

Doporučení ČHS ČLS JEP

PŘÍPRAVA A BARVENÍ NÁTĚRU PERIFERNÍ KRVE A ASPIRÁTU KOSTNÍ DŘENĚ, včetně kontrolní činnosti

Zpracovaly: *D. Mikulenková*, M. Matýšková, L. Bourková

Připomínkováno: I. Fátorová, J. Juráňová

Vydání: 2013

Platnost od: 1. 1. 2014

Legenda: Změny v novém souhrnném vydání jsou vyznačeny modrým písmem se stylem písma kurzíva.

Tento dokument nahrazuje dokument Příprava a barvení nátěrů periferní krve z 22. 11. 2006 a Doporučení pro kontrolu kvality barvení krevních nátěrů metodou May-Grünwald-Giemsa z 02. 11. 2005

OBSAH:

1.	ÚVOD.....	2
2.	PRINCIP	2
3.	ODBĚR A MANIPULACE S BIOLOGICKÝM MATERIÁLEM	2
3.1	Zhotovení nátěru periferní krve a kostní dřeně	2
4.	MANUÁLNÍ BARVENÍ	3
4.1	Spotřební materiál.....	3
4.2	Reagencie.....	3
4.2.1	Základní reagencie.....	3
4.2.2	Pracovní roztoky	4
4.3	Pracovní postup.....	4
4.3.1	Fixace nátěrů (pro archivaci nátěru k dalšímu použití)	4
4.4	Barvení nátěrů.....	4
5.	NÁTĚROVÝ A BARVÍCÍ AUTOMAT.....	5
5.1	Spotřební materiál.....	5
5.2	Reagencie.....	5
5.2.1	Základní reagencie.....	5
5.2.2	Pracovní roztoky	5
5.3	Zhotovení nátěrů automatem	5
5.3.1	Fixace nátěrů (pro archivaci nátěru k dalšímu použití)	5
5.4	Barvení nátěrů.....	5
6.	KONTROLA KVALITY	5
6.1	Preventivní zásady pro správné barvení	5
6.2	Kontroly před barvením nátěru	6
6.3	Kontroly po nabarvení nátěru.....	6
6.3.1	Zbarvení nátěrů je dáno:	7
6.4	Kontrola zařízení.....	7
7.	ZDROJE CHYB.....	7
7.1	Při provádění nátěru krve či aspirátu kostní dřeně na sklo	7
7.2	Zdroje chyb při barvení	8
8.	UCHOVÁNÍ NÁTĚRŮ	8
9.	BEZPEČNOSTNÍ ASPEKTY.....	8
10.	POZNÁMKY.....	8
10.1	Umývání skel	8
11.	DOKUMENTACE	9



12.	LEGISLATIVA A NORMY	9
13.	WEBOVÉ ADRESY SOUVISEJÍCÍ S PROBLEMATIKOU BARVENÍ	9
14.	POUŽITÉ ZKRATKY	9
15.	LITERATURA.....	10

1. Úvod

Toto doporučení se týká postupu při přípravě a barvení nátěrů periferní krve, barvení aspirátů kostní dřeně a, dle potřeby, barvení preparátů dalších tělních tekutin (např. cytospinové preparáty či otisky (např. uzliny)) při použití May-Grünwald-Giemsa barvicí techniky. Zahrnuje také potřebné kontroly tohoto postupu.

Je rozděleno dle toho, zda se nátěry a barvení provádí manuálně, či jsou využívány automaty.

2. Princip

Panoptická barvicí technika je základní postup barvení v hematologii. Využívá k postupnému barvení nátěrů:

- roztok May-Grünwald – složení: eozin Y, metylenová modř, metylalkohol, glycerol,
- roztoku Giemsa-Romanowsky – složení: metylenová modř, azur-eozin, azur II, metylalkohol, glycerol.

Základem tohoto *postupu je použití dvou barviv:*

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

Při barvení vznikají *dle struktury buněčné složky* různé kombinace těchto dvou základních barviv.

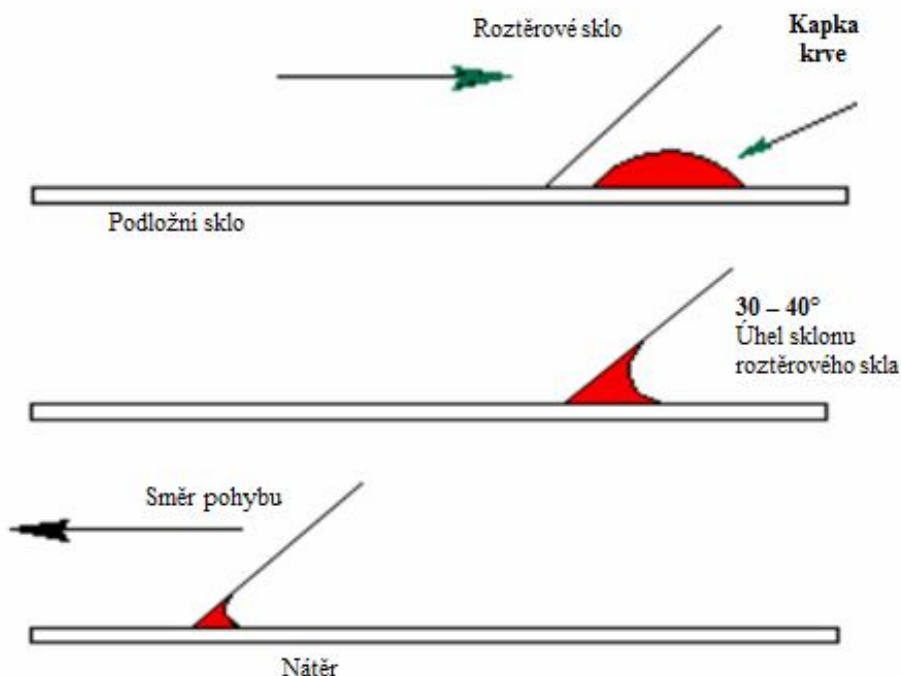
Tzv. „rychlé barvení“ není vhodné k barvení nátěrů periferní krve ani aspirátů kostní dřeně.

3. Odběr a manipulace s biologickým materiálem

- ✓ periferní krev či aspirát kostní dřeně odebraný do nádobky se solí EDTA (nejčastěji K₃EDTA), nativní aspirát kostní dřeně
- ✓ stabilita vzorku periferní krve do zhotovení nátěru: max. 5 hodin (při laboratorní teplotě) – optimálně do dvou hodin
- ✓ vzorek aspirátu kostní dřeně odebraný lékařem při punkci je nezbytné okamžitě po odběru natřít na podložní sklo
- ✓ 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

3.1 Zhotovení nátěru periferní krve a kostní dřeně

Malá kapka krve se umístí na střední čáře podložního skla asi 1,5 cm od jeho užší hrany. Roztírací sklo je pod určitým úhlem posunováno od středu podložního skla ke kapce krve, která se po dotyku s ním rozprostře po celé délce jeho hrany. Velikost úhlu je dána hematokritem a potřebou správné hustoty nátěru (nejčastěji je úhel asi 30-40°). Rovnoměrným tahem roztíracího skla po podložním skle směrem od kapky je rozetřena veškerá krev nebo dřevový aspirát s částicemi kostní dřeně. Při správném provedeném roztěru nedosahují okraje nátěru v žádném místě hrany podložního skla. Při nátěru aspirátu kostní dřeně je po rozprostření kapky (musí to být první nasátí vzorku o maximálním objemu 0,3ml dřeně) na hraně roztíracího skla použito čisté podložní sklíčko nebo je rozprostření kapky na hranu roztíracího sklíčka provedeno v mírně nakloněné Petriho misce.



4. Manuální barvení

4.1 Spotřební materiál

- celulósová vata – přířezy, čtverečky
- ochranné rukavice
- podložní skla
- roztěrová skla
- Pasteurova pipeta nebo speciální aplikátory k nanášení krve z odběrové nádoby na podložní sklo

4.2 Reagencie

4.2.1 Základní reagencie

- metanol
- roztok May-Grünwald

- uchovávat při laboratorní teplotě, používat do data expirace
- roztok Giemsa-Romanowsky
 - uchovávat při laboratorní teplotě, používat do data expirace
- fosfátový pufr pH 6,7 – 6,8
 - uchovávat v lednici, při teplotě 2 – 8 °C
 - rozpis pro přípravu 5000 ml
127 ml 0,067 mol/l KH_2PO_4 + 123ml 0,067 mol/l Na_2HPO_4 + doplnit do 5000 ml deionizovanou vodou
 - základní pufrы:
 - 0,067 mol/l KH_2PO_4 : 9,07 g + doplnit do 1000 ml deionizovanou vodou
 - 0,067 mol/l Na_2HPO_4 : 9,45 g + doplnit do 1000 ml deionizovanou vodou

4.2.2 Pracovní roztoky

- 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
- roztok 3: ředit 1 díl roztoku Giemsa-Romanowsky (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

4.3 Pracovní postup

4.3.1 Fixace nátěrů (pro archivaci nátěru k dalšímu použití)

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

- Rovnoměrné nátěry krve na skle je nutné nechat minimálně 10 minut *dostatečně* zaschnout při laboratorní teplotě, *nátěry aspirátu kostní dřeně nejlépe 2 hodiny, vyvarovat se vlhkého a prašného prostředí.*
 - *Pokud se nátěry připravují mimo laboratoř, je nezbytné je transportovat v uzavřeném boxu/krabičce.*
- V kyvetě fixovat nátěry *periferní krve* 5 minut a *aspirátu kostní dřeně 20 minut* metanolem (metanol nesmí přijít do kontaktu s vodou).
- Nátěry nechat zaschnout.

4.4 Barvení nátěrů

- V první kyvetě nátěry barvit 10 minut roztokem 1 (fixační roztok nesmí přijít do kontaktu s vodou)
- Ve druhé kyvetě nátěry oplachovat roztokem 2.
- Ve třetí kyvetě nátěry barvit 10 minut roztokem 3.
- Ve čtvrté kyvetě nátěry opláchnout roztokem 4.
- V páté kyvetě nátěry opláchnout roztokem 5.
- Nátěry řádně opláchnout pod tekoucí vodou a nechat zaschnout.

Poznámka: barvení skel na mřížce *či na barvicím stolku je méně vhodné*, může způsobovat arteficiální změny v nátěru (vysychání, krystalizace barvy); *při tomto postupu barvení je vhodná práce v digestoři.*

5. Nátěrový a barvicí automat

5.1 Spotřební materiál

- celulózová vata – přřezy, čtverečky
- ochranné rukavice
- *speciální podložní skla pro používaný automat*

5.2 Reagencie

5.2.1 Základní reagencie

- *metanol*
- *fixační roztok May-Grünwald*
- *barvicí roztok Giemsa-Romanowsky*
- *fosfátový pufr pH 6,7 – 6,8*
- *případně roztoky specifické pro daný automat*

5.2.2 Pracovní roztoky

- *specifické roztoky pro daný automat*

5.3 Zhotovení nátěrů automatem

5.3.1 Fixace nátěrů (pro archivaci nátěru k dalšímu použití)

- *fixace nátěrů dle platného protokolu pro daný automat*

5.4 Barvení nátěrů

- *fixace a barvení nátěrů dle platného protokolu pro daný automat*

6. Kontrola kvality

Kvalitně nabarvené nátěry jsou zásadní pro správnou diagnostiku. Proto je nutné při jejich přípravě dodržovat alespoň následující minimální požadavky.

6.1 Preventivní zásady pro správné barvení

- Odběr vzorku krve do správného protisrážlivého činidla (soli EDTA).*
- Správné provedení nátěru.
- Dostatečné zaschnutí nátěru při zamezení nadměrné vlhkosti okolního vzduchu (chladicí jednotky v laboratořích).
- Zamezení vlhkostí v roztocích (již 1% příměs vody v metanolu může znemožnit správnou interpretaci vyšetření, zvláště je ovlivněna morfologie erytrocytů).
- Při manuálním barvení je vhodné pracovat v uzavřených kyvetách, předchází se tím vypařování metanolu (pozor také na toxické výpary) a vysrážení barev na sklíčkách. Při barvení na mřížce či barvicím stolku je vhodné pracovat v digestoři (odtah toxických par metanolu).

- f) Při práci na barvicích automatech je třeba s ostatními zásadami dodržovat pokyny výrobce.
- g) Včasná fixace: nejlépe barvit nátěry ihned po zaschnutí.
- Pokud toto není možné, potom je vhodné nátěry nejpozději do 5 hodin po natření a zaschnutí fixovat metanolem *u periferní krve po dobu 5 minut, u aspirátu kostní dřeně 20 minut* (optimální je provést fixaci do jedné hodiny od zhotovení nátěru) – fixované nátěry je možné skladovat po neomezenou dobu.
- h) Použití čerstvě naředěných barvicích roztoků.
- Použitelnost roztoku je dána počtem nabarvených skel, roztok nemá být používán déle jak 24 hodin.
 - Barví-li se v průběhu dne větší počet skel, doporučuje se připravit čerstvé roztoky několikrát.

6.2 Kontroly před barvením nátěru

Vždy se musí ověřit

- a) Kvalita skel (nepoužívat poškozená, zašpiněná, mastná skla apod.).
- b) Délka, šířka a síla nátěru,
- c) Dodržování doby expirace všech reagensů (pozor na případné vysrážení barvicích roztoků),
- d) 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 odpařování roztoků (*především metanolu*)
- e) Množství fixačních a barvicích roztoků a pufrů v kyvetách
- f) Pufr:
 - makroskopicky: pufr je bez viditelných příměsí a změn (vysrážené soli, plíseň)
 - odpovídající pH

6.3 Kontroly po nabarvení nátěru

Preventivní kontrolu je vhodné provádět s každou novou sérií připravených fixačních a barvicích roztoků a v první barvené sadě skel.

Pro tuto kontrolu používáme nátěr krve od zdravého jedince, případně od vhodného pacienta. Nátěr hodnotíme makroskopicky a mikroskopicky.

Makroskopicky ověřujeme zbarvení:

- Krevní nátěry a nátěry aspirátu kostní dřeně mají být zbarveny purpurově
 - je-li zbarvení nátěru do modra, pufr má vyšší hodnotu pH nebo nátěr je přebarvený
 - jeli zbarvení do růžova, pufr má nižší hodnotu pH nebo nátěr je nedobarvený
 - (odstíny zbarvení nátěrů se mohou v jednotlivých laboratořích lehce lišit)

Mikroskopicky hodnotíme jednotlivé elementy, které mají být:



- Erythrocyty růžovošedé, *erythroblasty* – cytoplazma dle stádia vývoje (bazofilní, polychromatofilní, ortochromní/oxyfilní), jádra tmavě fialová s typickou loukoťovitou strukturou chromatinu
- Trombocyty tmavě růžové, *megakaryocyty* - jádra tmavě fialová, cytoplazma – tmavě růžová granule
- Leukocyty – jádra tmavě fialová
- Eozinofily – granula jasně oranžová
- Neutrofilny a granulované lymfocyty – granula purpurová
- Bazofilní tečkovaní erythrocytů má být modré.

Kontrolovat je nutné

- 1 – 2 skla v každé nově připravené sérii barvicích roztoků při manuálním barvení;
- při užívání barvicího automatu 1- 2 skla u každé nové šarže používaných diagnostik, případně po větší údržbě automatu.

6.3.1 Zbarvení nátěrů je dáno:

- Vlastním barvením a barvicími roztoky,
- Typem biologického materiálu (periferní krev, kostní dřeň, atd.)
- Vlastnostmi biologického materiálu (vysoký či nízký hematokrit, paraproteinémie, buněčnost).

Poznámka: 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).

6.4 Kontrola zařízení

- a) Pro správné hodnocení nátěrů je potřeba mikroskopu 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 používání mikroskopu, jeho stáří a kvalitě.
- b) Objektivy je nutné čistit po každém použití.
- c) *Pro nátěrové a barvicí automaty je nutné dodržovat pokyny výrobce a provádět pravidelnou validaci přístroje.*

7. Zdroje chyb

7.1 Při provádění nátěru krve či aspirátu kostní dřeně na sklo

- a) Silný nátěr po celé délce skla.
- b) Sklo nebylo řádně odmaštěné (v nátěru jsou mastná oka).
- c) Sklo nebylo přikryté, je pokryté prachovými částicemi (nátěr je strakatý).
- d) Nátěr je ukončen silnou vrstvou a nepřechází „do ztracena“ (roztěrové sklo bylo při ukončení nátěru prudce zvednuto).
- e) Nátěr s nerovnoměrně rozloženými jadernými buňkami (na roztěrové sklo se příliš tlačilo, nátěr byl proveden pod tlakem, příp. bylo nekvalitní roztěrové sklo).

- f) Nesprávný sklon roztěrového skla (může např. dojít k rozdrčení buněk).

7.2 Zdroje chyb při barvení

- a) Kyselé pH způsobí růžové zbarvení nátěrů, zásadité pH modré zbarvení nátěrů.
- b) Dojde-li při oplachování nátěru k jeho „smytí“, znamená to, že nátěr nebyl dostatečně zaschlý nebo fixovaný.
- c) Staré krevní nátěry *či nátěry aspirátu KD* bývají často přebarvené.
- d) *Modré pozadí nátěru (mimo buňky) může být způsobeno*
 - *nedostatečnou fixací,*
 - *nedostatečným oplachem,*
 - *dlouhodobým skladováním nefixovaného nátěru,*
 - *přítomností patologických imunoglobulinů ve vzorku.*

8. Uchování nátěrů

- a) Nenabarvené, nefixované – vhodné zpracovat do 5 hodin,
- b) Nenabarvené, fixované – je možné uchovávat po neomezenou dobu (nátěry periferní krve nejlépe po dobu 1 měsíce, aspiráty kostních dření po dobu 10 let),
- c) Nabarvené – je možné uchovávat po neomezenou dobu (nátěry periferní krve nejlépe po dobu 1 měsíce, aspiráty kostních dření po dobu 10 let).

Pro uchovávání obarvených nátěrů je nezbytné zbavit nátěr imerzního oleje oplachem nebo otěrem (šetrný prostředek je např. ether nebo *benzín lékařský*).

Poznámka: Zbytky oleje mohou buňky znehodnotit (dle typu oleje již druhý den) a nátěry se stávají nehodnotitelnými. *Před zvažováním nákupu nového imerzního oleje je vhodné si jeho kvalitu v praxi otestovat (nátěry kontrolovat i několik dní po sobě – některé oleje již druhý den jakoby buňky proděraví a následně zcela „rozpuští“).*

9. Bezpečnostní aspekty

- Roztok May-Grünwald: obsahuje metanol, který je toxický při vdechnutí, při styku s kůží a při požití.
- Roztok Giemsa-Romanowsky: obsahuje metanol, toxický při vdechnutí, při styku s kůží a při požití.
- Metanol: toxický při vdechnutí, při styku s kůží a při požití.

Poskytnutí první pomoci u těchto látek včetně zasažení očí: viz příslušný bezpečnostní list. Likvidace biologického odpadu a nebezpečných látek, skladování nebezpečných látek a hořlavin – viz příslušná legislativa, normy a směrnice zdravotnických zařízení.

Pozn.: *u všech látek, které jsou označeny nebezpečnostními symboly, je nutné dodržovat pokyny pro práci s chemickými látkami (viz. Bezpečnostní listy).*

- *Fosfátový pufr: není nebezpečná látka*

10. Poznámky

10.1 Umývání skel

Umývání skel (pokud je nutné) by mělo být prováděno dle ověřených postupů a popsáno v SOP.

- a) Vložit skla na 24 hodin do čistícího roztoku (používá se běžně naředěný saponát používaný v umývárně na oddělení).
- b) Po vyjmutí z čistícího roztoku promývat proudem tekoucí vody a potom provést oplach deionizovanou vodou.
- c) Opláchnutá skla namočit do lihobenzinu a potom jedno po druhém osušit a vyleštit čistým plátnem.
- d) Čistá skla přikrýt nebo je uložit do krabičky.

11. Dokumentace

Pracoviště by mělo mít vypracován SOP na barvení a kontroly. O prováděných kontrolách je nutné vést záznamy.

12. Legislativa a normy

Pro orientaci jsou uvedeny příklady některých základních norem, které mají vztah k laboratorní práci a ke kontrolní činnosti.

1. ČSN EN ISO/IEC 17025:2005 Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří. UNMZ Praha 2005.
2. ČSN EN ISO 15189:2007 Zdravotnické laboratoře – Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost. UNMZ Praha 2007.
3. ČSN EN ISO 17511:2004 Zdravotnické prostředky pro diagnostiku in vitro – Měření veličin v biologických vzorcích – Metrologická sledovatelnost hodnot přiřazených kalibrátorům a kontrolním materiálům. UNMZ Praha 2004.

13. Webové adresy související s problematikou barvení

V následujícím textu jsou uvedeny příklady webových adres, kde lze nalézt podrobnější informace o kontrole kvality v klinických laboratořích.

- ✓ **CAP** – College of American Pathologists; největší kontrolní program USA
http://www.cap.org/apps/cap.portal?_nfpb=true&_pageLabel=accreditation
- ✓ **CLSI** – Clinical and laboratory standards institute (USA – Ústav pro tvorbu pokynů a norem v laboratorní medicíně) – <http://www.clsi.org/>
- ✓ **ICSH** – International Council for Standardization in Haematology (Mezinárodní výbor pro standardizaci v hematologii) – <http://www.icsl.org>
- ✓ **ISO** – International Organization for Standardization; Mezinárodní organizace pro normalizaci – vydává mezinárodní normy: <http://www.iso.org>
- ✓ **Laboratory hematology** – laboratorní hematologie
<http://www.laboratoryhematology.com/>
- ✓ **WHO** – World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
<http://www.who.org/>

14. Použité zkratky

EDTA	<i>etylendiaminotetraoctová kyselina</i>
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci (International Organization for Standardization)
MGG	May-Grünwald-Giemsa
SOP	Standardní Operační Postup
VKK	Vnitřní kontrola kvality
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

15. Literatura

- *BAIN, B. J., Dacies and Lewis: Practical Haematology, Churchill Livingstone, 11th ed., 2012, 57-68.*
- BROWN, B. A. *Hematology: principles and procedures.* London, Lea & Febiger 1993; 35 – 85, 97-105.
- *Corrons J-L. V. et al. Haematology Working Group EQALM. Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. Clon Chem Lab Med 2004; 42(8): 922- 926.*
- DOBRÝ E. a spol. *Hematologie a transfúzní služba.* Praha, Avicenum 1987; 184 – 191.
- *Houwen, B. Blood Film Preparation and Staining Procedures, Laboratory Hematology 6, 2000, 1-7.*
- *ICSH: ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y. Brit J Haematol, 1984; 57: 707-710.*
- LOUGHRAN, T. P. Clonal Diseases of Large Granular Lymphocytes. *Blood* 1993; 82 (1): 1-14.
- *Pecka, M. a kol. Praktická hematologie laboratorní metody. Nakladatelství Infiniti art, s.r.o., Český Těšín, 2010; 101 -106.*