

Příprava a barvení nátěrů periferní krve

Doporučení České hematologické společnosti ČLS JEP

Zpracovaly: RNDr. Ludmila Bourková, MUDr. Miloslava Matýšková

Připomínkováno členy LS – uzávěrka 20.11.2006

Schváleno na schůzi výboru České hematologické společnosti dne 22.11.2006

1. Princip

Pappenheimova panoptická barvicí technika

Nátěry fixujeme roztokem May-Grünwald a barvíme roztokem Giemsa-Romanowski.

Základem tohoto barvení jsou:

- a) Kationtové (zásadité) barvivo azur B: váže se na aniontové části molekul a barví modrošedě nukleové kyseliny (DNA nebo RNA), nukleoproteiny, granule bazofilů a sekundární granula neutrofilů.
- b) Aniontové (kyselé) barvivo eozin Y: váže se na kationtové části molekul proteinů a barví oranžovočerveně hemoglobin a eozinofilní granula.

Při barvení vznikají různé kombinace těchto dvou základních barviv.

Tzv. „rychlé barvení“ není vhodné k barvení nátěrů při hodnocení periferní krve.

2. Odběr a manipulace s biologickým materiálem

- periferní krev odebraná do K₃EDTA
- stabilita vzorku do zhotovení nátěru: max. 5 hodin (při laboratorní teplotě)
- uchování nátěru na skle do doby vyšetření:
 - fixovaný nenabarvený nátěr lze skladovat až několik týdnů před vlastním barvením (při laboratorní teplotě)
 - fixovaný a nabarvený nátěr vydrží až několik let (při laboratorní teplotě)
 - nefixovaný nátěr nelze dlouhodobě skladovat

3. Spotřební materiál

- podložní skla se zabroušenými okraji
- roztěrová skla
- Pasteurova pipeta nebo speciální přípravky/aplikátory k nanášení krve z odběrové nádoby na podložní sklo
- celulózová vata – přřezy, čtverečky
- ochranné rukavice

4. Reagencie

4.1. Základní reagencie

- metanol
- fixační roztok May-Grünwald,
 - uchovávat při laboratorní teplotě, používat do data expirace
- barvicí roztok Giemsa-Romanowski,
 - uchovávat při laboratorní teplotě, používat do data expirace
- fosfátový pufr pH 6,7 – 6,8
 - uchovávat v lednici, při teplotě +2 °C až +8 °C
 - rozpis pro 5000 ml: 0,067 mol/l KH₂PO₄ 127 ml + 0,067 mol/l Na₂HPO₄ 123 ml + doplnit do 5000 ml deionizovanou vodou
 - základní pufry:
 - 0,067 mol/l KH₂PO₄: 9,07 g + doplnit do 1000 ml deionizovanou vodou
 - 0,067 mol/l Na₂HPO₄: 9,45 g + doplnit do 1000 ml deionizovanou vodou

4.2. Pracovní roztoky

- fixační roztok 1: pracovní čistý roztok May-Grünwald
- uchovávat v přikryté kyvetě při laboratorní teplotě, příslušný objem dolévat roztokem May-Grünwald dle potřeby; celý objem vyměňovat dle potřeby
- promývací roztok 2: fosfátový pufr pH 6,7 – 6,8; vyměňovat dle potřeby
- barvicí roztok 3: ředit 1 díl roztoku Giemsa-Romanowski (před použitím přefiltrovat) s 9 díly fosfátového pufru pH 6,7 – 6,8; uchovávat v přikryté kyvetě při laboratorní teplotě, celý objem vyměňovat dle potřeby
- promývací roztok 4: čistý fosfátový pufr pH 6,7 – 6,8; vyměňovat dle potřeby
- promývací roztok 5: čistý fosfátový pufr pH 6,7 – 6,8; vyměňovat dle potřeby

5. Pracovní postup

5.1. Fixace nátěrů

Fixace nátěrů je nezbytná v případě uchovávání nenabarvených skel, pro rutinní barvení nátěrů se nevyžaduje.

1. Rovnoměrné nátěry krve na skle je nutné nechat minimálně 10 minut zaschnout při laboratorní teplotě.
2. V kyvetě fixovat nátěry 5 minut metanolem (metanol nesmí přijít do kontaktu s vodou).
3. Nátěry nechat zaschnout.

5.2. Fixace a barvení nátěrů

1. Rovnoměrné nátěry krve na skle je nutné nechat minimálně 10 minut zaschnout při laboratorní teplotě.
2. V první kyvetě nátěry fixovat 10 minut fixačním roztokem 1 (fixační roztok nesmí přijít do kontaktu s vodou)
3. Ve druhé kyvetě nátěry oplachovat roztokem 2.
4. Ve třetí kyvetě nátěry barvit 10 minut barvicím roztokem 3.
5. Ve čtvrté kyvetě nátěry opláchnout roztokem 4.
6. V páté kyvetě nátěry opláchnout roztokem 5.
7. Nátěry řádně opláchnout pod tekoucí vodou a nechat zaschnout.

Poznámka: Barvení skel na mřížce není vhodné, může způsobovat umělé změny v nátěru (vysychání, krystalizace barvy).

6. Kontrola kvality

Kontrolovat 1 – 2 skla v každé nově připravené sérii barvicích roztoků.

7. Bezpečnostní aspekty

- Roztok May-Grünwald: obsahuje metanol, toxický při vdechnutí, při styku s kůží a při požití
- Roztok Giemsa-Romanowski: obsahuje metanol, toxický při vdechnutí, při styku s kůží a při požití
- Metanol: toxický při vdechnutí, při styku s kůží a při požití

8. Poznámky

8.1. Umývání nových skel

1. Vložit skla na 24 hodin do čistícího roztoku (používá se běžně naředěný saponát používaný v umývárně na oddělení).
2. Po vyjmutí z čistícího roztoku promývat proudem tekoucí vody a potom provést oplach deionizovanou vodou.
3. Opláchnutá skla namočit do lihobenzinu a potom jedno po druhém osušit a vyleštit čistým plátnem.

4. Čistá skla přikrýt nebo je uložit do krabičky.

8.2. Zdroje chyb při provádění nátěru krve na sklo

1. Silný nátěr po celé délce skla.
2. Sklo nebylo řádně odmaštěno (v nátěru jsou mastná oka).
3. Nátěr je ukončen silnou vrstvou a nepřechází „do ztracena“ (roztěrové sklo bylo při ukončení nátěru prudce zvednuto).
4. Jsou-li v nátěru nerovnoměrné pruhy (na roztěrné sklíčko se příliš tlačilo a nátěr nebyl proveden lehce).
5. Nesprávný sklon roztěrového skla.

8.3. Zdroje chyb při barvení

1. Kyselé pH vyvolá růžovou barvu nátěrů, zásadité pH vyvolá modré zbarvení nátěrů.
2. Dojde-li při oplachování nátěru k jeho „smytí“. (Nátěr nebyl dostatečně zaschlý nebo fixovaný).
4. Staré krevní nátěry bývají často přebarvené.

9. Literatura

- Brown, Barbara A. Hematology: principles and procedures. London, Lea&Febiger 1993; 35 – 85, 97-105.
- Sakalova, A. a spol. Hematológia a transfuziológia. Žilina, Osveta 1995; 344 – 351.
- Dobrý, E. a spol. Hematologie a transfúzní služba. Praha, Avicenum 1987; 184 – 191.
- Hrubíško, M. a spol. Hematologie a krevní transfuse I. Avicenum 1983; 189 – 190.
- Loughran, T. P. Clonal Disears of Large Granular Lymphocytes. Blood 1993; 82 (1): 1 – 14.
- http://www.searo.who.int/en/section10/section17/section53/section480_1732.htm