

Doporučení ČHS ČLS JEP pro kontrolu kvality barvení krevních nátěrů metodou May-Grünwald-Giemsa

Zpracovaly: L. Bourková, M. Matýšková

Text prošel připomínkovým řízením v laboratorní sekci a byl schválen na schůzi výboru České hematologické společnosti dne 02.11.2005

Hodnocení krevních nátěrů je nejrozšířenější morfologické vyšetření. Slouží k vyhledávání, diagnostice a monitorování řady onemocnění.

I na toto vyšetření se vztahují podmínky pro minimální požadavky na kontrolu kvality. Dodržováním vlastních standardních operačních postupů a následujících doporučených bodů lze potom v nabarvených nátěrech předejít vzniku četných artefaktů.

Preventivní zásady pro správné barvení:

1. Správné provedení nátěru
2. Správné a dostatečné zaschnutí nátěru
3. Zamezení vlhkostí v roztocích a na nátěru (již 1% příměs vody v metanolu může znemožnit správnou interpretaci vyšetření, zvláště morfologie erytrocytů)
4. Při manuálním barvení je nutné pracovat v uzavřených kyvetách (ne na mřížce): předchází se tím vypařování metanolu (pozor také na toxické výpary) a vysrážení barev na sklíčkách. Při práci s barvicími automaty je třeba s ostatními zásadami také dodržovat i pokyny výrobce.
5. Včasná fixace: nejlépe barvit nátěry ihned po zaschnutí
Pokud toto není možné, potom je vhodné nátěry nejpozději do 4 hodin po natření a zaschnutí fixovat metanolem (optimální je provést fixaci do jedné hodiny od zhotovení nátěru) – fixované nátěry je možné skladovat po neomezenou dobu.
6. Použití čerstvě naředěných barvicích roztoků.
Použitelnost roztoku je dána počtem nabarvených skel, ale roztok nemá být používán déle jak 24 hodin. Barví-li se v průběhu dne větší počet skel, doporučuje se připravit čerstvé roztoky i dvakrát za den.

Před barvením nátěru je třeba kontrolovat:

1. kvalitu skel (nepoužívat poškozená, zašpiněná, zamaštěná skla apod.).
2. délku, šířku a sílu nátěru
3. dodržování doby expirace všech reagensů (pozor na případně vysrážené barvicí roztoky),
4. skladování reagensů – vedle splnění požadavků výrobce je vhodné
 - ✓ barvicí roztoky uchovávat ve tmě
 - ✓ při skladování diagnostik dodržovat předepsanou teplotu – změna teploty může způsobit vysrážení barvicích roztoků:
 - barvicí roztoky nesmí zmrznout, proto pozor na přepravu reagensů v zimních měsících
 - reagensie nesmí být vystaveny vyšším teplotám – dochází k vypařování roztoků
5. dostatečné množství fixačních a barvicích roztoků a pufrů v kyvetách
6. kontrola pufru
 - ✓ makroskopická: pufr - bez viditelných příměsí a změn (vysrážené soli, plíseň)
 - ✓ pH

Kontrola po nabarvení nátěru:

Preventivní kontrolu je nutné provádět s každou novou sérií připravených fixačních a barvicích roztoků a v první barvené sadě skel. Pro tuto kontrolu použijeme nátěr krve od zdravého jedince, případně od vhodného pacienta. Nátěr hodnotíme makroskopicky a mikroskopicky. Jestliže jsou barevné reakce „správné“ (viz dále), potom lze kontrolu kvality akceptovat.

Sledujeme:

1. Makroskopicky:
 - ✓ krevní nátěry mají být zbarveny purpurově
 - ✓ je-li zbarvení nátěru do modra, pufr má vyšší hodnotu pH nebo nátěr je přebarvený
 - ✓ jeli zbarvení do růžová, pufr má nižší hodnotu pH nebo nátěr je nedobarvený

- ✓ odstíny zbarvení nátěrů se mohou v jednotlivých laboratořích lišit
2. Mikroskopicky mají být:
- ✓ Erytrocyty růžovošedé
 - ✓ Trombocyty tmavě růžové
 - ✓ Leukocyty – jádra tmavě fialová
 - ✓ Eozinofily – granula jasně oranžová
 - ✓ Neutrofilů a granulované lymfocyty – granula purpurová
 - ✓ Bazofolní tečkování erytrocytů má být modré.

Zbarvení nátěrů je dáno:

- ✓ vlastním barvením a barvicími roztoky
- ✓ typem biologického materiálu (periferní krev, kostní dřev)
- ✓ vlastnostmi biologického materiálu (vysoký či nízký hematokrit, hyperproteinémie, buněčnost).

Jestliže jsou na nátěrech patrné rozdíly v barvitelnosti buněk (viz výše) ve stejném barvicím cyklu a ve stejné barvicí lázni, potom je barvení v pořádku a změny v obarvení jednotlivých nátěrů jsou dány typem odebraného biologického materiálu (výsledek barvení může být ovlivněn i buněčným složením).

Uchování nátěrů

1. nenabarvené, nefixované – vhodné zpracovat do 4 hodin
2. nenabarvené, fixované – je možné uchovávat po neomezenou dobu
3. nabarvené - je možné uchovávat po neomezenou dobu

Pro uchovávání obarvených nátěrů je nezbytné zbavit nátěr imerzního oleje oplachem nebo otěrem (šetrný prostředek je např. ether). Zbytky oleje mohou buňky znehodnotit (dle typu oleje již druhý den). Imerzních olejů je několik druhů a jsou různé kvality. Před použitím je vhodné kvalitu oleje otestovat.

Kontrola zařízení:

1. Pro správné hodnocení nátěrů je potřeba mikroskopy pravidelně čistit, seřizovat a kontrolovat mechanické a optické části (v zahraniční literatuře se používá pojem kalibrace). Údržbu mikroskopů je vhodné provádět 1x ročně servisním technikem, ale tento interval je velmi individuální a závisí na frekvenci jeho použití, stáří a kvalitě. Pokud mikroskop není tak často používán, je nutné zvážit jiný pravidelný interval.
2. Objektivy je nutné čistit po každém použití a řídit se doporučením firmy.

Dokumentace:

O kontrolách barvení i zařízení je nutné provádět autorizované záznamy (např. provozní deníky, formuláře).

Literatura:

- Houwen B, Blood Film Preparation and Staining Procedures, Laboratory Hematology 6, 2000, s.1-7.
- Garcia, L. S. Diagnostic Medical Parasitology, ed. 4, ASM Press, Washington, D.C. 2001.
- NCCLS: Laboratory Diagnosis of Blood-Borne Parasitic Diseases. Approved Guideline M15-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova PA 2000.
- Brown, A. B.: Hematology: principles and procedures, ed. 6, Lea & Fabiger, Philadelphia, London 1993.