

Протоколы окраски по Папаниколау III.

Протоколы окраски PAP-DIFF.

Безруков А.В., Кузнецов М.В., ООО ЭМКО, г. Москва.

Новые протоколы разработаны на основе программы окраски EMCO-PAP-16 [7] для автоматов окраски АФОМК-13-ПАП, которая, в свою очередь, в значительной мере основывается на протоколе Enviro-PAP Г. Гилла[1,2,10].

Таблица 1 Протокол технологической программы окраски EMCO-PAP-DIF-17

№ Т.О.	№ СТ.	ТЕХНОЛОГИЧ. СРЕДА	ВРЕМЯ Т.О. (ММСС)	РЕЖИМ (цифра – период активации (с))	ЗАДЕРЖКА (ye ~ 2с)
1	3	Проточная вода	0030	АКТИВАЦИЯ-15	1
2	4	Промывка	0005	ВЫДЕРЖКА	5
3	5	Гематоксилин	0200	АКТИВАЦИЯ -15	5
4	3	Проточная вода	0200	АКТИВАЦИЯ -15	1
5	6	Салфетка	0000	ВЫДЕРЖКА	0
6	8	ОГ 6	0015	ВЫДЕРЖКА	5
7	6	Салфетка	0000	ВЫДЕРЖКА	0
8	7	Изопропанол-1	0010	АКТИВАЦИЯ -2	5
9	6	Салфетка	0000	ВЫДЕРЖКА	0
10	9	ЕА	0400-0800	АКТИВАЦИЯ-15	5
11	3	Проточная вода	0010 (0005-0020)	АКТИВАЦИЯ -15	1
12	6	Салфетка	0000	ВЫДЕРЖКА	0
13	7	Изопропанол-1	0010	АКТИВАЦИЯ -2	5
14	6	Салфетка	0000	ВЫДЕРЖКА	0
15	10	Изопропанол-2	0010	АКТИВАЦИЯ -2	5
16	11	Изопропанол-3	0010	АКТИВАЦИЯ -2	5
17	12	Просветлитель	0010	АКТИВАЦИЯ -2	9

Т.О. – технологическая операция; СТ. – станция; ВРЕМЯ Т.О. указано в формате ММСС – первых два разряда – минуты, два вторых разряда – секунды; ЗАДЕРЖКА (задержка штатива после подъёма над ванной для стекания жидкости) указана в условных единицах – «ye», примерно соответствующих 2 секундам; Промывка – 0,5% водный раствор уксусной кислоты, или дистиллированная вода.

Таблица 2 Протокол технологической программы окраски EMCO-PAP-DIF-18

№ Т.О.	№ СТ.	ТЕХНОЛОГИЧ. СРЕДА	ВРЕМЯ Т.О. (ММСС)	РЕЖИМ (цифра – период активации (с))	ЗАДЕРЖКА (ye ~ 2с)
1	3	Проточная вода	0030	АКТИВАЦИЯ-15	1
2	4	Промывка	0005	ВЫДЕРЖКА	5
3	5	Гематоксилин	0200	АКТИВАЦИЯ -15	5
4	3	Проточная вода	0200	АКТИВАЦИЯ -15	1
5	6	Салфетка	0000	ВЫДЕРЖКА	0
6	8	ОГ 6	0015	ВЫДЕРЖКА	5
7	6	Салфетка	0000	ВЫДЕРЖКА	0
8	7	Изопропанол-1	0010	АКТИВАЦИЯ -2	5
9	6	Салфетка	0000	ВЫДЕРЖКА	0
10	9	ЕА	0400-0800	АКТИВАЦИЯ-15	5
11	3	Проточная вода	0005 (0005-0010)	АКТИВАЦИЯ -15	1
12	4	Промывка	0005	ВЫДЕРЖКА	5
13	6	Салфетка	0000	ВЫДЕРЖКА	0
14	7	Изопропанол-1	0010	АКТИВАЦИЯ -2	5
15	6	Салфетка	0000	ВЫДЕРЖКА	0
16	10	Изопропанол-2	0010	АКТИВАЦИЯ -2	5
17	11	Изопропанол-3	0010	АКТИВАЦИЯ -2	5
18	12	Просветлитель	0010	АКТИВАЦИЯ -2	9

Т.О. – технологическая операция; СТ. – станция; ВРЕМЯ Т.О. указано в формате ММСС – первых два разряда – минуты, два вторых разряда – секунды; ЗАДЕРЖКА (задержка штатива после подъёма над ванной для стекания жидкости) указана в условных единицах – «ye», примерно соответствующих 2 секундам; Промывка – 0,5% водный раствор уксусной кислоты.

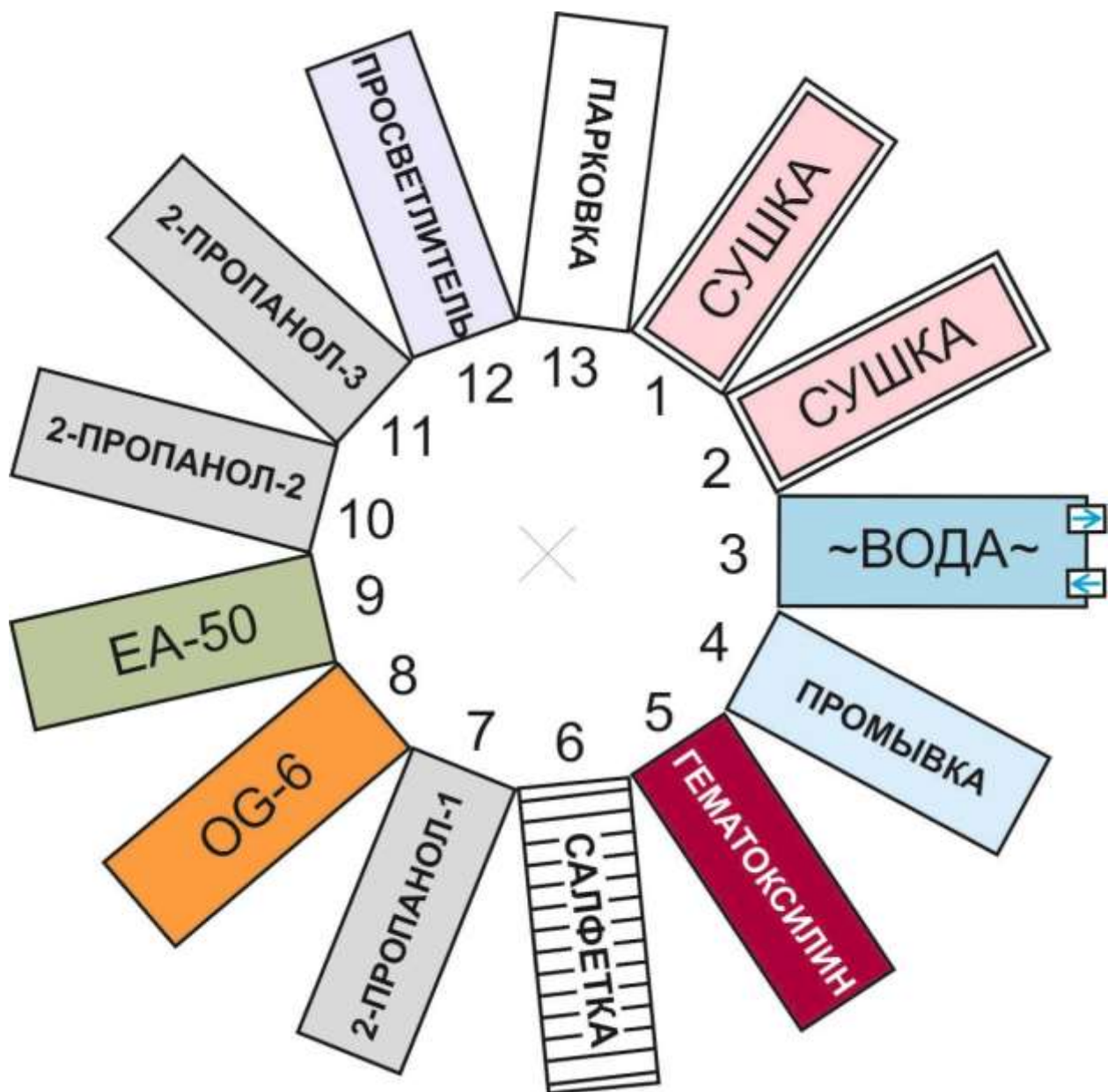


Рис. 1 Обычно используемая конфигурация автомата АФОМК-13-ПАП (вариант методики EMCO-PAP-DIFF-17,18)

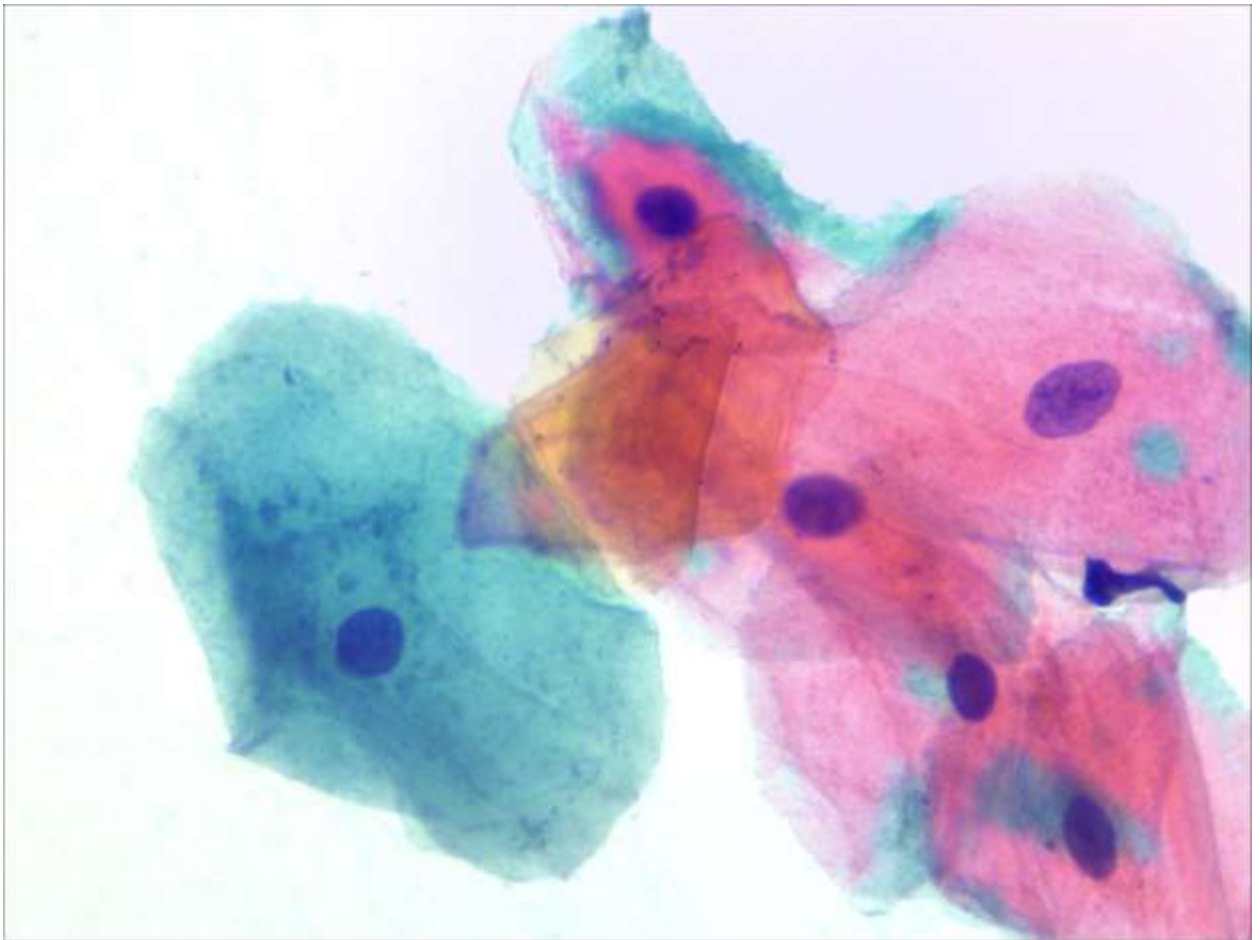


Рис. 2 Пример окраски препарата по методике PAP-DIFF. Мазок с клетками эпителия с внутренней стороны щеки и с твёрдого нёба. По центру – наложение клеток и чешуек, фокусировка – по хроматину в ядре клетки, расположенной справа по центру.

Комментарии

1. При окраске по Папаниколау последовательно применяются краски: гематоксилин для окраски ядер, краски OG6 и EA для окраски цитоплазмы. При окраске в комбинированной цитоплазматической краске EA, происходит сначала быстрая окраска цитоплазмы эозином в розовый цвет, за тем, часть клеток перекрашивается в зелёный цвет в результате действия красителя светло-зелёный SF и протравы – фосфорно-вольфрамовой (или фосфорно-молибденовой) кислоты. Окраска цитоплазмы клеток эозином в розовый цвет происходит в течение нескольких десятков секунд. Процесс окраски в зелёный цвет и её «выравнивания» происходит довольно медленно и требует, согласно рекомендациям [1,2] около 8 минут. В связи с необходимостью длительно (~ 10 минут) выдерживать препараты в краске EA, цитоплазма и участки ядер клеток, неокрашенные гематоксилином, могут перекрашиваться и становиться недостаточно прозрачными. При длительной выдержке в краске, возможно частичное выпадение осадков красителей на всю поверхность стекла, что даёт дополнительное фоновое окрашивание и делает препараты недостаточно прозрачными, малоинформативными; затрудняет работу и делает труд цитолога непродуктивным. На это противоречие обращает внимание Г. Гилл в своей книге «Cytopreparation» [2], см. комментарий 4.

После окраски в ЕА, с поверхности стекол смывают краску (жидкость) и производят дегидратацию препаратов с последующим просветлением и заключением под покровное стекло. Жидкости для заключительных промывок и дегидратации после окраски в ЕА, согласно [1-6], выбирают так, чтобы не происходило вымывания цитоплазматических красителей. Обычно для заключительной промывки применяют этанол, может применяться изопропанол [7], а так же - метанол [6], 0,5% раствор уксусной кислоты [1,2], 1% раствор уксусной кислоты [6].

2. Очевидно, что перекрашенный препарат можно попытаться исправить путём промывки в жидкостях, вымывающих излишнее количество красителей. Т.е. может быть целесообразным ввести после окраски в ЕА и перед дегидратацией, дополнительную технологическую операцию – дифференцирование. В качестве жидкости для вымывания красителя может использоваться водопроводная вода, дистиллированная вода, водно-спиртовые растворы, буфер с $pH \leq 7$ [8]. Самый простой вариант – использование водопроводной воды - он и был опробован прежде всего и дал хорошие результаты.

В таблице 1 приведён протокол программы окраски с дифференцированием препарата в проточной водопроводной воде - EMCO-PAP-DIF-17 - для автомата АФОМК-13-ПАП. Дополнительная операция и изменения параметров операций выделены красным цветом.

Если водопроводная вода слишком быстро вымывает краски, можно после короткой промывки в воде остановить дифференцирование - ополоснуть препарат в 0,5% уксусной кислоте – промывке, используемой перед окраской в гематоксилине.

В таблице 2 приведён протокол программы окраски с дифференцированием препарата в проточной водопроводной воде и дополнительной промывкой - EMCO-PAP-DIF-18 - для автомата АФОМК-13-ПАП. Дополнительные операции и другие изменения в программе выделены красным цветом.

3. Папаниколау видел преимущество своей методики в том, что препарат получается прозрачным. В протоколах, опубликованных Г. Папаниколау, использовалось время окрашивания в ЕА 2-3 минуты [3,4,5], см. также [9]. После окраски в ЕА следует дегидратация в спиртах, просветление, заключение в бальзам.

4. В [2], p169-171 Г. Гилл пишет: «Нет добра без худа – так и с увеличением времени окраски. Длительное окрашивание обеспечивает однородное окрашивание в толстых областях, но оно также увеличивает оптическую плотность препарата так сильно, что различить детали строения хроматина становится невозможно». Тем не менее, Г. Гилл рекомендует время выдержки в ЕА 6-10 минут, наиболее часто используемое значение – 8 минут. После окраски в ЕА в методике Enviro-PAP следует ополаскивание в 0,5% растворе уксусной кислоты (как пишет Г. Гилл: «Ополаскивание с сохранением красок в клетках»), дегидратация в спиртах, просветление, заключение в бальзам. Согласно Г. Гиллу, 0,5% раствор уксусной кислоты не вымывает кислые краски из цитоплазмы и гематоксилин из ядер.

5. Таким образом, выбор времени окрашивания в ЕА при использовании протоколов окраски Г. Папаниколау, Г. Гилла и др. - выбор компромиссного варианта между прозрачностью препарата и однородностью окрашивания цитоплазматическими красками. См. также [10].

6. В протоколах PAP-DIFF сделана попытка уйти от компромисса и получить прозрачный препарат с однородным окрашиванием цитоплазматическими красками. Цель достигается

за счёт того, что применяются времена выдержки в ЕА \approx 4 – 8 минут (при этом препарат может быть немного переокрашенным), а после окраски в ЕА, вместо обычно применяемой дегидратации в спиртах, сначала применяется короткая промывка в водопроводной воде (дифференцирование), после которой выполняется дегидратация, просветление и заключение препарата под покровное стекло. Цитоплазматические красители быстро вымываются в водопроводной воде [8]. Дифференцирование может выполняться не только в водопроводной воде, но и в воде дистиллированной, водно-спиртовом растворе, буфере со слабощелочной, или нейтральной реакцией, но это усложняет методику, т.к. требуется не только дополнительная операция, но и дополнительный реактив с соответствующей ванной.

7. По аналогии с приведенными программами для автоматов, методика PAP-DIFF может быть реализована и в неавтоматизированном варианте.

8. С прописями методик Г. Папаниколау и Г. Гилла, кроме первоисточников, [1-5] можно ознакомиться в публикациях [9,10].

Литература

1. Gary W. Gill Enviro-Pap: An Environmentally Friendly, Economical, and Effective Pap Stain P. 106 LABMEDICINE _ Volume 37 Number 2 _ February 2006.

2. Gill G. W. Cytopreparation Principles & Practice, стр. 150-151, Springer ISBN: 978-1461449324 с.144, 154-157.

3. Papanicolaou GN. A new procedure for staining vaginal smears. Science. 1942;95:438–9.

4. Papanicolaou GN. Traut I E. Diagnosis of uterine cancer by the vagina smear. Commonwealth Fund. New York. 1943.

5. Papanicolaou GN. Atlas of exfoliative cytology. Cambridge, MA: Published for The Commonwealth Fund by Harvard University Press;1963.

6. Ranu Roy Biswas¹, Chandi C. Paral; Ramprasad Dey and Subhash C Biswas Rapid Economic, Acetic Acid, Papanicolaou Stain (REAP) -Is it suitable alternative to standard PAP stain? Al Ame en J Med S c i (20 0 8)1 (2) :9 9 -1 0 3

7. Безруков А.В., Безруков М.В., Беланов М.Е., Бухаров Г.А., Касоян К.Т. Окраска по Папаниколау на отечественных автоматах окраски мазков ЭМКОСТЕЙНЕР. Лаборатория, 2012 №3 с.34-36.

8. Безруков А.В. Кузнецов М.В. К вопросу о формировании цвета цитоплазмы клеток в процессе окраски по Папаниколау. http://www.papanicolaou.ru/methodics/k-voprosu-o-formirovanii-cveta#blog_body; <http://www.ruscytology.ru/k-voprosu-o-formirovanii-cveta-citoplazmy-kletok-v-processe-okraski-po-papanikolau>

9. Протоколы окраски по Папаниколау I. Протоколы окраски из работ Г. Папаниколау. Подготовка к публикации, перевод и комментарии А.В. Безрукова. http://www.papanicolaou.ru/methodics/protokoly-okraski-po-papanikolau-i#blog_body <http://www.ruscytology.ru/protokoly-okraski-po-papanikolau-i>

10. Протоколы окраски по Папаниколау П. Гари В. Гилл: Gary W. Gill Enviro-Pap: An Environmentally Friendly, Economical, and Effective Pap Stain (Enviro-Pap: дружественная к окружающей среде, экономичная и эффективная окраска по Папаниколау). Подготовка к публикации, перевод и комментарии А.В.

Безрукова. http://www.papanicolaou.ru/methodics/protokoly-okraski-po-papanikolau-ii#blog_body <http://www.ruseytology.ru/protokoly-okraski-po-papanikolau-ii>