ГАГ.

Судан III - нейтральная азокраска, не растворимая в воде, но растворимая в спирте, ацетоне и особенно хорошо в жирах. Судан III в спиртовых растворах широко употребляется для обнаружения жиров и липоидов. Окраска основана на извлечении красителя из спирта другим, лучшим растворителем - жиром.

Наиболее употребительны следующие красящие растворы судана III:

1. Насыщенный раствор на 70% спирте, что составляет примерно 0,3 г судана на 100 мл 70% спирта. Готовят насыщенный раствор из указанного расчета путем кипячения. Кипячения спирта (с суданом) следует вести осторожно в конической колбе или водяной бане. Кипятят несколько минут, затем охлаждают, фильтруют и хранят в закрытой склянке. Такой спиртовой раствор судана окрашивает жиры и липоиды в срезах в течении 10-20 минут и больше, в зависимости от температуры в лабораторном помещении.

2. Щелочной судан по Герксгеймеру.

Состав его:

1. Спирт абсолютный (или 96%) - 70 мл.
2. 10% -ный раствор едкого натра - 20 мл.
3. дистиллированная вода - 10 мл.
4. судан III - до насыщения при кипячении (на водяной бане).

Этот раствор с более высокими красящими свойствами по сравнению с вышеприведенным раствором судана на 70% спирте. Щелочной судан окрашивает жиры и липоиды в течении 3-5 минут. После него особенно хорошо прокрашиваются гематоксилином ядра клеток (из-за действия щелочи).

3. Ацетоновый судан представляет собой насыщенный (при комнатной температуре) раствор судана III на смеси равных частей 70% спирта и ацетона. Краску настаивают в течении нескольких дней (2-3), изредка взбалтывая; затем фильтруют и хранят в склянке с притертой пробкой. Ввиду большой летучести ацетона и во избежание выпадения осадков во время работы этот красящий раствор (профильтрованный) лучше немного разводить смесью ацетона и 70% спирта. Сроки окрашивания те же, что и для судана Герксгеймера.

Шарлах красный весьма сходен по составу с суданом и тоже

представляет собой нейтральную анилиновую азокраску. Из него готовят точно такие же красящие растворы, как из судана III; употребляют наравне с последним и по той же самой методике для определения жиров и жироподобных веществ. Все вышеприведенные растворы судана следует готовить на срок не более 1 года; при более длительном хранении красящая способность их снижается.

Перед употреблением растворы судана и шарлаха фильтруют. Для фильтрования следует применять рыхлые сорта фильтровальной бумаги. Длительное хранение объектов в растворах формалина может вести к более слабому окрашиванию жиров и жироподобных веществ.

Методика окраски:

1. Готовят замороженные срезы из формалиновых объектов.
2. Споласкивают в 50-70% спирте 1 минуту.
3. Помещают в свежeproфильтрованный раствор судана на 5-20 минут (смотря по тому, с каким красящим раствором судана работают).
4. Опять споласкивают в 50-70% спирте - 1 минуту.
5. Промывают в водопроводной воде (в больших чашках) 10-30 минут.

Работа со спиртами и суданом проводится в маленьких чашечках, причем для судана желательна чашечка с крышечкой, во избежание испарения спирта, а вместе с этим выпадения части краски и появления осадков срезах. Споласкивание срезов в 50-70% спирте до и после окраски суданом также имеет целью избежать появления осадков, которые могут появиться, если пропустить спиртовую обработку.

Для перекалывания срезов пользуются простыми препаровальными иглами, более удобны стеклянные крючки, которые легко изготовить из тонких трубочек или палочек на газовой горелке (спиртовке). Стеклянный крючок представляет собой палочку, один конец которой тонко оттянут на протяжении 1-1,5 см и загнут под прямым углом.

6. Основательно промытые в воде суданированные срезы подкрашивают каким-нибудь квасцовым гематоксилином (Бемера, Делафильда, Караци и др.) в течение 2-3 минут, в зависимости от качества и зрелости гематоксилина.
7. Снова промывают в воде 3-5 минут и более. Прокрашенные в гематоксилине срезы дифференцируют обычным порядком, т.е. 1% солянокислым спиртом (или лучше 1%, водным раствором соляной кислоты) с подщелачиванием промывной воды нашатырным спиртом.
8. Окрашенный срез извлекают из воды на предметное стекло, расплавляют при помощи препаровальных игл, удаляют вокруг него избыток воды и на влажный препарат кладут каплю гумми-сиропа Апатии (или глицерин-желатины, глицерина). Покрывают покровным стеклом, последнее опускают медленно, пользуясь препаровальной иглой, подложенной под правую сторону стекла, в противном случае набираются пузырьки воздуха, которые

потом не исчезают.

Итак, последовательность процедуры окраски жиров следующая:

1) 50-70% спирт – 1 минута, 2) судан -5-20 минут, 3) 50-70% спирт -1 минута, 4) вода -10-30 минут, 5) гематоксилин – 2 минуты, 6) вода-3-5 минут, 7) гумми-сироп.

Заключение срезов, окрашенных суданом.

Суданированные срезы не допускают обычного обезвоживания, для просветления таких срезов используется поливиниловый спирт, хорош также гумми-сироп Апатии. Менее эффективно заключение в глицерин-желатину и чистый глицерин (их надо иметь в виду, если нет ничего другого).

Окраска Судан IV-

1 грамм растворить в 100 мл. 96 гр. спирта, созревает 7 – 10 дней

Раствор для окраски:

1. 96 гр. Спирт - 30 мл.
2. 405 формалина – 30 мл.
3. чистый глицерин – 30 мл.
4. 10 мл. отфильтрованного раствора Судана

Ускорение окраски:

1. 96 гр. спирт 20 мл.
2. 40% формалин -30 мл. фильтрат раствора Судана -20 мл.
3. фильтрат Судана 20 мл.
4. глицерин – 30 мл.

Срезы режут в 10 % формалин, перенести в краситель на 30 -60 минут, промыть дист. водой, гематоксилин

Окраска Суданом черным по Лизону

1. Материал фиксируют в кальцин-формоле, готовят срезы на замораживающем микротоме или заливают в поливакс.
2. Промывают срезы в 70 % спирте.
3. Окрашивают Суданом черным (насыщенный раствор судана в 70% спирте, профильтрованный перед использованием 20-30 мин).
4. Промывают в 70 % спирте 30 с.
5. Быстро промывают в дистиллированной воде.
6. Окрашивают 1% ядерным прочным красным 1 мин.
7. Быстро промывают в дистиллированной воде и заключают в глицерин-желатин или глицерин.

Результат: липиды окрашиваются в цвета от черного до темно-синего, ядра - в красный цвет; окраску воспринимают также фосфолипиды.

Для контроля неспецифического окрашивания за счет сорбции используют

экстракцию ацетоном или этанолом.

Оценка результатов окраски:

Интенсивность жировой эмболии

Очень слабая. Кол-во эмболов в 10 полях зрения — 5-10; локализация — капилляры межалвеолярных перегородок и мелкие артерии.

Слабая. Кол-во эмболов в 10 полях зрения 11-30; локализация — капилляры, артериолы и мелкие артерии.

Умеренная. Кол-во в 10 полях зрения — 31-100; локализация — капилляры, артериолы, артерии среднего калибра.

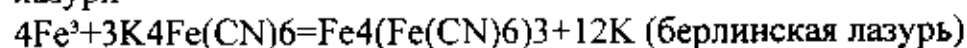
Сильная. Кол-во эмболов в 10 полях зрения — 101-200; локализация — капилляры, артерии и вены.

Очень сильная. Кол-во жировых эмболов в 10 полях зрения более 200; локализация — различные сосуды легких.

ОКРАСКА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СОЛЕЙ ОКИСИ ЖЕЛЕЗА (ПО ПЕРЛСУ)

Метод Перлса для выявления железа (III) с помощью реакции берлинской лазури по Лизону

Применение: Используется для выявления трехвалентного железа в тканях. Метод основан на реакции ферроцианида калия с ионами железа в составе гемосидерина в кислой среде с формированием окрашенной соли — берлинской лазури



Внимание: ложнопозитивная реакция возможна в трех случаях:

- длительное хранение рабочего раствора (раствор ферроцианида и соляной кислоты должен быть приготовлен непосредственно перед использованием);
- контаминация стеклянной посуды, а также воды флотационной ванны ионами железа; этого можно избежать, не допуская соприкосновения раствора с металлическими предметами;
- асбестозах патологически измененных тканей.

1. Материал фиксируют в формалине (применение кислых фиксаторов и смеси с хромом недопустимо), заливают в парафин (замороженные срезы менее пригодны).

2. Депарафинированные срезы доводят до дистиллированной воды.

3. Срезы помещают в свежеприготовленный раствор, состоящий из равных частей 2% гексацианоферрата (II) калия тригидрата и 2% соляной кислоты, на 30-60 мин (новый раствор использовать спустя 30 мин).

4. Промывают в дистиллированной воде.

5. В случае необходимости ядра окрашивают ядерным прочным красным, после этого промывают дистиллированной водой.

6. Проводят через спирты возрастающей концентрации и ксилол, заключают в бальзам.

Результат: соединения железа (III) окрашиваются в темно-синий цвет.

Примечание. Следует избегать контакта срезов с металлическими инструментами. Возможно проведение контрольной реакции с экстракцией железа.

Выявляется только свободное железо. Определить железо, входящее в состав органических молекул (например, гемоглобина, цитохрома, ферритина), можно только после его высвобождения из органических связей.

Выявление железа по методу Перлса готовыми реактивами

Реактивы:

- А. раствор ферроцианида калия
- В. активирующий кислотный буфер
- С. кармалаун Майера

Описание метода:

- поместить депарафинизированные срезы в дистиллированную воду
- смешать 10мл реактива А, 30 мл дистиллированной воды и 4 мл реактива В; поместить срезы в полученную смесь на 20 мин.
- тщательно промыть срезы в дистиллированной воде
- нанести на срез 10 капель реактива С, оставить на 5 мин.
- промыть срезы в дистиллированной воде
- дегидрировать в спиртах концентрации, просветлить в ксилоле и заключить под покровное стекло.

Результаты:

- реактивные ионы трехвалентного железа - синий цвет
- ядра - красный цвет

Выявление двухвалентного железа (ферро-иона) по Тирману и Шмельцеру основано на образовании турбулевой сини в результате реакции ионов железа (II) тканей с гексацианоферратом калия.

Выявление железа (II) по образованию турбулевой сини

1. Материал фиксируют в формалине, заливают в парафин или получают срезы на замораживающем микротоме.
 2. Депарафинированные срезы доводят до дистиллированной воды (если срезы дополнительно обработать 10 % раствором сульфида аммония в течение 1—24 ч, то выявляется также и трехвалентное железо).
 3. Тщательно промытые в дистиллированной воде срезы обрабатывают свежеприготовленным раствором, состоящим из равных частей 20% водного раствора гексацианоферрата калия и 1 % соляной кислоты, в течение 10-20 мин.
 4. Срезы тщательно промывают в дистиллированной воде
 5. При желании ядра можно докрасить ядерным прочным красным.
 6. Промывают в дистиллированной воде.
 7. Проводят через спирты возрастающей концентрации, ксилол, заключают в бальзам.
- Результат: соединения железа (II) окрашиваются в темно-синий цвет.

ОКРАСКА НА СОЕДИНИТЕЛЬНУЮ ТКАНЬ (ПО ВАН-ГИЗОНУ, ИЛИ ЗЕРБИНО, ИЛИ МАЛЛОРИ)

Окраска по Ван-Гизону

Окраска по Ван-Гизону часто используют для выявления коллагеновых волокон соединительной ткани, которые за счет фуксинофилии контрастно выделяются на фоне других тканевых элементов, окрашенных в ярко-желтый цвет пикриновой кислотой. Ядра клеток перед обработкой пикрофуксином по Ван-Гизону обычно окрашиваются железным гематоксилином Вейгерта. В последние годы для этой цели широко используют двойную окраску — целестиновый синий - квасцовый гематоксилин. Можно применять и квасцовый гематоксилин с двойной протравой.

Использование солей железа в качестве протравы для гематоксилина дает окрашивание ядер клеток в сине-черный тон. Особенностью железного гематоксилина Вейгерта, в отличие от квасцовых, является применение соли железа не только в качестве протравы, но и как окислителя (для ускорения созревания).

Приготовление железного гематоксилина Вейгерта.

Реагенты: гематоксилин - 1 г.

96 % этанол - 100 мл.

30 % раствор хлорного железа (безводного) - 4 мл.

Концентрированная соляная кислота (37,5%) - 1 мл.

Дистиллированная вода - 95 мл.

Последовательность растворения: растворить гематоксилин в этаноле (раствор А). Влить в дистиллированную воду раствор хлорного железа или растворить кристаллическое хлорное железо, добавить соляную кислоту (раствор Б). Перед употреблением смешать равные объемы растворов «А» и «Б». Рабочий раствор должен быть черно — фиолетовый. Если раствор получился буро — коричневый, то для окраски он непригоден.

Продолжительность окраски срезов в гематоксилине Вейгерта обычно составляет от 3 до 15 мин. Рабочий раствор длительно не хранится (лучше его использовать в течение дня). Запасные растворы рекомендуется готовить на срок 3-4 мес.

Приготовление раствора целестинового синего.

Реагенты: целестиновый синий В - 2,5 г.

железоаммиачные квасцы - 25 г.

дистиллированная вода - 70 мл.

Последовательность растворения: Растворить квасцы в воде при комнатной температуре, добавить целестиновый синий, довести раствор до кипения и кипятить несколько минут. После охлаждения раствор профильтровать и добавить глицерин. Краситель стабилен около 6 месяцев. Он используется

для получения устойчивой к слабым растворам кислот окраски ядер клеток в комбинации с квасцовым гематоксилином вместо железного гематоксилина Вейгерта.

Приготовление пикрофуксина по Ван-Гизону.

Реагенты: насыщенный раствор пикриновой кислоты - 100 мл.

1% водный раствор кислого фуксина - 10 мл.

Приготовленный пикрофуксин может храниться в течении нескольких месяцев. Перед употреблением рекомендуют добавлять на каждые 11 мл красителя по 7 капель уксусной кислоты, что должно способствовать увеличению контрастности окраски коллагена.

Примерный протокол окраски срезов по Ван-Гизону.

1. Удалить парафин из срезов в ксилоле и провести через спирты нисходящей крепости до дистиллированной воды.
 2. Окрасить срезы в железном гематоксилине Вейгерта 3-10 мин. Альтернативный вариант: окрасить целестиновым синим 5 мин, промыть в воде и окрасить в гематоксилине Гарриса 1-2 мин или Майера 5 мин.
 3. Промыть в двух порциях проточной воды 1-2 минуты.
 4. Окрасить в пикрофуксине 2-3 минуты.
 5. Быстро сполоснуть в дистиллированной воде (5-15 с).
 6. Быстро обезводить в двух порциях 96% этанола, одной порции абсолютного этанола (или карбол-ксилола). Время пребывания срезов в каждой порции 1-2 мин.
 7. ЗаклЮчить в полистирол или другую синтетическую среду.
- В результате окраски ядра клеток приобретают черный (при использовании гематоксилина Вейгерта) или черно-коричневый цвет (при альтернативной окраске квасцовым гематоксилином), коллаген - красный, другие тканевые элементы (включая волокна и эритроциты) - желтые. Следует отметить, что краситель Ван-Гизона в срезах не отличается длительной устойчивостью. В течение нескольких месяцев фуксинофильные коллагеновые волокна могут утратить свою окраску.

Окраска пикрофуксином по способу Ван-Гизона

Для окраски используют железный гематоксалин Вейгерта и пикрофуксин.

Применение: Рекомендуется для окраски соединительной ткани, особенно с целью выделения коллагеновых волокон. В состав препарата входят три различных красителя: железный гематоксалин по Вейгерту для окрашивания ядер, пикриновая кислота для цитоплазмы, кислый фуксин для коллагена.

Приготовление растворов красителей:

Пикрофуксин. Для получения красителя смешивают 10 мл насыщенного при комнатной температуре водного раствора пикриновой кислоты с 1 мл кислого фуксина.

Железный гематоксилин Вейгерта. Краситель состоит из двух растворов:

Первый - 1% раствор гематоксилина в 96° спирте.

Второй имеет следующий состав:

50% водный раствор хлорного железа (официальный раствор) - 4 мл

Концентрированная соляная кислота (удельный вес - 1,15-1,19) - 1 мл

Вода дистиллированная - 95 мл

Перед употреблением оба раствора смешивают в равных количествах.

Смесь должна быть темно-фиолетового цвета, а затем - темно-вишневого.

Если свежеприготовленный краситель сразу начинает буреть и приобретать зеленоватый оттенок, то он непригоден, т.к. будет окрашивать ядра не в черный, а в бурый или зеленоватый цвет. Выпадение хлопьевидного осадка также указывает на непригодность его к употреблению.

Методика окраски.

Фиксированный материал. Парафиновые и целлоидиновые срезы.

1. Прокрасить срезы в свежеприготовленном гематоксилине Вейгерта (3-5 мин.).

2. Хорошо сполоснуть в двух порциях водопроводной воды.

3. Окрасить в пикрофуксине в течение 2-3 мин.

4. Быстро сполоснуть в воде (5-15 сек.).

5. Провести срезы через 96° спирт, повторно наливая и выдерживая в нем от 1 до 3 мин.

6. Просветлить срезы в карбол-ксилоле, обработать ксилолом и заключить в бальзам.

Из всей группы просветляющих веществ анилиновое масло, как извлекающее пикриновую кислоту, в данном случае непригодно.

Качество окраски препаратов необходимо контролировать под микроскопом, для чего срез повторно извлекают из пикрофуксина и быстро прополаскивают в воде.

При сильном переокрашивании срезов железным гематоксилином их дифференцируют 1%-ным солянокислым спиртом в течение 30-60 сек.

Результат: ядра окрашиваются в черный цвет, соединительная ткань - в ярко-красный, мышечные и эластические волокна - в желтый, нервная - в желтовато-серый.

Набор для окраски по Ван-Гизон

Реактивы:

А. Железный гематоксилин по Вейгерту, раствор В

В. Железный гематоксилин по Вейгерту, раствор А

С. Пикрофуксин по Ван-Гизону

Описание метода:

-поместить депарафинизированные срезы в дистиллированную воду

-нанести на срез 5 капель реактива А и 5 капель реактива В, оставив на 10 минут

-промыть образцы в проточной воде в течение 10 минут

-нанести на срез 10 капель реактива С, оставив на 10 минут

-быстро промыть срезы (2-3 сек) в дистиллированной воде

-быстро дегидрировать в спиртах возрастающей концентрации, оставив на 1 минуту в последнем (абсолютный этанол), просветлить в ксилоле и заключить под покровное стекло.

Результат:

-ядра — черные

-коллагеновые волокна — пурпурно-красные

-цитоплазма, гладкая и поперечно-полосатая мышечная ткань, ороговевающий эпителий, нейтроглия и эритроциты — желтые.

Набор окраски по Вейгерт — Ван — Гизон.

(экспресс-метод)

Реактивы: А. Раствор йодной кислоты, 30 мл.

В. Спиртовой раствор для инкубационного контейнера, 80 мл.

С. Резорцин-фуксин Вейгерта, 30 мл.

Д. Дифференцирующий кислотный буфер, 30 мл.

Е. Железный гематоксилин Вейгерта, раствор В, 18 мл.

Ф. Железный гематоксилин Вейгерта, раствор А, 18 мл.

Г. Пикрофуксин Ван-Гизон, 30 мл.

Применение.

Выявление эластических волокон, соединительной ткани и клеточных ядер. Рекомендовано при исследовании патологии сосудов. Метод основан на афинности эластических волокон к красителю, являющейся следствием реакции между резорцином и основным фуксином в присутствии хлорида железа. В виду относительной специфичности метода возможно окрашивание и других структур: коллагена, базальных мембран. С целью селективного окрашивания эластических волокон необходимо проводить тщательное дифференцирование.

Подкрашивание по Ван-Гизону. Позволяет одновременно дифференцировать коллаген от матрикса и окрашивать ядра.

Описание метода.

1. Поместить срезы в дистиллированную воду.
2. Нанести на срез 10 капель реактива А, оставить на 5 мин.
3. Промыть срезы в дистиллированной воде.
4. Приготовить инкубационный контейнер: на дно контейнера налить 0,75 мл реактива В; поместить образцы в контейнер, предварительно нанеся на срез по 10 капель реактива С. Закрыть контейнер и инкубировать в течении 30 мин.
5. Промыть срезы в дистиллированной воде.
6. Нанести на срез 10 капель реактива Д, оставить на 2 мин.
7. Промыть срезы в проточной воде в течение 5 мин.
8. Промыть срезы в дистиллированной воде.
9. Нанести на срез 5 капель реактива Е и 5 капель реактива Ф, оставить на 10 мин.
10. Промыть срезы в дистиллированной воде.

11. Нанести на срез 10 капель реактива G, оставить на 10 мин. Дегидрировать в спиртах возрастающей концентрации, просветлить в ксилоле и заключить под покровное стекло.

Результаты.

Эластические волокна - от пурпурно-красных до коричневых.

Ядра - черные.

Коллаген - различные оттенки красного.

Матрикс, эритроциты - желтые.

Окраска по Зербино

Выявление фибрина - метод ОКГ по Зербино.

Реагенты: 0,25 % солянокислый спирт - 139,35 мл.

Оранж G - 0,25 г.

Фосфорно-вольфрамовая кислота - 1 г и 0,5 г.

Кислотный красный 2С - 0,5 г.

Водный голубой - 0,25 г.

96% этанол - 50 мл

Ледяная уксусная кислота - 1,25 и 0,5 мл.

Дистиллированная вода - 50+ 48,75+ 49,5 мл.

Приготовление растворов.

Раствор оранжа G. В 50 мл 96% этанола растворить оранж G и 1 г фосфорно-вольфрамовой кислоты.

1% раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты. В 50 мл дистиллированной воды растворить 0,5 г фосфорно-вольфрамовой кислоты.

Раствор кислотного красного. В 48,75 мл дистиллированной воды растворить кислотный красный 2С и добавить 1,25 мл ледяной уксусной кислоты.

Раствор водного голубого. В 49,5 мл дистиллированной воды растворить водный голубой и добавить 0,5 мл ледяной уксусной кислоты.

Примерный протокол окраски срезов методом ОКГ по Зербино

1. Удалить парафин из срезов в ксилоле и довести через спирты нисходящей крепости до дистиллированной воды.
2. Окрасить целестиновым синим 5 мин, промыть в воде и окрасить в гематоксилине Гарриса 1-2 мин или Майера 5 мин. Альтернативный вариант: окрасить срезы в железном гематоксилине Вейгерта 3-10 мин.
3. Промыть в водопроводной воде (1 минуту).
4. Дифференцировать окраску ядер в солянокислом спирте.
5. Промыть в водопроводной воде (1 минуту).
6. Окрасить в растворе оранжа G 2 минуты.
7. Промыть в дистиллированной воде (1 минуту).
8. Окрасить в растворе кислотного красного 10 минут.

9. Промыть в дистиллированной воде (1 минуту).
10. Поместить в 1% фосфорно-вольфрамовую кислоту на 5 минут.
11. Промыть в дистиллированной воде (1 минуту).
12. Окрасить в растворе водного голубого 10 минут.
13. Промыть в дистиллированной воде
14. Обезводить в спиртах восходящей крепости, просветлить в двух порциях орто-ксилола. Время пребывания срезов в каждой порции 1-2 мин.
15. ЗаклЮчить в полистирол или канадский бальзам.

В результате окраски «молодой» фибрин окрашивается в желтый цвет, «зрелый» - в красный, «старый» - в фиолетово-красный с переходом в серо-голубой, эритроциты - в оранжевый, соединительная ткань - в синий, мышечная ткань - в фиолетовый цвет.

Окраска по Маллори

Набор для окраски по Маллори.

- Реактивы: А. Карболфуксин по Цилю - 30 мл.
 В. Кислотный буфер - 30 мл.
 С. Раствор фосфорномолибденовой кислоты - 30 мл.
 Д. Раствор фосфомолибденовой кислоты - 30 мл.
 Е. Полихромный раствор по Маллори - 30 мл.

Применение.

Стандартное окрашивание соединительной ткани: выявление коллагена, ретикулярных волокон, хряща, кости, амилоида.

В этом методе применяется 3 различных красителя: карболфуксин для окрашивания ядер, оранж G для цитоплазмы и анилиновый синий для избирательного окрашивания коллагена. Центральную роль играет фосфомолибденовая кислота, действие которой связано с тканевыми структурами (коллагеном, клеточной мембраной) и анилином голубым (амфотерный краситель). Оранж G, который является вторым компонентом полихромного раствора по Маллори, который не имеет сродства с фосфомолибденовой кислотой и таким образом применяется для окраски всех оставшихся структур, несвязанных с фосфорномолибденовой кислотой.

Описание метода.

1. Поместить срезы в дистиллированную воду.
2. Нанести на срезы 10 капель реагента А: оставить на 10 мин.
3. Промыть срезы в дистиллированной воде.
4. Нанести на срез 10 капель реактива В, оставить на 10 с.
5. Быстро промыть в воде и нанести на срезы 10 капель реагента С, оставить на 5 мин. Не промывая нанести 10 капель реактива, оставить на 1 мин. промыть срезы в дистиллированной воде.
6. Дегидратировать в спиртах возрастающей концентрации, оставить на 1 мин. В абсолютном этаноле, просветлить в ксилоле и заклЮчить под покрывное стекло.

Результаты.

Коллагеновые волокна - темно-синий.

Хрящи, кости, слизь, амилоид - от бледно-голубого до темно-синего.

Ядра, миофибриллы, нейроглия, аксоны, фибрин - бледно-розовые.

Эритроциты, миелин - насыщенно - желтый.

Эластические волокна - желтый или не окрашивается.

ОКРАСКА НА ЭЛАСТИЧЕСКИЕ ВОЛОКНА (ПО ВЕЙГЕРТУ ИЛИ ХАРТУ)

Окраска фибрина (по Вейгерту).

1. Депарафинированные срезы доводят до воды.
 2. Окрашивают 20 мин в 1% растворе парарозанилина или основного фуксина в 1% уксусной кислоте (раствор красителя нагревают до кипения, охлаждают и фильтруют).
 3. Промывают в 3 сменах дистиллированной воды.
 4. Окрашивают 5 мин в 1% кристаллического фиолетового в дистиллированной воде.
 5. Быстро ополаскивают в 1% растворе хлорида натрия.
 6. Обрабатывают 30с в смеси: 1 часть йода + 2 части йодида калия +100 частей дистиллированной воды.
 7. Промокают фильтровальной бумагой.
 8. Дифференцируют, нанося на срез смесь равных объемов анилина и ксилола (1-2 мл); растворы сливают до тех пор, пока облачка красителя не перестанут отходить от среза.
 9. Проводят через 3 смены ксилола.
 10. Заключают в бальзам или любую смолу, растворенную в ксилоле.
- Результат: фибрин окрашивается в сине-фиолетовый или голубой цвет, ядра красные.

Набор для окраски по Вейгерту

Реактивы:

- А. Раствор перманганата калия
- В. Активирующий кислотный буфер
- Раствор щавелевой кислоты
- Раствор резорцин-фуксина по Вейгерту
- Дифференцирующий кислотный буфер

Описание метода:

- поместить депарафинизированные срезы в дистиллированную воду
- нанести на срезы по 5 капель реактива А и 5 капель реактива В, оставить на 5 мин.
- промыть срезы в дистиллированной воде
- нанести на срез 10 капель реактива С, оставить на 10 мин.
- промыть срезы в дистиллированной воде

-нанести на срезы 10 капель теактива Е, оставить на 10 мин.

-промыть срезы в дистиллированной воде

Дегидрировать в спиртах возрастающей концентрации, просветлить в ксилоле и заключить под покровное стекло.

Результаты:

Эластические волокна – от темно-синих до черных.

Можно применять методику окраски фибрина по методу Слинченко

Окраска по методу Слинченко (Хромотроп 2Б-водный голубой).

Приготовление растворов на 100 мл.

Приготовление раствора хромотропа 2Б

1. хромотроп 2Б-0,2гр
2. ледяная уксусная кислота -30мл
3. вода дистиллированная -70мл

Приготовление фосфорно-вольфрамовой кислоты:

1. 0,5% - на 100 мл. дистиллированной воды 0,5гр кислоты

Приготовление раствора водного голубого:

1. Вода дистиллированная -100мл
2. ледяная уксусная кислота -6мл
3. водный голубой -0,2гр

Метод окраски

1. депарафинирование
2. вода дистиллированная
3. гематоксилин как обычно
4. вода водопроводная как обычно
5. раствор хромотропа 2Б -1 минута
6. вода дистиллированная ополоснуть
7. раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты – до 1 минуты
8. вода дистиллированная ополоснуть
9. водный голубой -2-4 минуты
10. вода дистиллированная -2 минуты
11. спирты как обычно
12. ксилолы как обычно
13. заключение

Результат: Коллагеновые волокна –ярко – красные,

Мышечная ткань –пурпурно-красная

Фибрин от ярко-красного до бордового (по степени зрелости)

Гиалин –красного цвета, однородный

Фиброзная ткань - ярко синяя.

Эритроциты – огненно-красно-рыжие

Окраска по Рего

Приготовление железного гематоксилина Рего.

Реагенты:

гематоксилин - 1 г.

96% этанол - 10 мл.

Дистиллированная вода - 80 мл.

Последовательность растворения. Растворить гематоксилин в этаноле влить раствор в дистиллированную воду, перемешать и добавить глицерин. Для приготовления красителя удобно использовать заранее приготовленный 10% раствор гематоксилина в этаноле (при хранении такого раствора в течении нескольких месяцев гематоксилин частично окисляется и приготовленный из него краситель работает более энергично). Окрашивают препараты в течении 30 минут при 50°. Перед окраской гематоксилином Рего срезы протравляют в 5% растворе железоаммиачных квасцов (30 минут при 50°). Для дифференцировки окраски рекомендуется использовать 1% раствор железоаммиачных квасцов.

Окраска гематоксилином - основным фуксином-пикриновой кислотой (ГОФП) по Lie и соавт.

Раствор А: алюмо-аммонийных квасцов 6г, гематоксилин 0,5г, желтой окиси ртути 0,25г, дистиллированной воды 70мл. Раствор кипятить 10мин, охладить, добавить 30мл глицерина и 4мл ледяной уксусной кислоты.

Раствор В: 0,1% раствор основного фуксина в дистиллированной воде.

Раствор С: 0,1% раствор пикриновой кислоты в абсолютном ацетоне.

Процедура окрашивания:

- 1) депарафинирование, доведение до дистиллированной воды;
- 2) окрашивание раствором А - 10с;
- 3) промывание в проточной воде - 5мин;
- 4) окраска раствором В - 3 мин;
- 5) ополаскивание в дистиллированной воде (5-10с);
- 6) ополаскивание в абсолютном ацетоне (5-10с);
- 7) дифференцировка в растворе С (для тканей человека - 20с, животных - 15с);
- 8) быстрое ополаскивание в абсолютном ацетоне (5-10с);
- 9) просветление в ксилоле и заключение в канадский бальзам.

В результате окраски поврежденные кардиомиоциты приобретают темно-красный цвет, а нормальная мышечная ткань имеет желто-коричневый оттенок. Гранулы тучных клеток - вишнево-красные.

Морфологическая картина ишемических повреждений (при окраске ГОФП) Ишемизированный миокард теряет структуру и красится в темно-красный цвет в отличие от нормальной мышцы желто-коричневого цвета.

Кроме участков повреждений, при окраске ГОФП выявляется фибрин и соединительнотканые структуры (рубцовая ткань красится в серо-сиреневый цвет, эластические волокна - в ярко-красный, гранулы тучных клеток - в вишнево-красный цвет разных оттенков), эритроциты в большинстве наблюдений

выглядят ярко-красными.

ОКРАСКА НА АМИЛОИД (КОНГО-КРАСНЫМ ИЛИ ГЕНЦИАНОВЫМ ФИОЛЕТОВЫМ)

Окраска конго красным

Представляет собой эмпирический метод. Вызывает сомнение образование связей между красителем и амилоидом: либо связь образуется с участием белков амилоида, либо за счет гликанов, либо обе составляющие являются участниками процесса. Однако не вызывает сомнения тот факт, что окрашенный Конго красным амилоид демонстрирует способность к двойному лучепреломлению в поляризующем свете. Из наблюдаемой анизотропии можно сделать вывод об уникальности молекулярной структуры амилоида.

Согласно Вирхову и Пучтлеру, амилоид - единственное вещество в человеческом теле, сравнимое по своим гистохимическим характеристикам с целлюлозой. Поэтому можно сделать предположение о водородной природе связей между амилоидом и красителем, как и между целлюлозой и Конго красным.

Методика окраски.

1. Конго красный (1% водный раствор) 1-3 мин
2. Водопроводная вода - ополоснуть
3. Спирт 70% или 80% - дифференцировка до бледно-розового цвета
4. Водопроводная вода - ополоснуть
5. Квасцовый гематоксилин для докраски ядер 2-3 мин
6. Водопроводная вода ополоснуть

Затем обезвоживают, просветляют, заключают в смолу. Результат: амилоид красного цвета, ядра синеватые. Можно вначале окрасить ядра гематоксилином, отдифференцировать в солянокислом спирте, а затем окрашивать конго красным.

Набор для окраски конго-красным

Реактивы:

А. Буферный раствор с Конго красным

В. Основной фиксирующий буфер

Гематоксилин Майера

Описание метода:

- поместить депарафинизированные срезы в дистиллированную воду
- нанести на срез 10 капель реактива А, оставить на 30 минут
- просушить образцы не промывая, нанести на срезы по 10 капель реактива В, оставить на 15 минут
- промыть срезы в дистиллированной воде
- подсинить срезы в проточной воде в течение 10 минут
- дегидрировать в спиртах возрастающей концентрации, просветлить в ксилоле и заключить под покрывное стекло

Результаты:

Амилоид - кирпично-красный, дает двойное лучепреломление в поляризующем свете

Ядрышки - синие

Окраска генциановым фиолетовым(генцианвиолет) или метиловым фиолетовым (метилвиолет)

Фиксация материала в формалине или в спирте.

Методика окраски парафиновых срезов.

1. Только что нарезанные парафиновые срезы прямо из воды (на шпателе) переносят в 1%-ный водный раствор генцианового фиолетового (или метилового фиолетового) на 15-20 минут.

2. Быстро промывают в водопроводной воде (в большой чашке), сменяя ее 2-3 раза.

3. Переносят в 2-3% раствор уксусной кислоты и держат в нем до тех пор, пока срезы не примут красновато-фиолетовый тон (приблизительно 10-15 минут).

Процедуру дифференцировки лучше всего вести под контролем микроскопа.

4. Промывают в водопроводной воде 3-5 минут. Не следует слишком долго задерживать срезы в промывной воде, ибо метакхроматическое окрашивание в этом случае может ослабевать и даже исчезать. Переноса срезы из одной среды в другую, следует делать это очень аккуратно, пользуясь шпателем или предметным стеклом. Срезы всегда должны плавать на поверхности того или иного раствора или промывной воды.

5. После непродолжительного промывания в воде парафиновые срезы по общим правилам наклеивают на обезжиренные предметные стекла и высушивают в течение 2-3 часов и более.

6. Хорошо высушенные парафиновые срезы обеспарафинивают (ксололом) и заключают в бальзам. Получаются весьма стойкие яркие препараты, сохраняющие годами. Нельзя окрашивать таким способом парафиновые срезы, предварительно наклеенные на предметные стекла.

Окраска гликогена по методу Беста

Так как гликоген быстро исчезает из клеток после смерти (в связи с растворением его в тканевых жидкостях), кусочки для исследования надо брать как можно скорее; толщина их не должна превышать 0,2 см. Материал, предназначенный для исследования на гликоген, фиксируют обычно в крепких спиртовых растворах, ибо гликоген в них нерастворим. Кусочки лучше всего заливать в целлоидин, так как в нем гликоген утрачивает свою способность растворяться в воде. Можно заливать и в парафин. Правда, при обычных условиях работы с парафином, когда на отдельных этапах обработки имеет место контакт срезов с водой, возможны некоторые потери гликогена. Чтобы избежать таких потерь, парафиновые срезы наклеивают либо сухим способом, либо влажным, но с применением

вместо теплой воды подогретого крепкого спирта.

Приготовление краски: кармина 2 г, углекислого калия 1г, хлорного калия 5г и дистиллированной воды 60мл. Полученную смесь осторожно кипятят (на малом огне) в течение несколько минут, краска при этом сильно пенится и приобретает темно-красный цвет. После охлаждения прибавляют 20 мл 10% нашатырного спирта. Следует заметить, что полное растворение кармина (при некоторых сортах его) иногда наступает после прибавления нашатырного спирта, и то не сразу, а в течение некоторого времени (1-2 часа). Полученный раствор хранят в прохладном месте в темной склянке. Краска пригодна в течение 1 месяца летом и 2 - зимой; перед употреблением ее фильтруют и разводят 10% нашатырным и метиловым спиртами в следующих соотношениях:

Основной раствор кармин Беста - 2 части.

Нашатырный спирт (10%) - 3 части.

Метиловый спирт - 3 части

Разведенный красящий раствор темно-красного цвета, прозрачен, может храниться несколько дней (1-2-3 дня); допускается повторное использование.

Методика окраски целлоидиновых срезов (и целлоиднированных парафиновых)

1. Срезы сильно окрашивают квасцовым гематоксилином (Бемера, Делафильда, Эрилха, Карацци).
2. Основательно промывают в воде. Если срезы очень сильно перекрашены гематоксилином, то их дифференцируют в соляно-кислом спирте. Подсинивать в подщелоченной воде необязательно.
3. Помещают в разведенный раствор кармина Беста. Продолжительность окраски зависит от качества и колеблется от 10-15 минут до 1-2 часов.
4. Не промывая в воде, переносят в дифференцирующую смесь следующего состава:

Спирт абсолютный (или 96%) - 80 мл.

Метиловый спирт - 40 мл.

Вода дистиллированная - 10мл.

После дифференцировки контролируют под микроскопом. Далее обрабатывают спиртами, ксилолом и заключают в бальзам.

Окраска гликогена по Шабдашу

Для фиксации материала можно пользоваться жидкостями, предложенными при методах Беста и Бауэра. А.Л.Шабдаш для этой цели предлагает целый ряд своих фиксирующих средств, среди которых следует более всего рекомендовать нейтральный фиксатор следующего состава;

Спирт - 100 мл.

Медь азотнокислая - 1,8 г.

Формалин чистый - 10 мл.

В этой жидкости максимально тонкие кусочки тканей, **толщиною до 2 мм**, фиксируют 3-4 часа, затем переносят для дополнительной фиксации в 96% спирт на 24-48 часов, меняя его несколько раз. Принимая во внимание резкое усиление гликогенолиза при самой процедуре иссечения кусочков. А.Л.Шабадаш предлагает вводить фиксатор непосредственно в сосуды (артерии), предварительно промывая их 1,12% раствором азотнокислого калия с добавлением, если это возможно, флоридзина. Такой метод применения фиксирующих жидкостей одновременно обеспечивает и более быструю фиксацию, что очень важно для полной сохранности гликогена.

Методика окраски целлоидиновых срезов, целлоидинированных и парафиновых

1. Срезы ополаскивают в дистиллированной воде.
2. Помещают в 0,23- 0,27% раствор перйодата калия или натрия на 15-20 минут (в темноте).
3. Промывают в двух порциях дистиллированной воды по 3-4 минуты в каждой.
4. Обрабатывают в серной воде 2 минуты.
5. Переносят в раствор фуксинсернистой кислоты на 20-25 минут (в темноте).
6. Обрабатывают в трех порциях сернистой воды, по 3-4 минуты в каждой.
7. Промывают в больших количествах повторно сменяемой дистиллированной воды 10-15 минут.
8. Тщательно прополаскивают в воде, обезвоживают и заключают в бальзам.

Результаты: гликоген - красновато-фиолетовый; помимо гликогена выявляются глюкозные компоненты в глюкопротеидах, мукоидных образованиях и в белках типа коллагена.

Окраска реактивом Шиффа

Для проведения нуклеальной реакции необходимо следующие реактивы: нормальный раствор соляной кислоты на дистиллированной воде, фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа) и, наконец, сернистая вода.

Приготовление растворов

1. Нормальный раствор соляной кислоты на дистиллированной воде. Расчеты, связаны с приготовлением нормального раствора соляной кислоты, весьма просты. Надо заметить, что в отношении соляной кислоты понятия нормальный раствор и молярный совпадают. Исходя из молекулярного веса HCl, равного 36,5, для приготовления молярного раствора следует взять ее в чистом виде в количестве 36,5 г. Для приготовления нормального

(молярного) раствора HCl нужно взять 82 мл крепкой соляной кислоты удельного веса 1,19 и долить ее дистиллированной водой до 1 л.

2. Фуксинсернистая кислота (реактив Шиффа).

1 г растертого парафуксина (хлористоводородный парарозанилин) заливают 200 мл кипящей дистиллированной водой и растворяют при постоянном помешивании в течение 5 минут. Затем раствор охлаждают до 50° , фильтруют в банку с притертой пробкой и добавляют 20 мл нормального раствора соляной кислоты. Раствор охлаждают до 25° и всыпают 1 г химически чистого бисульфита натрия. Полученный раствор оставляют в темноте при комнатной температуре на сутки. За это время вследствие образования фуксинсернистой кислоты он или совершенно обесцвечивается, или приобретает желтоватый оттенок. Качество фуксина является решающим для получения обесцвеченного раствора фуксинсернистой кислоты..

Для приготовления фуксинсернистой кислоты нужно брать фуксин, специально для этого предназначенный. Применение простого основного фуксина ведет к неудачам, так как он неоднороден по своему составу и состоит из смеси солянокислых уксуснокислых солей розанилина и парарозанилина, причем главной составной частью его является солянокислый розанилин.

В темноте, при комнатной температуре и в хорошо закупоренной склянке реактив Шиффа может сохраняться до 4-6 недель. Если жидкость начинает окрашиваться (краснеть), она считается негодной к употреблению. Нельзя выставлять раствор фуксинсернистой кислоты на солнце, ибо в этом случае он быстро (в течение 15-20 минут) окрашивается в розовый цвет.

3. Сернистая вода. Берут 200 мл дистиллированной воды, прибавляют 10 мл 10% раствора метабисульфита натрия или калия (на 100 мл щепотка порошка метабисульфита) (их хранят в холодильнике в темноте) и 10 мл 1 нормального раствора соляной кислоты. Сернистая вода каждый раз готовится свежая и должна обладать характерным запахом. Реакция выявления ДНК обычно проводится на тонких парафиновых срезах, но можно пользоваться также замороженными и даже целлоидиновыми срезами; приклеивать их необязательно. Парафиновые срезы вначале, по общим правилам, освобождают от парафина, замороженные - предварительно выдерживают 24 часа в 96% спирте для удаления липоидного альдегида. Парафиновые и целлоидиновые срезы в такой спиртовой обработке не нуждаются. До проведения реакции срезы промывают в дистиллированной воде. Материал фиксируют в жидкости Карнуа, Ценкера, хромоформалиновых смесях (Рего, Орта, ценкер-формол), 10-15% растворе нейтрального формалина и других жидкостях. Качество фиксации имеет большое значение для результатов окраски. Различные факторы дают наилучшую реакцию на ДНК при определенных сроках гидролиза, устанавливаемых опытным путем; гидролиз сверх определенного времени ведет к снижению реакции вплоть до полного исчезновения, что связано с потерей тканями ДНК и ее химическим расщеплением.

Методика проведения реакции.

Реакция проводится в 2 этапа: 1. гидролиз 2. окраска фуксинсернистой кислотой.

Гидролиз. На асбестовую сетку ставят укрепленный на специальном штативе химический стаканчик емкостью около 100-150 мл, в который наливают нормальный раствор соляной кислоты. В стаканчик ставят несколько предметных стекол с наклеенными на них (белком с глицерином) срезами, одновременно опускают в него и термометр, который укрепляется на штативе. Нагревают стаканчик на спиртовке до 60° и поддерживают эту температуру в течение 3-5-8 минут. При истечении 3-5-8 минут, для прекращения гидролиза, препараты вынимают из стаканчика, опускают в холодную воду и затем быстро ополаскивают в холодном нормальном растворе соляной кислоты.

Окраска: Окраску срезов после гидролиза проводят следующим образом:

1. Депарафинированные и доведенные через спирты до воды срезы помещают для гидролиза раствор периодата калия на 5 минут в темноте.
2. Срезы переносят в дистиллированную воду на 5 минут в темноте.
3. Помещают срезы в закрытый сосуд с фуксинсернистой кислотой (реактив Шиффа) на 1-2 часа. Окрашивание ведут в темноте.
4. Тщательно промывают в 3 порциях сернистой воды (налитой в стаканчики, прикрытые крышками) по 2 минуты в каждой порции. Препараты проводят в одной и той же последовательности и, таким образом, первый стаканчик принимают больше всего фуксинсернистой кислоты.
5. Промывают в дистиллированной воде 5-10 минут.
6. Окраска гематоксилином (как обычно).
7. Вода водопроводная, дистиллированная
8. Спирты, ксилол, бальзам.

Результат: ядерное вещество окрашивается в красно-фиолетовый цвет. Гликоген бордового цвета.

Окраска по Ниссля

Окраска по Ниссля предложена для хроматофильного вещества и ядер нервных клеток. Состояние этих частей клетки позволяет судить о характере изменений и отклонений от нормальной эквивалентной картины ее. Одновременно метод Ниссля выявляет изменения и со стороны глиозной ткани. Для исследования берут небольшие кусочки, не толще 0,3-0,4 см. Фиксируют в 96% спирте. Однако для успеха окраски по Ниссля, помимо фиксации, необходимо и хорошее обезжиривание кусочков, в связи, с чем обработка в спирте иногда затягивается на несколько недель. Помимо чистого 96% спирта хорошие результаты дает фиксация в смеси спирта с формалином (10% раствор формалина на 96% спирте) в течение 1-3 дней; затем следует процедура обезжиривания в чистом 96% спирте, как было

указано выше. Наконец допускается фиксация и в 10-15% формалине (1-2 дня). В дальнейшем промывание в проточной воде (до 24 часов) и обезжиривание в 96% спирте несколько недель. Наиболее употребительные красители: толуидиновый синий, тионин и крезильовый фиолетовый (крезилвиолет) в водных растворах (на дистиллированной воде); первые два в разведении 1: 1000 и последний – 0,5%. Качество красителя имеет большое значение для результатов окраски.

Методика окраски

1. Окрашивают при нагревании над пламенем спиртовки. Целлоидиновые срезы подогревают в краске на часовом стекле, парафиновые (после удаления парафина и споласкивание в воде) – прямо на предметном стекле, на которое наливается краска. Подогревание ведут весьма осторожно, до появления первых пузырьков на часовом или предметном стекле. Срезы должны быть сильно перекрашены. При недостаточном закрашивании допускается повторное подогревание. После подогревания для достижения большей закрашенности иногда неплохо оставлять срезы в красителе еще на некоторое время (при комнатной температуре), на 1 час и даже на ночь; целлоидиновые срезы остаются в тех же часовых стеклах, в которых производилось подогревание, а парафиновые помещают в чашки Петри (на спичках, срезами вниз) или в плоские стаканчики. Здесь трудно дать точные указания в отношении времени, так как качество и демонстративность окраски определяются многими факторами – красящей силой красителя, фиксацией, срезами, какой отдел нервной системы исследуется т.д. Помимо такого способа окраски срезов подогреванием, применяют также и окрашивание на холоде, точнее при комнатной температуре. В частности, в лаборатории Б.А. Фаворского отдают предпочтение именно такому холодному способу. В этом случае срезы оставляют в красителе обычно на ночь, а если это оказывается недостаточным (при неудовлетворительном качестве красителя), то и на 2 дня. Очень хорошие результаты дает окрашивание в термостате при температуре 37-40°. Фактор привычки и характер работы в лаборатории будут определять предпочтение одному или другому методу окрашивания.

2. Споласкивают в водопроводной воде 1-2 минуты.

3. Дифференцируют чистым 96% или анилиновым спиртом. Последний готовят путем смешивания 1 части анилинового масла с 9-10 частями 96% спирта. Анилиновый спирт некоторое время возможно хранить в темных склянках, но лучше каждый раз готовить свежий.

Дифференцировка – самый ответственный момент. К ней также надо приспособиться. Интенсивность закрашивания среза будет определять, достаточно ли обойтись одним 96% спиртом или потребуется более сильное средство – анилиновый спирт. Дифференцировка 96% спиртом идет сравнительно медленно и затягивается иногда на многие минуты, и даже десятки минут и часы (в зависимости от степени закрашивания); анилиновый спирт действует быстрее. Срезы в это время обесцвечиваются и

становятся бледно-синими. Дифференцируют под контролем микроскопа, пока отчетливо не выступят детали клеток (ядра, зернистость). Дифференцировку лучше не доводить до конца, учитывая обычное постепенное выцветание препарата.

Заканчивая обработку спиртом, срез отжимают фильтровальной бумагой, сложенной в 3-4 слоя, и просветляют в кайеputовом масле или простом скипидаре. Если нужно, кайеputовое масло (скипидар) применяют повторно (сливая и наливая), сочетая с обсушиванием фильтровальной бумагой. Далее основательно промывают ксилолом для полного удаления применявшегося масла и особенно скипидара, иначе в дальнейшем препарат может диффузно закрашиваться от извлекаемого красителя. Можно обходиться без кайеputового масла и скипидара, используя во время дифференцировки наряду с 96% и абсолютный спирт. После обработки последним срез просушивают фильтровальной бумагой и просветляют ксилолом. Повторно наливая ксилол и отжимая срез, довольно быстро добиваются просветления. Собственно говоря, абсолютный спирт больше желателен для целлоидиновых срезов, что же касается парафиновых, то они как более тонкие, легко просветляются ксилолом и после 96% спирта (с отжиманием). Закljučают в бальзам.

Схема окраски по Нисслю.

1. Окрашивание при подогревании или на холоде.
2. Споласкивание в воде.
3. Дифференцировка в 96% или анилиновом спирте.
4. Просветление в кайеputовом масле или скипидаре.
5. Закljučение в бальзам.

ОКРАСКА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНУРИЙНЫХ ПИГМЕНТОВ (по ЛЕПЕНЕ)

Окраска по Лепене

Лепене способ (G. Lerschne, род. в 1887 г., нем. врач) - метод обнаружения гемоглобина в тканях, основанный на выявлении его пероксидазной активности путем помещения замороженных срезов в смесь раствора бензидина и перекиси водорода; эритроциты и гемоглобин окрашиваются в темно-коричневый цвет.

Реактив:

1. 2 мл 0,6% раствора бензидина
- 0,5 пергидроля
- 4,5 мл 70% этилового спирта

Экспозиция 5-10 мин. (цвет темно-коричневый)

2. Промыть дистиллированной водой
3. Докрасить ядра гематоксилином
4. Промыть дистиллированной водой
5. Промыть в спирте, ксилолах, закljučить.

Рекомендуется окрашивание замороженных срезов. При гнилостных изменениях в тканях возможно окрашивание в темно-коричневый цвет участков, где имели место кровоизлияния.

ОКРАСКА МАЗКОВ-ОТПЕЧАТКОВ СЛИЗИСТОЙ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ (по ПАВЛОВСКОМУ)

Цитоскопическая диагностика гриппа по методу Павловского
Для определения вирусных включений гриппа в цитоплазме цилиндрического эпителия дыхательных путей (главным образом слизистой оболочки носа и трахеи) автор предлагает метод отпечатков, который с успехом может быть использован не только у больных, но и при вскрытиях умерших. Для отпечатков со слизистой оболочки носа применяют узкие пластинки из пластмассы.

Состав красящего раствора:

1. Вода дистиллированная - 10 мл.
2. Насыщенный спиртовой раствор основного фуксина - 1 капля.
3. Насыщенный спиртовой или водный раствор метиленового синего - 4-6 капель.

Приготовленная красящая смесь должна быть синего цвета с фиолетовым оттенком и на фильтровальной бумаге давать фиолетовое пятно с темным ободком и розовыми лучами. Краска сохраняется в течение несколько месяцев.

Методика окраски

1. На предметных стеклах при помощи узких пластинок из пластмассы готовят отпечатки со слизистой оболочки и высушивают при комнатной температуре. Фиксировать не надо.
2. Окрашивают 3-5 секунд. Наливая краску на отпечаток.
3. Промывают в водопроводной воде.
4. Высушивают и исследуют с иммерсией.

Можно заключать в бальзам, в таком случае на высушенный препарат предварительно наливают несколько капель ксилола. Покровное стекло не толще 0,17 мм. Результат: вирусные включения округлой формы, различных размеров (от 0,5 до 4 м), ярко-красного цвета, располагаются как в цитоплазме, так и свободно; ядра клеток - синие, цитоплазма сиреневая. Если при микроскопическом исследовании окажется, что клетки красные, а ядра плохо дифференцируются, то красящую смесь подправляют, добавляя в нее несколько капель раствора метиленового синего и проверяя на контрольных препаратах. Для результатов исследования весьма важным является ранее вскрытие трупа и приготовление мазков-отпечатков из разных отделов носа и трахеи.

ОКРАСКА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРОВЕНАПОЛНЕНИЯ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА ЛЕГКИХ ПРИ СУДЕБНО- МЕДИЦИНСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ ТРУПОВ НОВОРΟЖДЕННЫХ (ПО МАЛЛОРИ)

Окраска по Маллори

Набор для окраски по Маллори

- Реактивы: А. Карболфуксин по Циллю - 30 мл.
 В. Кислотный буфер - 30 мл.
 С. Раствор фосфомолибденовой кислоты - 30 мл.
 Д. Раствор фосфомолибденовой кислоты - 30 мл.
 Е. Полихромный раствор по Маллори - 30 мл.

Применение:

Стандартное окрашивание соединительной ткани: выявление коллагена, ретикулярных волокон, хряща, кости, амилоида.

В этом методе применяется 3 различных красителя: карболфуксин для окрашивания ядер, оранж G для цитоплазмы и анилиновый синий для избирательного окрашивания коллагена. Центральную роль играет фосфомолибденовая кислота, действие которой связано с тканевыми структурами (коллагеном, клеточной мембраной) и анилином голубым (амфотерный краситель). Оранж G, который является вторым компонентом полихромного раствора по Маллори, не имеет сродства с фосфомолибденовой кислотой и таким образом применяется для окраски всех оставшихся структур, не связанных с фосфорномолибденовой кислотой.

Описание метода:

1. Поместить срезы в дистиллированную воду.
2. Нанести на срезы 10 капель реагента А; оставить на 10 мин.
3. Промыть срезы в дистиллированной воде.
4. Нанести на срез 10 капель реактива В, оставить на 10 с.
5. Быстро промыть в воде и нанести на срезы 10 капель реагента С, оставить на 5 мин. Не промывая нанести 10 капель реактива, оставить на 1 мин, промыть срезы в дистиллированной воде.
6. Дегидрировать в спиртах возрастающей концентрации, оставить на 1 мин в абсолютном этаноле, просветлить в ксилоле и заключить под покровное стекло.

Результаты.

Коллагеновые волокна - темно-синие.

Хрящи, кости, слизь, амилоид - от бледно-голубого до темно-синего.

Ядра, миофибриллы, нейроглия, аксоны, фибрин - бледно-розовые.

Эритроциты, миелин - насыщенно-желтый.

Эластические волокна - желтые или не окрашиваются.

ОКРАСКА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МИКРОБОВ (МЕТИЛЕНОВЫМ СИНИМ ЛЕФЛЕРА или по ГРАММ-ВЕЙГЕРТУ)

Окраска метиленовым синим Лефлера

Приготовление красок

Метиленовый синий Лефлера. 30 мл профильтрованного насыщенного спиртового раствора метиленового синего смешивают со 100мл 0,01% раствора едкого натра. Раствор должен созреть в течение одного месяца в термостате при температуре 37° в хорошо закрытой склянке.

Методика окраски.

1. Срезы помещают в метиленовый синий (или прямо на срез наливают несколько капель краски) на 5-10 минут.
2. Хорошо споласкивают в водопроводной воде.
3. Дифференцируют в 0,5 %-ном водном растворе уксусной кислоты около 3-5-10 секунд.
4. Прополаскивают в водопроводной воде и контролируют под микроскопом качество дифференцировки; критерием достаточности последней являются резко выделяющиеся клеточные структуры.
5. Быстро проводят через спирты (96% и абсолютный), просветляют в ксилоле и заключают в бальзам.
6. При работе с целлоидиновыми срезами целлоидин обязательно удаляют, ибо он сильно закрашивается метиленовым синим, который плохо извлекается уксусной кислотой.

При этом методе возможна любая фиксация ткани.

1. Депарафинированные срезы окрашивают красителем Лефлера при комнатной температуре в течение 5-10 мин.
2. Хорошо промывают проточной водой.
3. Дифференцируют в 0,5 % растворе уксусной кислоты 3-5с.
4. Ополаскивают в проточной воде, контролируя под микроскопом качество дифференцировки. Ядра клеток должны четко выступать, а фон должен быть совершенно светлым.
5. Быстро проводят через 96% и 100% спирты, ксилолы заключают в бальзам.

Грамположительные микробы окрашиваются в темно-синий цвет. Одновременно окрашивается и фибрин. Впрочем, если имеют в виду фибрин, то для наиболее полное его выявления лучше дифференцировать не чистым анилиновым маслом, а смесью его с ксилолом (толуолом), приготовленной либо пополам, либо с преимущественным содержанием анилинового масла (например, 2 части анилинового масла и 1 часть ксилола). При такой более мягкой дифференцировке, наряду с фибрином, окрашиваются и грамположительные микробы.

Окраска по Грамм-Вейгерту

Методика окраски

1. срезы окрашивают литиевым кармином Орта - 5-10 минут.
2. переносят в 1% солянокислый спирт (70%) на 5 минут и более – чем дольше, тем лучше.
3. промывают в водопроводной воде 1-2-3- минуты.
4. окрашивают анилиновым или карболовым генциановым фиолетовым или кристаллическим фиолетовым - 5-10 минут.

Окрашивание проводят на предметном стекле. Во избежание образования осадка краску наливают на фильтровальную бумагу, которую накладывают на срез таким образом, чтобы края ее не заходили за пределы предметного стекла. Когда окрашивание окончено, краску сливают, а фильтровальную бумагу снимают со среза (при споласкивании в воде).

5. ополаскивают срез в водопроводной воде 15-30 секунд (можно и дольше).
6. обрабатывают (наливая на срез или опуская в стаканчик) слабым люголевским раствором 2-3 минуты.
7. сливают раствор Люголя и быстро отжимают срез сложенной в несколько слоев фильтровальной бумагой.
8. дифференцируют анилиновым маслом, повторно наливая его на срез, до тех пор, пока отходит синяя краска, а срез из темно-синего не станет вновь красным, на что потребуется, примерно 3-5 минут.

Во время дифференцировки предметное стекло всё время покачивают.

9. тщательно удаляют анилиновое масло ксилолом, применяя его многократно и комбинируя с отжиманием фильтровальной бумагой.
10. Закljučают в бальзам.

Окраска бактерий по Грамму-Вейгерту

Срез поместить в раствор анилинового фиолетового (1 мл анилина и 10 мл дистиллированной воды взболтать в пробирке 1-2 мин, профильтровать через влажный фильтр, к прозрачному фильтрату добавить 1 мл насыщенного генцианового фиолетового или метилового фиолетового (приготовленная краска сохраняется около 10 суток, а насыщенный раствор - неограниченно долго) - на 2-5 минут

-краску слить

-сполоснуть водой

-налить раствор Люголя (1 г йода + 2 г йодистого калия + 300 мл дистиллированной воды) - до почернения, около 1 мин

-хорошо, но быстро просушить фильтровальной бумагой

-дифференцировать - удалить избыток красителя 96% этанолом (при окраске по Граму), анилином (при окраске по Грамму-Вейгерту), смесью анилина и ксилола (в соотношении 1:1) для меньшей скорости обесцвечивания или по модификации автора с дифференцировкой вначале 96% этанолом (на препарат налить 2-5

капель и быстро слить), а затем анилин-ксилолом.

Преимущество последнего способа дифференцировки в том, что микроорганизмы окрашиваются интенсивнее (грамположительная флора делается почти черной), фибрин же окрашивается почти также, как при методике Грама-Вейгерта. Дифференцировку проводить до прекращения отхождения синеватых полос из извлекаемой краски при покачивании стекла;

-хорошо промыть ксилолом, повторно наливая его на стекло (иначе через несколько суток бальзам начнет окрашиваться в интенсивно-желтый цвет, сам же срез постепенно обесцвечивается);

После окраски анилиновым фиолетовым обычно производится дополнительная окраска тканей. Для этого срез окрашивают: раствором кармина по Гренхагеру (3-5 г аммиачных или калийных квасцов растворить в 100 мл дистиллированной воды+1 г кармина, кипятить 1 час, после охлаждения профильтровать и добавить 1 мл 40% формалина) - на 2-24 часа или литиевого по Орту (2-5г кармина всыпать в 100 мл насыщенного-около 1,5% водного раствора углекислого лития, прокипятить, после охлаждения профильтровать) - на 5-10 мин. При загрязнении растворов кармина, в частности, из-за размножения в них грибов, эти растворы можно применять после кипячения с последующим фильтрованием.

-заклЮчить в бальзам.

Результаты: ядра клеток красноватые, иногда с синеватым оттенком, цитоплазма светлая или серовато-синеватая. Грамположительная флора темно-синяя, грамотрицательная - при докраске раствором карболового фуксина - красная. При докраске раствором кармина - сероватая. Критерием полноценности выявления грамположительной микрофлоры при окраске по Граму-Вейгерту является отчетливое выявление фибрина, что целесообразно учитывать при контроле за ходом дифференцировки.

Перечень использованных источников:

1. «Инструкция по организации и производству судебно-медицинской экспертизы» (Приказ МЗ РК от 20 мая 2010г. № 368) – Астана, 2010
2. Г.А.Меркулов. Курс патологогистологической техники. — 1967.
3. Микроскопическая техника: Руководство / Под редакцией Д.С.Саркисова и Ю.Л.Перова. — М.: Медицина, 1996. ISBN 5-225-02-820-9).