

Barvení pomocí May-Grünwald roztoku

Fixace a diferenciální barvení buněčných struktur

Pro použití v laboratoři vyškoleným personálem. In Vitro diagnostické zařízení.

1 – Použití

May-Grünwald roztok, v kombinaci s Giemsa roztokem je zamýšlen pro fixaci a diferenciální barvení buněčných struktur před mikroskopováním.

2 – Princip stanovení

Barvení dle Pappenheima umožňuje diferenciální měření buněk periferní krve a kostní dřeně. Používají se dva neutrální roztoky se specifickými vlastnostmi – May-Grünwald a Giemsa; Nemají barvicí schopnost v alkoholovém médiu, působí selektivně v pufru ošetřeném vodním roztoku, kde pufr vyvolá precipitaci neutrálních barviv.

May-Grünwald barví acidofilní buňky a neutrofilní granula leukocytů. Giemsa barví cytoplazmu monocytů a lymfocytů a chromatin v jádrech buněk.

3 – Reagencie

May-Grünwald		Giemsa R	
320070-0500	1 x 500 ml	320210-0125	1 x 125 ml
320070-1000	1 x 1 l	320310-0500	1 x 500 ml
320070-2500	1 x 2,5 l	320310-1000	1 x 1 l
pH=6,8 buffer		Lugol PVP stabilised solution	
330368-5000	1 x 5 l	367400-1000	1 x 1 l
363568-0000	6 x 1 l po rozpuštění	367400-2500	1 x 2,5l
		pH=7,0 buffer	
		330370-5000	1 x 5 l
		361600-0000	6 x 1 l po rozpuštění

Vodný roztok hyposulfátu sodného, Ethanol, Aceton, fixní médium, sklíčka pro mikroskopování.

4 – Skladování a manipulace

Výše uvedené reagencie skladujte při pokojové teplotě (15 – 25°C), mimo zdroje světla a tepla. Datum expirace před a po otevření jsou uvedeny na obalu.



Veškerá manipulace se vzorky a reagensy musí být prováděna vyškoleným personálem dle relevantních norem. Při manipulaci používejte správná ochranná zařízení pro jednotlivce i pro pracoviště dle příslušných regulací.

Personál musí být obeznámen s klasifikací nebezpečí materiálu.

Měření musí být provedeno autorizovaným personálem dle platných laboratorních řádů.

5 – Barviva

- 320070: May-Grünwald ca 0,3%
320300: Leishman's stain (CAS 12627-53-1) ca 0,5%
320310: May-Grünwald ca 0,4%
Methylene blue (CAS 61-73-4) ca 0,1%

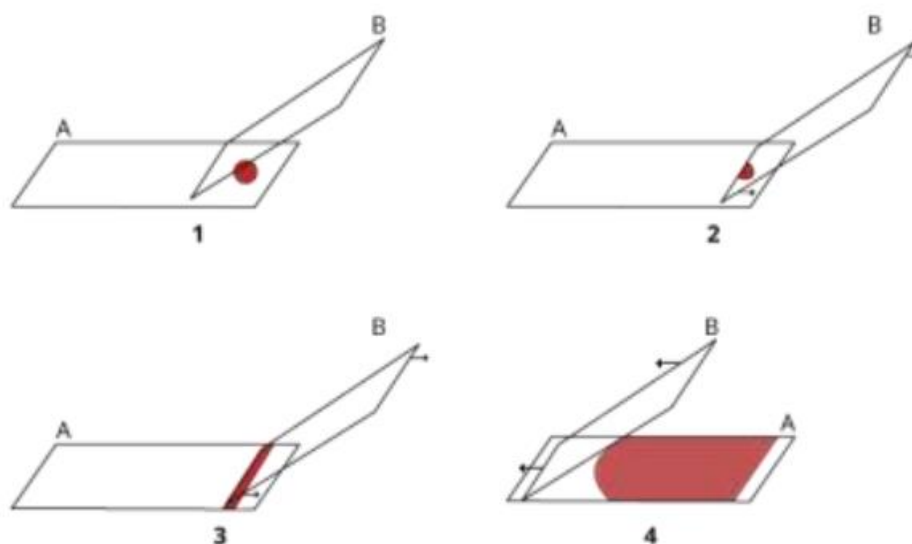
6 – Příprava vzorku

Manipulujte se vzorky dle laboratorních norem.

Zkumavku se vzorkem promíchejte pomalou inverzí. Na zkumavku nasadte kapátko a na sklíčko dejte kapku krve. Druhým sklíčkem, v úhlu 45°, nejprve nechte kapku kapilárně rozšířit na šířku sklíčka, pak sklíčkem protáhněte krev podél dolního sklíčka.

Dobrý nátěr nesahá na konec sklíčka, je postupně tenčí a na konci roztřepený.

Před barvením nechte nátěr uschnout.



Pozn.: Pokud nemáte k dispozici kapátko na zkumavky, zkumavku se vzorkem otevřete a použijte pipetu.

Manuální nátěr kostní dřeně

Pipetou dejte malou část vzorku na sklíčko. Odsajte přebytečnou krev a zbylé hromádky překryjte druhým sklíčkem. Posunováním horního sklíčka se ztenčí a rozetře vrstva buněk. Po rozetření vzorku odstraňte vrchní sklíčko a nechte vzorek uschnout.

7 – Příprava reagensů a nástrojů

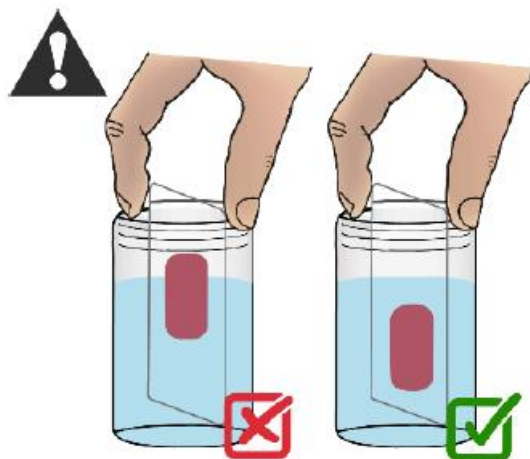
Dle níže uvedených protokolů naředte May-Grünwald a Giemsa roztoky a nalejte je do barvicích nádob.

Kyselá voda: 5 kapek v 100 ml destilované vody

5% vodný roztok hyposulfátu sodného: 5 g hyposulfátu sodného v 100 ml destilované vody

8 – Protokoly

Níže uvedené protokoly sestávají z postupných máčení sklíček v nádobách s různými barvicími roztoky. Čas zohledňuje pouze dobu ponoření v reagentii.



Pozn.: U metody barvení v lázni naplňte každou nádobu vhodným činidlem v dostatečném objemu, aby zakryly stěry Při ponoření sklíčka nezapomeňte zakrýt celý vzorek, viz výše.



U metody krycího barvení umístěte sklíčko na stojan s fixovaným stěrem nahoře.

Hematologické vzorky – manuální barvení v lázni – manuální mikroskopická analýza

Délka barvení: 14 minut 10 sekund

Kroky	Reagencie	Čas [min:s]	Instrukce
Fixace a předbarvení	May-Grünwald roztok	03:00	Nejsou
Opláchnutí	Pufř	01:00	
Barvení	1/20 Giemsa R roztok ředěný v pufřu	10:00	
Opláchnutí	Pufř	00:10	Opakovaně pohybujte se vzorky v nádobě
Schnutí	-	≥03:00	-

Hematologické vzorky – manuální barvení krycí – manuální mikroskopická analýza

Délka barvení: 14 minut 10 sekund

Kroky	Reagencie	Čas [min:s]	Instrukce
Oprava předbarvení	a 1 ml May-Grünwald roztoku	03:00	Zakrytí sklíčka
Opláchnutí	1 ml pufru	01:00	Přidávejte opatrně a míchejte bez vylití. Na konci odpočtu odeberte čínidlo.
Barvení	1/30 Giemsa R roztok ředěný v pufru	10:00	Zakryjte sklíčko. Na konci odpočtu odeberte čínidlo.
Opláchnutí	Pufr	00:10	Oplachujte rychle. Může být použita i vodovodní voda.
Schnutí	-	≥03:00	-

Histologické vzorky – manuální barvení v lázni – manuální mikroskopická analýza

Délka barvení: 65 minut

Kroky	Reagencie	Čas [min:s]	Instrukce
Barvení	Lugol PVP-stabilizovaný roztok	05:00	*
Barvení	5% vodný roztok hyposulfátu sodného	05:00	Nejsou
Opláchnutí	Destilovaná voda	-	Nejsou
Barvení	1/5 roztok May-Grünwald s destilovanou vodou	15:00	V autoklávu při 37°C
Barvení	Giemsa L (3 kapky v 2 ml destilované vody)	40:00	
Opláchnutí	Destilovaná voda	-	-
Diferenciace	Kyselá voda (5 kapek v 100 ml)	-	-
Opláchnutí	Destilovaná voda	-	Poté vysušte na filtračním papíru
Dehydratace	Etanol/acetón 50/50 směs	-	-
Dehydratace	Toluene nebo xylene	-	2 koupele
Preparát	Preparát na bázi toluenu nebo xylenu	.	-

* Odstraňte vosk a hydratujte histologický vzorek v příslušných reagentech před barvením.

Výběr pufru:

Kvalita a reprodukovatelnost barvení je ovlivněna použitým pufrem. Výběr pH pufru závisí na zvyklostí laboratoře. Jsou dostupné pufrы o pH 6,8, 7,0 a 7,2. Jsou k dispozici již ředěné, nebo jako lyofilizát. Pro rozpouštění pufru nepoužívejte tekoucí vodu – může způsobit nepředvídatelné a nejednotné barvicí výsledky.

Pufrы specifické pro hematologii jsou bezpečné pro personál, jsou vyrobeny s fosfáty a zvyšují stabilitu a omyvatelnost.

9 – Předpokládané výsledky

Hematologické vzorky		Histologické vzorky	
Chromatin / Nuclei	± sytě fialová	Chromatin / Nuclei	Fialová až růžová
Granulocyty cytoplazma bez RNA	Světle fialovo-růžová	Bazofilní cytoplazma	Nebesky modrá až tmavě modrá
Granulocyty eosinofilní granula	Oranžovo-růžové	Acidofilní cytoplazma	Světle červená až narůžovělá
Granulocyty basofilní granula	Tmavě modrá	Polychromatofilní cytoplazma	Našedlá nebo nafialovělá
Granulocyty neutrofilní granula	Tmavě fialovo-růžová	Acidofilní leukocyty granulace	naoranžovělá
Lymfocyty cytoplazma s RNA	Čistě modrá	Neutrofilní leukocyty granulace	Špinavá hnědo-růžová
Lymfocyty cytoplazma bez RNA	Světle modrá	Basofilní leukocyty granulace	Tmavě fialková
Lymfocyty azurofilní granula	Červená	Azurofilní leukocyty granulace	Fialová nebo nafialovělá
Monocyty cytoplazma	Fialovo-modrá	Bazofilní erytrocyty granulace	Kobaltově modrá
Erytrocyty	Růžovo-běžová až běžovo-šedá		
Destičky chromomer	Fialovo-červená		
Destičky hyalomer	Namodralá		
Krevní parazit nukleus	Červená		
Krevní parazit cytoplazma	Modrá		

Pokud se výsledky liší od předpokladu, kontaktujte prosím výrobce nebo jeho zástupce.

10 - Charakteristika

Analytická validita reagensů je založena na vědecké, odborně recenzované literatuře, prokázána pravidelným hodnocením klinického výkonu v rámci sledování účinnosti a zaručena CE certifikací. Pro optimální výsledky používejte čisté a suché laboratorní příslušenství. Laboratoř je zodpovědná za kontaktování výrobce nebo jeho zástupce při jakékoliv závažné příhodě.

Pokud se vzhled výrobku liší od výše uvedeného popisu, nepoužívejte je a obraťte se na výrobce nebo jeho zástupce.

11 – Kontrola kvality

Uživatelé jsou zodpovědní za provedení kontroly kvality, její procedury a návaznosti s příslušnými laboratorními řády.

Hematologické vzorky:

Výrobce (RAL Diagnostics) doporučuje barvit čerstvě natřené vzorky s normálním počtem bílých krvinek a bez známých patologií při každé obnově reagensů a pro každý první barvicí cyklus dne. Tyto nátěry by měly být porovnány s kontrolními sklíčky, abyste zajistili konzistentní kvalitu výsledků.

Stabilita barvy:

Kvalita a reprodukovatelnost barvení závisí na správném použití produktů. Barvení dle výše uvedených doporučení je stabilní po dobu několik dní.

Pokud je potřeba skladovat nátěry několik měsíců až let, výrobce doporučuje zakrýt je krycím sklíčkem se správnou tekutinou a skladovat v prachotěsném obalu.

12 – Bezpečnostní údaje

Se všemi vzorky biologického původu by se mělo manipulovat jako s potenciálně infekčními. Likvidaci provádějte dle místních platných regulací.

Chemický a biologický odpad musí být shromážděn a likvidován registrovanými společnostmi. Bezpečnostní údaje jednotlivých reagensů naleznete v jejich příslušných bezpečnostních listech.

May-Grünwald roztok

H225: Vysoce hořlavá kapalina a páry.

H301+311+331: Toxická při požití, při styku s kůží a při vdechování.



H370: Způsobuje poškození orgánů.

P210: Chraňte před teplem, horkými povrchy, otevřeným ohněm, zdroji jiskření a ohně. Zákaz kouření.

P261: Zamezte vdechování výparů, mlhy, aerosolu, plynu.

P264: Po manipulaci si důkladně umyjte ruce.

P280: Používejte ochranné rukavice a oděv a ochranné brýle nebo obličejový štít.

P301+310: PŘI POŽITÍ: Okamžitě volejte lékařskou pomoc nebo Toxikologické středisko.

P308+311: Při expozici nebo podezření na ni: Volejte lékaře nebo toxikologické středisko.

Obsahuje CH3OH

Giemsa R roztok

H225: Vysoce hořlavá kapalina a páry.

H301+311+331: Toxická při požití, při styku s kůží a při vdechování.



H370: Způsobuje poškození orgánů.

P210: Chraňte před teplem, horkými povrchy, otevřeným ohněm, zdroji jiskření a ohně. Zákaz kouření.

P261: Zamezte vdechování výparů, mlhy, aerosolu, plynu.

P264: Po manipulaci si důkladně umyjte ruce.

P280: Používejte ochranné rukavice a oděv a ochranné brýle nebo obličejový štít.

P301+310: PŘI POŽITÍ: Okamžitě volejte lékařskou pomoc nebo Toxikologické středisko.

P308+311: Při expozici nebo podezření na ni: Volejte lékaře nebo toxikologické středisko.

Obsahuje CH3OH

Pufr pH=6,8, pH=7,0, pH=7,2

H317: Může vyvolat alergickou kožní reakci.

H412: Škodlivý pro vodní organismy s dlouhodobými následky.

P280: Používejte ochranné rukavice a oděv a ochranné brýle nebo obličejový štít.

P333+313: Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc.



Obsahuje 5-chloro-2-methyl-2H-isothiazol-3-jedna/2-methyl-2H-isothiazol-3-jedna

13 – Reference

DUHAMEL G., DUHAMEL E., *Cytologie hématologique, Les cellules pathologiques let II, Coloration au May-Grünwald Giemsa RAL, Biologiste et Praticien et Réactifs RAL*, 1984 et 1989.

Ecole Nationale de Chimie, *Coloration de Pappenheim, Présentation théorique des mécanismes cytochimiques des colorants neutres avec applications techniques détaillées, Journée du technicien biologiste*, mars 1980, p. 1-9.

GENTILHOMME O., TREILLE-RITOUET D., BRYON P-A., *Cytologie hématologique, Les cellules normales, Coloration au May-Grünwald Giemsa RAL, Réactifs R.A.L*, 1989.

LANGERON M., *Précis de microscopie*, Masson & Cie 6^{ème} éd., 1942, 587-591.

MATHIOT C., *Cytologie en hématologie, quelques aspects de la pathologie*. Biologiste, praticien et Réactifs RAL, 1979

SOCIETE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE (SFH), *Guides des bonnes pratiques des ponctions médullaires*, Juin 2003, VI.2

THEML H., *ATLAS de poche d'Hématologie, Médecine-Sciences Flammarion, p. 19-25, 2000*

Revize: 01_08_2024