Die Theorie des Färbeprotokolls der Sysmex SP-Serie

Einleitung

Abb. 1: SYSMEX SP-1000i

Die Färbung von Blutausstrichen ist in medizinischen Laboratorien ein bekanntes Verfahren. Die klinische Relevanz dieser Analyse und ihre Interpretation ist sehr hoch. Im Allgemeinen werden Blutausstriche mit Romanowsky-Farbstoffen gefärbt, die aus einer Reihe von Thiazinen und Eosinen bestehen. Eine hämatologische Färbung hat die Funktion, Einzelzellen, ihre Kerndetails und ihre zytoplasmatische Struktur für eine mikroskopische Untersuchung klar zu definieren. Im Jahre 1910 synthetisierte Paul Ehrlich einen Farbstoff zur Verwendung als Differentialblutbildfarbstoff. Seiner Originalmischung waren die Arbeiten von Romanovsky (1891) vorausgegangen.Zwischen 1889 und 1901 modifizierten bereits andere Wissenschaftler den Romanovsky-Farbstoff und heute stehen uns mehrere Färbemethoden zur Verfügung, die Romanovsky-Farbstoffe verwenden – wie z. B. die May-Grünwald-Giemsa-, Wright-, Wright-Giemsa- und Leishman-Färbemethoden. Diese Färbemethoden können mit dem automatischen Ausstrichsystem SYSMEX SP-1000i eingesetzt werden. Dieser Artikel beschreibt hauptsächlich die Verwendung der May-Grünwald-Giemsa-Färbemethode mit dem SP-1000i.

Blutzellen

Blut ist ein Stoff, der aus drei Hauptklassen von Blutzellen besteht: Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Die Leukozyten sind in verschiedene Zellklassen unterteilt, diese lassen sich je nach Plasma und Kernmorphologie mit den May-Grünwald- und Giemsa-Farbstoffen unterschiedlich anfärben.

Verschiedene Arten von Granulozyten speichern unterschiedliche Substanzen und werden auf der Grundlage der Färbeeigenschaften ihrer spezifischen Granulagehalte unterklassifiziert. Eosinophile Granula binden saure Farbstoffe, wie z. B. Eosin. Basophile Granula binden basische Farbstoffe. Neutrophile Granula binden keinen der beiden Farbstofftypen gut, aber Neutrophile haben viele Lysosome, die sich rotviolett färben und »azurophile Granula« genannt werden. Diese Granulozytenarten sind alle von ungefähr gleicher Größe und jede hat einen unregelmäßig geformten, vielfach segmentierten Kern. Mononukleäre Leukozyten dagegen haben einen runden oder leicht eingedrückten Kern. Diese aus Lymphozyten und Monozyten bestehende Gruppe zeigt eine langsamere, aber dafür stärkere Affinität zum Farbstoff als die Granulozyten.

Die May-Grünwald-Lösung:

Die May-Grünwald-Lösung besteht aus einer Mischung von mit Eosin angesäuertem Methylenblau und Methanol. Gelegentlich wird sie mit der Giemsa-Färbung kombiniert und als Pappenheim-Färbung (»May-Grünwald-Giemsa-Färbung«) bezeichnet.

- Färbeverhalten

Die Intensität der Färbung hängt von der genauen Zusammensetzung der May-Grünwald-Lösung ab. Die May-Grünwald-Färbung ist aufgrund ihrer pH-abhängigen Farbgebung besonders für die Anfärbung von Granula geeignet. Basophile Granula erscheinen im lichtmikroskopischen Bild durch die Anfärbung mit Methylenblau tiefblau bis violett, während saure Granula Eosin anreichern und damit leuchtend rot erscheinen. Neutrale Granula weisen nach Färbung einen hell- bis purpurroten, blassen Farbton auf. Das Zytoplasma von Erythrozyten wird durch die May-Grünwald-Lösung hellrot, das der Thrombozyten leicht bläulich. Die May-Grünwald-Färbung bietet auf diese Weise vor allem Differenzierungsmöglichkeiten der einzelnen Blutzellen.

Die Giemsa-Färbung:

Die Giemsa-Färbung ist eine nach der Romanowsky-Färbung modifizierte Differentialfärbung für methanolfixierte Blut- und Knochenmarkausstriche sowie zytologisches Material. Die Giemsa-Lösung besteht aus einer Mischung der Farbstoffe Azur A-Eosinat, Azur B-Eosinat, Methylenblau-Eosinat und Methylenblauchlorid, in einer Mischung aus Methylalkohol mit Glycerin als Stabilisator. Sie wird deshalb auch kurz als Azur-Eosin-Methylenblaulösung bezeichnet.

- Färbeverhalten

Die Intensität der Färbung hängt von der genauen Zusammensetzung der Giemsa-Lösung ab. Zellkerne erscheinen in gefärbten Ausstrichen durch eine Komplexbildung der Farbstoffe mit der Desoxyribonukleinsäure purpurrot. Das Zytoplasma wird meist bläulich dargestellt. Parasitenkerne erscheinen ebenfalls leuchtend rot. Das Färberesultat kann jedoch deutliche Unterschiede aufweisen. Es wird unter anderem durch den pH-Wert der Lösung und der Pufferlösung, die Puffersubstanzen, die Färbezeit und die Art der Fixierung beeinflusst.

May-Grünwald-Giemsa-Färbung

Spezifische Mischungen wurden nach ihren Urhebern benannt, wie z. B. Wright, Giemsa oder May-Grünwald. Diese Farbstoffe beinhalten einen basischen Farbstoff (mit positiver Ladung), wie z. B. Methylenblau, und einen anionischen Farbstoff (mit negativer Ladung), wie z. B. Eosin. Methylenblau verbindet sich mit negativ geladenen Bestandteilen in den Zellen, wie z. B. Nukleinsäure in Kernen und Ribosomen, und gibt ihnen eine blaue bis violette Farbe. Eosin verbindet sich mit positiv geladenen Bestandteilen, wie z. B. zytoplasmatischen Proteinen, was ihnen eine rosa bis rote Farbe verleiht. Eine gemischte rot-blaue Färbung wird als »Azur« bezeichnet.

Betrachtet man einen Ausstrich, wie er sich nach der Fixierung darstellt, so ist nur wenig zu sehen, da alle Zellen sehr transparent sind. Die Erythrozyten sind schwach sichtbar, aber die Leukozyten sind zu blass, fast unsichtbar, und in ihrem Inneren ist nichts zu erkennen. Um die verschiedenen Arten von Leukozyten betrachten und erkennen zu können, ist eine Anfärbung notwendig. Für diesen Zweck wird normalerweise die May-Grünwald-Giemsa-Färbung verwendet. Sie ist eine Mischung aus Farbstoffen auf der Basis von Methylenblau und Eosin. Der Farbstoff besteht aus einer konzentrierten Lösung, die mit einer Pufferlösung (pH = 6,8) verdünnt wird.

Verfahrensprinzip:

Ein neutraler Farbstoff ist im Wesentlichen eine Kombination aus verschiedenen Farbstoffmolekülen, welche aus sauren und basischen chromophoren Gruppen, die in einer alkoholischen Lösung ionisch gebunden sind, bestehen. Zytoplasmastrukturen weisen unterschiedliche Affinitäten zu den chromophoren Gruppen auf, basierend auf den Wechselwirkungen der Gruppen entsprechend ihrer Ladung. Alkoholische Lösungen aus kombinierten Farbstoffen färben schlecht; hingegen färben wässrige Lösungen von Farbstoffen recht gut. Diese Situation lässt sich umgehen, indem eine Pufferlösung mit dem korrekten pH-Wert verwendet wird.

Da eine alkoholische Lösung alle erforderlichen Farben an die Zelloberflächen bringen kann, trennt und hydriert ein Puffer mit dem korrekten pH-Wert die Chromophoren, um die Permeabilität der Zelloberflächen zu erhöhen. Haben die unterschiedlichen Schritte der Färbung stattgefunden, ist es eine Funktion der Spülung, den Färbeprozess anzuhalten und einen möglicherweise während des Pufferprozesses angesammelten Niederschlag zu entfernen.

May-Grünwald- und Giemsa-Färbung mit der SYSMEX SP-Serie

Die May-Grünwald-Giemsa-Färbemethode ist das in Europa am meisten verbreitete Verfahren zur Einfärbung von Blutausstrichen mit der SP-Serie.

Jeder Objektträger wird separat in einer speziellen Färbekassette gefärbt, um ein optimales und standardisiertes Färbeergebnis zu erhalten. Die standardisierte May-Grünwald-Giemsa-Färbung wird mit der SP-Serie folgendermaßen durchgeführt:

Schritt 1: May-Grünwald (Methanol)
Schritt 2: Unverdünnter May-Grünwald-Farbstoff
Schritt 3: May-Grünwald verdünnt 1 : 10 mit Phosphatpuffer pH 6,8
Schritt 4: Giemsa verdünnt 1 : 25 mit Phosphatpuffer pH 6,8
Schritt 5: 4 x Spülen mit SP-Rinse-Lösung
Schritt 6: Trocknung des Objektträgers

Das Färbeverfahren mit der SYSMEX SP-Serie ist eine standardisierte Methode, d.h. Schwankungen in den Färbeergebnissen werden auf ein Minimum reduziert. In einigen Fällen ist es nötig, das Färbeprotokoll den spezifischen Färbezeiten des Labors anzupassen. Es ist demnach wichtig zu wissen, welche Einstellung für das bestmögliche Färbeprotokoll erforderlich ist.

Reaktionsmechanismus der May-Grünwald-Giemsa-Farbstoffe:

May-Grünwald und Giemsa haben eine unterschiedliche Farbstoffkonzentration und -zusammensetzung.

May-Grünwald enthält Methylenblau, Eosin und Methanol.

- Methylenblau ist eine basische Thiazinfarbe mit positiver Ladung und färbt Säuren wie DNA, RNA und Proteine in einem Blauton. Basische Bestandteile von Granulozyten werden in verschiedenen Farben oder einem violetten Ton gefärbt.
- Eosin ist ein saurer Farbstoff mit positiver Ladung und färbt die basischen Bestandteile der Zellen. Er färbt speziell das Hämoglobin und basophile Granula in einem rot/orange Farbton.
- Methanol fixiert die Blutzellen auf dem Blutausstrich.

Giemsa enthält Methylenblau, Eosin und Azur B.

- Azur B ist eine basische Thiazinfarbe und bewirkt mit Methylenblau eine Oxidationsreaktion.

Damit wird primär das Kernchromatin sowie die azurblauen Granula violett/rot gefärbt. Die Reaktion bezeichnet man als »Romanowsky-Effekt«.

Die Kombination Methylenblau/Eosin ergibt eine fettlösliche neutrale Farbe und färbt die Granula der Neutrophilen rötlich-braun oder violett.

Farbstoff			Zellen	
Färbung	Farbe	Reaktion	Reaktion	Zellbestandteile
Methylenblau	Blau	Basisch	Sauer (Basophil)	Zytoplasma RNA
				Kern DNA
Eosin	Orange-rot	Sauer	Basisch Azidische	Hämoglobin
			Oxidation	Granula
			oder Eosinophile	Eosinophile
Azur	Violett	Basisch	Sauer	Kern DNA Primäre
			Metachromatisch	Granula Neutrophile

Abb. 3: *Färbung der Zellbestandteile*

Die Chromatinstruktur des Zellkerns besteht zumeist aus DNA und färbt sich mit den basischen Farbstoffbestandteilen und auch mit Azur metachromatisch zu einer dunkelvioletten Farbe. Der Kern färbt sich mit Methylenblau und Azur B metachromatisch (grau-violett). Zellen, die reifen können, haben auch viel RNA im Zytoplasma; diese Zellen synthetisieren Proteine, und daher wird das Zytoplasma dunkelblau gefärbt (stark basophil). Während der Reifung verlieren die Zellen ihren basophilen Charakter und das Zytoplasma wird dann polychromatisch gefärbt.

Die Granula im Zytoplasma können sich unterschiedlich färben: Basophile Granula haben saure Bestandteile und färben sich dunkelblau mit dem basischen Farbstoffbestandteil. Eosinophile oder azidophile Granula haben basische Bestandteile und werden mit Eosin (sauer) orange-rot gefärbt. Die Granula im Zytoplasma der Neutrophilen sind bei der panoptischen Färbung schwach azidophil und werden mit Eosin orange-rot gefärbt. Die sogenannten Azur-Granula haben saure Bestandteile und werden mit dem Azur B-Farbstoff rot-violett eingefärbt, während der Farbstoff blau ist.

Der Einfluss des Puffer-pH-Wertes

Phosphatpuffer wird zur Blutausstrichfärbung benötigt, um reproduzierbare Färbeergebnisse zu erhalten. Der Puffer ist notwendig, um Verdünnungen der May-Grünwald- und Giemsa-Farblösung herzustellen.

- Ein Puffer mit einem pH-Wert von 6,4 ergibt hell-orange gefärbte Erythrozyten und rot-violett gefärbte Zellen mit Kernen.
- Ein Puffer mit einem pH-Wert von 6,8 ergibt orange-rot gefärbte Erythrozyten und intensiver rot-violett gefärbte Zellen mit Kernen.
- Der Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 ergibt gräulich gefärbte Erythrozyten und noch intensiver rot-violett gefärbte Zellen mit Kernen.

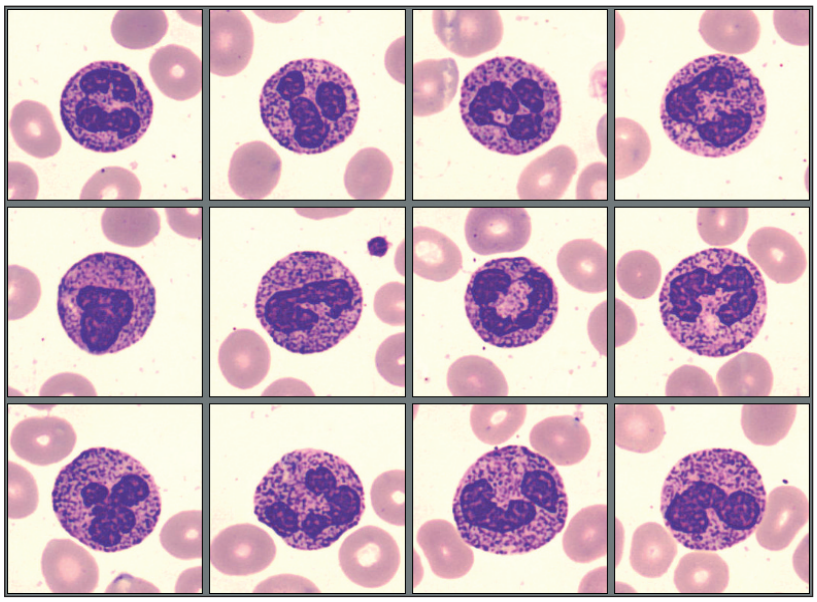

Abb. 4: *Schlechtes Färbeergebnis der Granula des Kernes und der Erythrozyten durch eine zu lange Giemsa-Färbung und zu hohem ph-Wert des Puffers*

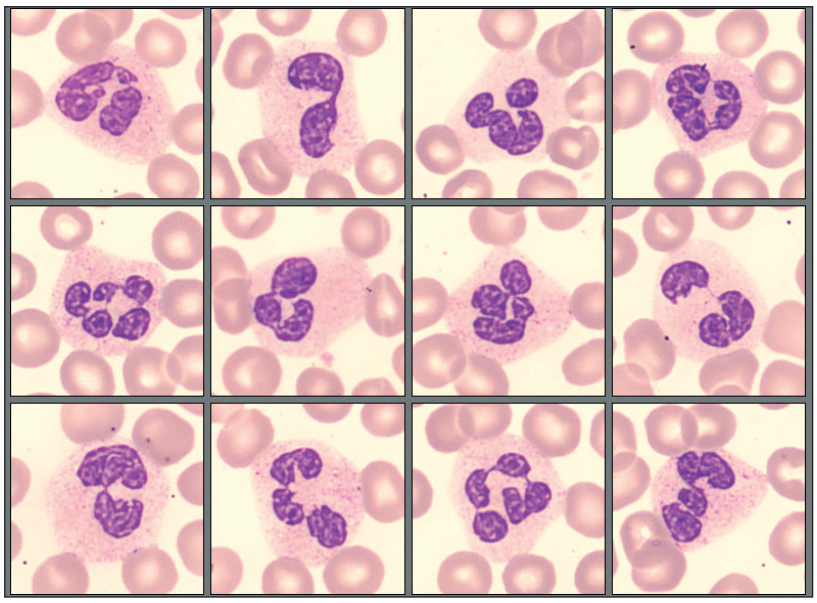

Abb. 5: Optimales Färbeergebnis durch Berücksichtigung der Färbezeit und ph-Wertes des Puffers

Es wird empfohlen, einen Puffer-pH-Wert von 6,8 für die beste Darstellung der Kerne und zur orange-roten Darstellung der roten Blutkörperchen zu verwenden.

Einstellung der SP-Serie auf ein optimales Färbeprotokoll.

Durch Änderung der Färbezeiten in den verschiedenen Schritten ist es möglich, die Endergebnisse der Färbung zu beeinflussen. Vor einer Änderung des Färbeprotokolls ist sicherzustellen, dass frische Reagenzien verwendet werden.

Zunächst wird der korrekte pH-Wert des zur Verdünnung der May-Grünwald- und Giemsa-Farbstoffreagenzien verwendeten Puffers gewählt. Der optimale pH-Wert des Puffers beträgt 6,8.
Das am häufigsten verwendete May-Grünwald-Giemsa-Färbeprotokoll ist wie folgt in der SP-Serie:

Vorfixierung des Blutes mit May-Grünwald (Methanol):	30 Sekunden
May-Grünwald-Farbstoff konzentriert:	3 Minuten
May-Grünwald-Verdünnung (1:10)	3 Minuten
Giemsa-Verdünnung (1:25)	8 Minuten
Waschzyklus mit Spülung	4 mal
Trocknung des Objektträgers nach der Färbung	10 Minuten

Durch Änderung der Färbezeiten in den verschiedenen Schritten ist es möglich, die Endergebnisse der Färbung zu beeinflussen. Vor einer Änderung des Färbeprotokolls ist sicherzustellen, dass frische Reagenzien verwendet werden. Zunächst wird der korrekte pH-Wert des zur Verdünnung der May-Grünwald- und Giemsa-Farbstoffreagenzien verwendeten Puffers gewählt. Der optimale pH-Wert des Puffers beträgt 6,8. Das am häufigsten verwendete May-Grünwald-Giemsa-Färbeprotokoll ist wie folgt in der SP-Serie:

Vorfixierung des Blutes mit May-Grünwald (Methanol):	30 Sekunden
May-Grünwald-Farbstoff konzentriert:	3 Minuten
May-Grünwald-Verdünnung (1:10)	3 Minuten
Giemsa-Verdünnung (1:25)	8 Minuten
Waschzyklus mit Spülung	4 mal
Trocknung des Objektträgers nach der Färbung	10 Minuten

Ist das Färbeergebnis mit dem oben beschriebenen Färbeprotokoll nicht ausreichend, beginnen Sie Änderungen am Protokoll vorzunehmen. Zur Änderung des Protokolls ändern Sie immer nur eine Einstellung und nehmen größere Änderungen an der Färbezeit vor. Das heißt: Wird die Giemsa-Färbezeit von 8 auf 9 Minuten geändert, ist es schwierig, die Veränderungen dieser Einstellung im Färbeergebnis zu erkennen. Wird die Giemsa-Färbezeit von 8 auf 15 Minuten verändert, kann die Intensität der Färbeergebnisse direkt festgestellt werden. Auf diese Weise ist es möglich, zu beurteilen, ob die vorgenommene Änderung in die richtige Richtung geht. Nun ist es möglich, kleinere Schritte in den Färbezeiten einzustellen, um die richtige Färbemethode zu erhalten. Ändern Sie nie mehr als einen Bestandteil des Färbeprotokolls. Mehrere gleichzeitige Änderungen führen nur zu größerer Verwirrung.

Eine goldene, aber einfache Regel zur Änderung des Färbeprotokolls der SP-Serie lautet wie folgt: *May-Grünwald färbt hauptsächlich die basischen Bestandteile, Giemsa hauptsächlich die sauren Bestandteile des Zytoplasmas.*

Mit dieser Regel wird die Einstellung der automatischen Blutausstrich-Systeme viel einfacher.

SYSMEX DEUTSCHLAND GMBH
Bornbarch 1, 22848 Norderstedt, Germany
Phone +49 (40) 534102-0 · Fax +49 (40) 5232302
www.sysmex.de