

Metoda: Barvení dle Giemsy

Barbora Brumovská, 2. ročník

Školitelé: Petr Ferczadi DiS., Vladimíra Maxová DiS.

Metoda

Barvení dle Giemsy je barvení používané v histologii, hematologii, cytologii, bakteriologii a genetice. Svě jméno získalo po německém chemikovi a bakteriologovi Gustavu Giemsovi, který ho připravil pro průkaz parazitů způsobujících malárii.

Příprava vzorků a barvení

Histologické vzorky se musí ihned po odběru fixovat 4% pufrovaným formaldehydem, aby nedošlo k rozkladu tkáně. Po dokončení fixace se vzorky nejdříve odvodní. Odvodnění probíhá vzestupnou řadou lázní ethanolu – 70%, 80%, 96%, 96%. Následně se tkáň projasní pomocí acetonu a prosytí látkou rozpouštějící parafín, kterou je xylen. Posledním krokem je prosycení vzorku parafínem. Po dokončení celého procesu odvodnění, se vzorek zalije parafínem do bločku, který je pak možné krájet na mikrotomu na tenké řezy. Tyto řezy se natahují na podložní sklíčka. Aby bylo možné tkáňové řezy obarvit, musíme je odparafinovat, což probíhá opačným procesem oproti odvodnění.

U hematologických vzorků a cytologických nátěrů dochází pouze k fixaci vzorku alkoholem.

Před barvením musíme preparáty zbavit parafínu, aby barvy mohly proniknout do tkáně. Fixované nebo odparafinované preparáty ponoříme do roztoku Giemsy na dobu 40 minut. Po uplynutí této doby preparáty opláchneme v deionizované (destilované) vodě. Oplach provádíme v několika kyvetách, abychom omyli všechny zbytky barvy. Následně musíme vzorky diferencovat roztokem kyseliny octové, aby došlo k rozlišení buněčných struktur. Znovu opláchneme destilovanou vodou. Nakonec preparáty ponoříme do 70% a poté do 80% alkoholu, čímž zahájíme proces odvodnění.

Po obarvení preparátů je nutné vzorky opět odvodnit. Po odvodnění můžeme preparát montovat, aby mohl být prohlížen v mikroskopu. Sklíčko s preparátem opláchneme xylenem a pomocí montovacího média preparát uzavřeme krycím sklíčkem.

Po Giemsově barvení jsou jádra buněk zbarvena modře až fialově, cytoplazma růžově, granula eosinofilů červeně, granula neutrofilů jemně fialově, granula mastocytů tmavě modře. Krevní paraziti mají červeně zvýrazněná jádra. Při použití v bakteriologii jsou výsledky barvení například modré zvýraznění *Helicobacter pylori* nebo růžové zbarvení *Spirochaeta pallida*.

Princip

Roztok Giemsy je složen z několika barev. Obsahuje methylenovou modř, eosin a Azur B.

Principem metody je absorpce barviva organickými strukturami.

Uplatnění metody

V histologii se nejčastěji používá k barvení aspirátu kostní dřeně ze sternální nebo pánevní kosti a trepanobiopsií (váleček kostní dřeně). Také se často používá k barvení lymfatických uzlin. Dále jím může být prokázána přítomnost *Helicobacter pylori* ve sliznici žaludku.

Metoda nalézá uplatnění v hematologii, kde jsou pomocí něj barvené krevní nátěry, nátěry kostní dřeně nebo sternální punkce. Může být použito přímo barvení dle Giemsy nebo jeho modifikace May – Grünwald Giemsa nebo Giemsa – Romanowsky. Pomocí těchto vzorků mohou být zjištěny hematopatologické procesy a odhalena nádorová onemocnění krve.

Také se používá k průkazu Plasmodií, které způsobují malárii. V krvi prokazuje i přítomnost spirochéty *Treponema pallidum*, která je příčinou syfilis, nebo další krevní parazity.

V genetice se využívá ke zvýraznění chromozomů. Giemsov roztok se připojuje na místa DNA, kde jsou vazby adeninu s thyminem a tím tvoří G-pruhování, které se používá ke tvorbě karyogramů (chromozomových map).

Úskalí metody

Při používání této metody často nedochází k problémům. Pokud přeci jen nastane nějaké úskalí, pravděpodobně je způsobeno lidským faktorem, špatným odparafinováním nebo barvivem (například uplynutím doby jeho expirace).

Přístrojové vybavení

Tuto metodu lze provádět ručně, ale ve větších provozech se používají přístroje. K odparafinování nebo odvodnění se používá barvicí automat (má i tyto funkce), krájení bločků probíhá na mikrotomu, k barvení lze použít barvicí automat a montovací automat k montování.

Odběr a transport

U odběru materiálu pro histologické vyšetření lékař musí postupovat opatrně, jelikož odběr tkáně je pro pacienta náročný. Nejčastěji se zpracovávají punkční biopsie, excize a resekáty. Tyto vzorky se musí ihned po odběru fixovat. Fixace se provádí ponořením tkáně do fixační tekutiny, kterou je nejčastěji 4% pufovaný formaldehyd. Vzorky musí být vloženy do dostatečně velké nádoby s dostatečným množstvím fixační tekutiny.

U vzorků krve nebo kostní dřeně a cytologií se ihned po odběru připravuje nátěr na mikroskopické podložní sklíčko. Nátěr se nechá pár minut zaschnout a poté se fixuje 96% alkoholem. Rychlá fixace je nutná kvůli rozpadu buněk, které nepoškozené vydrží pouze 2–5 hodin. Další část dřeně se nechá srazit na Petriho misce a poté se fixuje ve zkumavce. Při odběru válečku kosti se celý váleček opět vloží do zkumavky s fixačním médiem.

Vzorky odebrané do formaldehydu se transportují a uchovávají při pokojové teplotě. Pro zachování struktury tkáně a optimálního barvení je důležité, aby byly tkáňové vzorky dostatečně zfixovány. Při transportu se nádoby se vzorky nesmí rozbít a samozřejmostí je, že musí být náležitě označeny. Pokud k rozbití nádob dojde, musí dojít k likvidaci materiálu (který v mnoha případech již znovu pro vyšetření nelze získat).

Nativní vzorky je nutné donést do laboratoře co nejrychleji po odběru a v laboratoři proběhne jejich okamžité zpracování.