



## BARVENÍ RETIKULOCYTŮ

(Postup č. R 4132)

SIGMA-ALDRICH®

### POUŽITÍ

Retikulocytové barvení je určeno k identifikaci retikulocytů v krevních filmech. Reagencie retikulového barviva jsou určeny k "diagnostice in vitro."

V roce 1949 představil Brecher novou methylenovou modřící metodu k identifikaci retikulocytů založenou na srážení ribosomální RNA pomocí kationtového barviva. Ta je nyní nahrazena jinou metodou a je uznávaným postupem pro kvantifikaci retikulocytů v periferní krvi.<sup>2</sup>

Sigma-Aldrich vyrábí stabilní roztok pro barvení retikulocytů v krevních filmech. Krev a roztok na barvení retikulocytů se smíchají a krátce inkubují při pokojové teplotě. Klínové nebo propojené stěry jsou dány na mikroskopická sklíčka, suší se na vzduchu a vyhodnocují se v olejové imerzi pod světelným mikroskopem. Pozitivně vyhodnocené krvinky mají dvě nebo více modře zbarvených zrníček.

### REAGENCIE

**BARVIVO PRO RETIKULOCYTY**, katalogové č. R 4132

Nová methylenová modř, 1 % (w/v), chloride sodný, 0,9 % (w/v) a oxalate draselný, 1,6 % (w/v).

#### ULOŽENÍ A STABILITA:

Skladujte barvivo pro retikulocyty při pokojové teplotě (18-26 °C). Reagencie jsou stabilní do data použitelnosti.

#### PŘÍPRAVA:

Barvivo pro retikulocyty se dodává připravené k okamžitému použití.

#### BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ:

Je třeba dodržovat běžná bezpečnostní opatření při manipulaci s laboratorními reagenty. Odpad likvidujte v souladu se všemi místními, státními a oblastními předpisy. Viz Bezpečnostní list k materiálu, který uvádí aktuální informace o riziku, nebezpečí a bezpečnosti.

EU Prohlášení o rizicích a bezpečnosti (Upozornění: Látka ještě nebyla zcela otestovaná) Reagencie barvivo pro retikulocyty je DRÁŽDIVÉ. Dráždí oči, dýchací systém a pokožku. V případě kontaktu s očima, ihned promyjte velkým množstvím vody a vyhledejte lékařskou pomoc. Používejte vhodné ochranné oděvy.

### POSTUP

#### ODBĚR VZORKŮ:

Doporučuje se provádět odběr vzorků v souladu s dokumentem M29-A2 směrnice NCCLS. Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout úplné zajištění, že krevní vzorky nebo tkáň nebudou přenášet infekci. Proto všechny krevní deriváty nebo tkáňové vzorky by měly být považovány za potenciálně infekční.

Krev lze sbírat do standardních klinických laboratorních vakuovaných zkumavek. Vhodné jsou všechny běžné antikoagulanty (např. heparin, citrát a oxalát). Draselná sůl kyseliny etylendiamintetraoctové (K<sub>2</sub> EDTA) je nejvhodnější antikoagulant. Jestliže postup není proveden během 2-3 hodin od odběru, uchovávejte krev při 4 °C. Krev se musí zahřát na pokojovou teplotu a před použitím důkladně promíchat. Nedoporučuje se používat krev starší více než 24 hodin.

#### POTŘEBNÉ SPECIÁLNÍ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY:

Mikroskop  
Nástroj pro odběr krve nebo cytocentrifuga  
Skleněné zkumavky, 10x75 nebo 12x75 mm  
Laboratorní kapátka nebo Pasteurovy pipety  
Mikroskopická a krycí sklíčka

#### POZNÁMKY:

Doporučuje se, aby se s krevními stěry ze zdravých dárců zpracovávaly zároveň patientské vzorky jako normální kontroly.

V barvivo pro retikulocyty se může utvořit malá sraženina. Zjistíte-li sraženinu, přefiltrujte přes laboratorní filtrační papír.

Údaje získané z tohoto postupu slouží pouze jako diagnostická pomůcka a měly by se prověřit ve spojení s jinými klinickými diagnostickými testy nebo informacemi.

#### POSTUP:

1. Přidejte tři kapky dobře promíchané krve a dvě kapky retikulocytového barviva do skleněné zkumavky a dobře promíchejte. Nechejte ustát 10 minut při pokojové teplotě (18-26 °C).

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103USA 314-771-5765

Technické služby: 800-325-0250 nebo volejte na 314-771-3122

nebo e-mailujte na [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)

Objednávky: 800-325-0250 nebo volejte na 314-771-5750

[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

2. Obvyklým způsobem přípravy stěry a nechte je uschnout na vzduchu nejméně na 15 minut. Kontrastní barvení se nedoporučuje.
3. Přikryjte krycím sklíčkem a zkoumejte pod mikroskopem.

### CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

Obarvené krevní filmy se vyhodnocují subjektivně na přítomnost nebo nepřítomnost retikulocytů. Za retikulocyt je považována každá červená krvinka obsahující dva nebo více modře zbarvených částic.<sup>2</sup>

Použitím olejového objektivu 100x a okuláru 10x náhodně vyhledejte oblasti filmu, kde jsou červené krvinky blízko sebe, ale nedotýkají se ani se nepřekrývají. Spočítejte 1000 červenýchrvinek včetně retikulocytů. Podíl retikulocytů se vypočte následovně:

$$\text{Výpočet retikulocytů (\%)} = \frac{\text{Celkové množství retikulocytů}}{10}$$

Hodnoty normálního dospělého jedince  $1,0 \pm 0,5 \%$ .<sup>2</sup>

Vzhledem k variabilitě hematokritu, je potřeba provést korekci pozorovaného množství retikulocytů na normální hematokrit 45 %:

$$\text{Korigovaný výpočet retikulocytů (\%)} = \frac{\text{Pozorované množství} \times \text{naměřený hematokrit (\%)}}{45 \%$$

U normálních neanemických pacientů jsou retikulocyty prokázány v krevním oběhu čtvrtý den maturity následující po třech dnech maturity v dění. Faktory zvyšující tvorbu červenýchrvinek mohou zkrátit čas zrání kostní dřeně, avšak prodlouží dobu maturity krve. Velké změny výsledných počtů "změn" oběhu retikulocytů v krvi nesmí být započítávány při kvantifikaci retikulocytů jako důkaz tvorby červenýchrvinek.<sup>2,3</sup> Změny buněk lze detekovat pomocí filmu barveného Wrightovým barvivem<sup>3</sup> a stanovit produkční index retikulocytů<sup>2</sup> korigovaným výpočtem retikulocytů a hematokritu:

$$\text{Produkční index retikulocytů} = \frac{\text{korigovaný výpočet retikulocytů (\%)}}{\text{Očekávaná doba maturity (dnů)}}$$

S následujícím očekávaným časem maturity:

Počet dnů	Hematokrit
1	45 %
1,5	35 %
2	25 %
3	15 %

Produkční index retikulocytů větší nebo roven 3 je považován za normální, přičemž index menší než 2 je nižší než normální.<sup>2</sup>

Pokud se zjištěné výsledky liší od očekávaných, kontaktujte prosím technické služby společnosti Sigma-Aldrich za účelem konzultace.

### REFERENCE

1. Brecher G: New methylene blue as a reticulocyte stain. Am J Clin Pathol 19:895, 1949
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for Reticulocyte Counting, Proposed Standard. H16-P, Vol 5, No. 10, 1985
3. Perrotta AL, Finch CA: The polychromatophilic erythrocyte. Am J Clin Pathol 57:471, 1972

Sigma-Aldrich, Inc. garantuje, že její produkty se shodují s informacemi obsaženými v této a jiných publikacích Sigma-Aldrich. Kupující musí stanovit vhodnost produktu(ů) pro dané použití. Mohou platit dodatečné podmínky. Viz zadní strana faktury nebo útržek obalu, kde jsou uvedeny dodatky k prodejním podmínkám.

Postup č. R 4132  
Předchozí revize: 2003-03  
Revidováno: 2003-09



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham, TW20 9BD Velká Británie