

Metode barvanja biološkega materiala

(Nadaljevanje in konec)

BARVANJE PO PAPPENHEIMU

Metodo barvanja po May-Grünwald-Giemsu uporabljamo za standardno metodo barvanja v hematološki citodiagnostiki. Barvamo s kombinacijo kisljih in bazičnih barvil tako, da dobimo sočasno kontrastno sliko acidofilije in bazofilije posameznih celičnih elementov.

Princip:

Celice fiksiramo v metanolu, da se po dodatku vode ne spremenijo. Z barvilom po May-Grünwaldu obarvamo predvsem citoplazmo in bazofilne granulacije celic. Spiranje s pufrom omogoči disociacijo barvila in njegovo vezavo na celične sestavine. Z barvilom po Giemsi pa obarvamo predvsem celična jedra in acidofilne granulacije celic.

Reagenti:

1. Raztopina po May-Grünwaldu

Eozinat metilenskega modrila 1 g

Metanol 100 ml

Glicerol 50 ml

Barvilo raztopimo v glicerolu pri 60° C. Dodamo metanol, pustimo stati 24 ur in filtriramo.

2. Raztopina po Giemsi

3. Fosfatni pufer Ph 7,0—7,2.

Postopek:

V metanolu fiksiran razmaz biološkega materiala barvamo 3 minute z raztopino po May-Grünwaldu ter nanj učinkujemo s fosfatnim pufrom 1—3 minute, odlijemo in ga nato barvamo 15—20 minut z razredčeno raztopino po Giemsi (1 : 20). Preparat speremo s pufrom in ga posušimo na zraku.

Rezultat:

Celična jedra se obarvajo vijoličasto, nukleoli svetlo modro, citoplazma rožnato do modro, eozinofilne inkluzije rdeče rjavo, bazofilne inkluzije pa temno modro do črno.

BARVANJE PO PAPANICOLAOU

Metodo barvanja po Papanicolaou uporabljamo v ginekološki citodiagnostiki. Barvamo s kombinacijo kislih in bazičnih barvil.

Princip:

Razmaze fiksiramo v metanolu. Kjer uporabljamo za barvanje vodno raztopino hematoksilina, celice najprej rehidriramo z etanolom padajočih koncentracij, šele nato jih barvamo. S hematoksilinom obarvamo celična jedra, citoplazmo pa barvamo z barvilom Orange G in z barvilom EA (50, 36, 65 — odvisno od koncentracije eozina). Barvili, s katerima barvamo citoplazmo, uporabljamo v alkoholni raztopini, zato moramo celice pred barvanjem dehidrirati z etanolom naraščajočih koncentracij.

Reagenti:

1. Hematoksilin po Harrisu

Hematoksilin (krist.) 1 g

Absolutni alkohol 10 ml

Kalijev aluminijev sulfat 20 g

Destilirana voda 200 ml

HgO 0,5 g

Koncentrirana očetna kislina 8 ml

Hematoksilin raztopimo v absolutnem alkoholu. K-Al-sulfat raztopimo v vodi z blagim segrevanjem in dodamo raztopini hematoksilina. Mešanico kar hitro segrejemo do vrenja, takoj odstavimo od vira toplote in počasi dodamo HgO. Hitro ohladimo pod tekočo vodo in filtriramo. Dodamo 8 ml koncentrirane očetne kisline in hranimo v temni steklenici. Raztopina je obstojna 1—2 meseca. Pred vsako uporabo jo filtriramo in razredčimo z enakimi deli vode.

2. Raztopina HCl

1 ml koncentrirane solne kisline dodamo počasi k 100 ml vode.

3. Barvilo Orange G

Alkoholna raztopina Orange G 5 g/l 100 ml

Fosforvolframova kislina 0,015 g

4. Barvilo EA 36

Alkoholna raztopina svetlobnega zelenila (Lichtgrün) 1 g/l 45 ml

Alkoholna raztopina vezuvina (Bismarck-braun) 5 g/l 10 ml

Alkoholna raztopina rumenega eozina 5 g/l 45 ml

Fosforvolframova kislina 0,2 g

Vodna raztopina litijevega karbonata 2 g/l 1 kaplja

5. Etanol 0,95 l/l

6. Etanol 0,80 l/l

7. Etanol 0,70 l/l

8. Etanol 0,50 l/l

9. Absolutni alkohol

10. Ksilol

Postopek :

Razmaz fiksiramo najmanj 15 minut v metanolu in ga rehidriramo po vrsti v 0,80, 0,70, 0,50 l/l etanolu in v destilirani vodi s po 15-sekundnim namakanjem. Nato ga barvamo 5 minut z raztopino hematoksilina, presežek barvila pa odstranimo najprej s tekočo vodo, nato še z raztopino solne kisline. Pri tem preide rdeče rjava barva hematoksilina v modro barvo. Razmaz dehidriramo po vrsti v 0,70, 0,80, 0,95 l/l etanolu vsakič po 15 sekund. Sedaj preparat barvamo 2 minuti z barvilom Orange G, preparat speremo v dveh posodah po vrsti s koncentriranim etanolom, ga barvamo 2 minuti z barvilom EA, spiramo 1 minuto v absolutnem alkoholu, 1 minuto v mešanici enakih delov absolutnega alkohola in ksilola, nazadnje pa še hitro namočimo v ksilol. Razmaz posušimo na zraku.

Rezultat :

Jedra se obarvajo vijoličasto do modro, eozinofilna citoplazma rožnato do rdeče, bazofilna citoplazma svetlo modro do zeleno modro, citoplazemski keratin pa rumeno.

BARVANJE CITOMEGALIČNIH INKLUZIJSKIH CELIC V URINSKEM SEDIMENTU

Citomegalični virus povzroči spremembo ledvičnih epitelnih celic in te za citomegalijo značilne inkluzijske celice (celice »ptičjega« ali »sovjega« očesa), ki se izplavljajo z urinom, lahko mikroskopsko identificiramo v razmazu urinskega sedimenta z barvanjem ob kombinaciji kislega in bazičnega barvila.

Reagenti :

1. Hematoksilin po Mayerju

Hematoksilin (krist.) 1 g

Koncentriran etanol 10 ml

K-Al-sulfat 50 g

Destilirana voda 950 ml

Hematoksilin raztopimo v etanolu. K-Al-sulfat raztopimo v destilirani vodi. Raztopini K-Al-sulfata dodamo raztopino hematoksilina in dobro premešamo. Barvilo pustimo zoreti 3 mesece na svetlobi v svetli, z gazo pokriti steklenici. Pred vsako uporabo ga filtriramo.

2. Vodna raztopina eozina

1 g rumenega eozina raztopimo v 100 ml destilirane vode. Barvilo je obstojno 14 dni.

3. Mešanica enakih delov absolutnega alkohola in etra (pripravimo jo pred vsako uporabo sproti).

Postopek :

Svež urin centrifugiramo 5 minut pri 500 obratih na minuto in odlijemo tekočino nad sedimentom. Sediment fiksiramo s kapljama mešanice enakih delov absolutnega alkohola in etra ter dobro premešamo. Razmažemo ga na objektno steklo in ga posušimo na zraku. Razmaz barvamo 5—8 minut z vodno raztopino eozina, ga dvakrat speremo z destilirano vodo, barvamo 15—18 minut z raztopino hematoksilina in ponovno speremo z vodo. Preparat posušimo na zraku in ga mikroskopsko pregledamo z emerzijo.

Rezultat:

Izrazimo kot pozitiven, če najdemo v obarvanem razmazu urinskega sedimenta značilne citomegalične inkluzijske celice. To so celice različnih velikosti z močno povečanim, ekscentrično ležečim jedrom (5—10-krat večjim od jedra epitelnih celic, ki niso okužene z virusom). Jedro izpolnjuje acidofilna ali bazofilna, okrogla ali ovalna inkluzija, ki jo obdaja svetel neobarvna pas, tako da imajo celice videz ptičjega ali sovjega očesa. Jedrni kromatin je zrnat, bazofilen in se neenakomerno kopiči na notranji strani jedrske membrane, ki je zato ponekod zadebeljena.

BARVANJE URINSKEGA SEDIMENTA PO STERNHEIMERJU IN MALBINU

Metodo barvanja levkocitov v urinskem sedimentu po Sternheimerju in Malbinu uporabljamo za diagnostično potrditev pielonefritisa. Pri nezdravljenem pielonefritisu lahko najdemo v urinskem sedimentu večje število degeneriranih levkocitov, tako imenovanih Sternheimer-Malbinovih celic (»glitter celic«).

Reagenti:

1. Raztopina metilvijoličnega barvila

Metilviolet (gentiana violet) 3 g

Koncentriran etanol 20 ml

Amonijev oksalat 0,8 g

Destilirana voda 80 ml

2. Raztopina safranina

Safranin O 0,25 g

Koncentriran etanol 10 ml

Destilirana voda 100 ml

3. Delovna raztopina barvila

Zmešamo 3 dele raztopine 1. in 97 delov raztopine 2. ter filtriramo. Raztopina je obstojna približno 3 mesece.

Postopek:

Svež, pravkar izločen urin centrifugiramo in odlijemo od sedimenta. Sedimentu dodamo kapljico delovne raztopine barvila, dobro premešamo, prenesemo kapljo sedimenta na objektno steklo, pokrijemo s krovnim steklom in takoj mikroskopiramo pod največjo suho povečavo. Diferenciramo in preštajemo najmanj 200 levkocitov.

Rezultat:

V sedimentu lahko opazimo dve vrsti levkocitov:

a) Levkocite normalne velikosti z rdeče do vijoličasto obarvano citoplazmo, temno rdečimi jedri in zelo temno rdečimi, skoraj črnimi granulami.

b) Levkocite z nežno modro obarvano, kot steklo prozorno citoplazmo, ki so lahko normalne velikosti ali pa nabrekli in povečani, skoraj dvakrat večji od normalnih levkocitov. Plazma je pogosto vakuolizirana in rjavo granulirana, opazimo lahko Brownovo molekularno gibanje granul. Jedra so segmentirana ali multipla. Ta vrsta levkocitov so tako imenovane Sternheimer-Malbinove celice.

Eritrociti se skoraj ne obarvajo. Epitelne celice sečnih poti se prav tako ne obarvajo ali pa se obarvajo nežno modro, vaginalne epitelne celice se obarvajo

