

**Doporučení laboratorní sekce  
České hematologické společnosti ČLS JEP**

**Příprava a barvení nátěru periferní krve, aspirátu kostní  
dřeně a tělních tekutin, včetně kontrolní činnosti**

**Zpracoval:** I. Fátorová, J. Juránová, D. Mikulenková, M. Matýšková, L. Bourková, D. Šlégrová

**Recenzent:** -

**Schváleno Laboratorní sekcí ČHS ČLS JEP:** 27.3.2026

**Schváleno výborem ČHS ČLS JEP:** 14.4.2026

**Verze:** 1

**Platnost od:** 30.6.2026

**Přechodné období (platí i nahrazovaný dokument):** 30.9.2026

**Poznámky:** -

## Obsah

1.	Úvod .....	3
2.	Princip barvení.....	3
3.	Odběrové zkumavky, stabilita, transport a manipulace s biologickým materiálem .....	3
4.	Manuální tvorba nátěru a barvení .....	4
4.1.	Zhotovení nátěru .....	4
4.2.	Barvení nátěru.....	5
4.2.1.	Základní reagentie .....	5
4.2.2.	Pracovní postup barvení .....	6
5.	Tvorba nátěrů a barvení na automatech .....	6
5.1.	Spotřební materiál, reagentie, pracovní roztoky .....	6
5.2.	Zhotovení a barvení nátěrů automatem .....	7
6.	Kontrola kvality .....	7
6.1.	Preventivní zásady pro správné barvení .....	7
6.2.	Kontroly před barvením nátěru.....	7
6.3.	Kontroly po nabarvení nátěru .....	8
6.4.	Kontrola zařízení.....	8
7.	Uchování nátěrů.....	8
8.	Bezpečnostní aspekty .....	9
9.	Dokumentace.....	9
10.	Použité zkratky .....	9
11.	Literatura .....	10

## 1. Úvod

Text poskytuje doporučení, jak postupovat při přípravě a barvení nátěrů periferní krve, nátěru aspirátu kostní dřeně, preparátů tělních tekutin (likvor, ascites, kloubní, pleurální a perikardiální tekutina a bronchoalveolární laváž) a tkání (př. otisk uzliny či trepanobioptického válečku) při použití Pappenheimovy panoptické barvicí techniky. Uveden je také přehled potřebných kontrol tohoto postupu.

Doporučení je rozděleno dle toho, zda se nátěry a barvení provádí manuálně nebo na nátěrových a barvicích automatech.

## 2. Princip barvení

**Pappenheimova panoptická barvicí technika** je základní postup barvení v hematologii, při které se používá dvou základních roztoků:

- a) **roztok May-Grünwald** – složení: eozin Y, metylenová modř, metylalkohol, glycerol,
- b) **roztoku Giemsa-Romanowsky** – složení: metylenová modř, azur-eozin II, azur II, metylalkohol, glycerol.

Základem barvicího mechanismu je použití dvou barviv obsažených v roztocích MGG:

- a) **aniontové (kyselé) barvivo eozin Y (tetrabromofluorescein)**, které se váže na kationtové části molekul proteinů a barví oranžovočerveně hemoglobin a eozinofilní granula.
- b) **kationtové (zásadité) barvivo azur B (trimethylthionine)**, které se váže na aniontové části molekul a barví modrošedě nukleové kyseliny (DNA nebo RNA), nukleoproteiny, granula bazofilů a sekundární granula neutrofilů.

Při barvení vznikají dle struktury buněčné složky ve vzorku různé barevné kombinace těchto dvou základních barviv. Standardní metoda využívající čisté barvy byla navržena ICSH v roce 1984. Běžně laboratorně využívané barvy by měly splňovat takové fyzikálně-chemické vlastnosti, které zaručují jejich dostatečnou chemickou čistotu (především dostatečný obsah základních barvicích složek).

## 3. Odběrové zkumavky, stabilita, transport a manipulace s biologickým materiálem

Pro barvení lze použít mikroskopický preparát zhotovený z čerstvé kapilární krve bez antikoagulačního činidla, vzorek periferní krve či aspirátu kostní dřeně odebraný do nádobky se solí EDTA (nejčastěji K<sub>3</sub>EDTA), nebo z nativního aspirátu kostní dřeně, tělní tekutiny, otisku uzliny či trepanobioptického válečku.

Stabilita vzorku periferní krve v soli EDTA do zhotovení nátěru je max. 5 hodin při laboratorní teplotě. Optimálně by však měl být zpracován do 2 hodin a před samotnou přípravou důkladně promíchán.

Vzorek aspirátu kostní dřeně odebraný lékařem při punkci je nezbytně okamžitě po odběru natřít na podložní sklo nebo přenést do zkumavky se solí EDTA (takový vzorek je nutno zpracovat co možná nejdříve po odběru). Pokud se nátěry aspirátu kostní dřeně připravují mimo laboratoř, je nezbytné je transportovat v uzavřeném boxu.

Vzorek tělních tekutin je stabilní 2 hodiny od odběru; do laboratoře by měl být dopraven do půl hodiny od odběru a nesmí být transportován potrubní poštou.

**Příprava a barvení nátěru periferní krve, aspirátu kostní dřeně a tělních tekutin, včetně kontrolní činnosti**

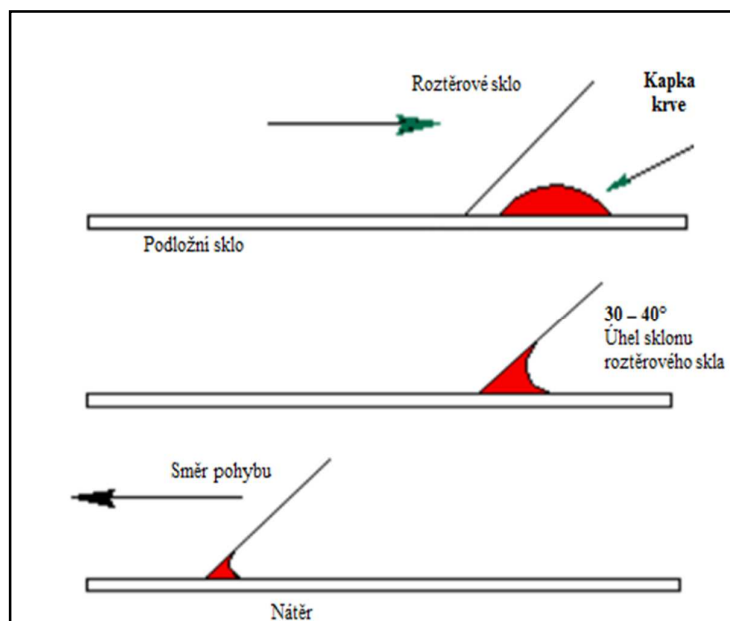
## 4. Manuální zhotovení nátěru a barvení

### 4.1. Zhotovení nátěru

#### a) Periferní krev

Malá kapka krve se umístí (např. pomocí kapiláry či pipety) do středu kratší hrany podložního skla asi 1,5 cm od okraje sklíčka. Roztěrové sklo je posunováno od středu podložního skla ke kapce krve, která se po dotyku s ním rozprostře po celé délce jeho hrany. Rovnoměrným tahem roztíracího skla po podložním skle směrem od kapky je rozetřena veškerá krev pod úhlem nejčastěji 30-40° (v závislosti na hematokritu).

Nátěr musí být rovnoměrný, přiměřeně tenký, s rovnými okraji a před koncem podložního sklíčka musí přecházet do ztracena. Tloušťku nátěru lze ovlivnit změnou tlaku, rychlostí roztěru a změnou úhlu, pod kterým je roztěr prováděn. Pro anemické vzorky je vhodné využít širší úhel, pro polycytemické naopak ostřejší úhel.



#### b) Aspirát kostní dřeně

Pro přípravu mikroskopického preparátu aspirátu kostní dřeně je nutné využít první porci aspirace o maximálním objemu 0,3 až 0,5 mL. Vyšší objem zvyšuje riziko naředění vzorku periferní krví.

Při přípravě nátěru je po rozprostření kapky na hraně roztíracího skla použito čisté, mírně nakloněné podložní sklíčko nebo je rozprostření kapky na hranu roztíracího sklíčka provedeno v mírně nakloněné Petriho misce tak, aby odtekla přebytečná krev.

#### c) Tělní tekutiny

Mikroskopické preparáty tělních tekutin o nižší buněčnosti jsou připravovány pomocí cytosedimentace v cytosedimentační komůrce či pomocí cytocentrifugace v cytocentrifugách se speciálními kyvetami. U tělních tekutin s vyšší buněčností a s částicemi je možné provést i nátěr na podložní sklo.

**Příprava a barvení nátěru periferní krve, aspirátu kostní dřeně a tělních tekutin, včetně kontrolní činnosti**

**d) Jiné tkáně**

Otisky uzliny či trepanobioptického válečku jsou zhotoveny prostým přitištěním odebraného materiálu k podložnímu sklíčku ze všech stran.

Připravené nátěry periferní krve je nutné nechat minimálně 10 minut dostatečně zaschnout při laboratorní teplotě, nátěry aspirátu kostní dřene a otisku tkáně nejméně 30 minut (dle množství částic na skle) a preparáty tělních tekutin minimálně 1 hodinu. Je nutno vyvarovat se vlhkého a prašného prostředí.

## 4.2. Barvení nátěru

### 4.2.1. Základní reagensie

**a) Metanol**

- Fixační roztok pro archivaci nátěru.

**b) roztok May-Grünwald**

- Neředí se.
- Originální balení uchovávat při laboratorní teplotě a používat do data expirace.
- Pracovní roztok uchovávat v přikryté kyvetě při laboratorní teplotě a příslušný objem dolévat dle potřeby.

**c) roztok Giemsa-Romanowsky**

- Ředí se.
- Originální balení uchovávat při laboratorní teplotě a používat do data expirace.
- Pracovní roztok: 1 díl originálního roztoku Giemsa-Romanowsky (dle potřeby před použitím přefiltrovat) ředit 9 díly fosfátového pufru / destilované vody a uchovávat v přikryté kyvetě při laboratorní teplotě. Celý objem vyměňovat dle potřeby.

**d) fosfátový pufr**

- Používá se při přípravě pracovního roztoku Giemsa-Romanowsky a jako oplachovací roztok.  
*Poznámka: pH používaných roztoků ovlivňuje výsledné obarvení. Alkalické pH zesiluje vliv azurové složky barvení na úkor eozinové a naopak. Pro všeobecné použití se obvykle doporučuje pH 6,8.*
- rozpis pro přípravu 5000 mL:

127 mL 0,067 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ + 123 mL 0,067 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ + doplnit do 5 000 mL deionizovanou vodou
0,067 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 9,07 g + doplnit do 1000 mL deionizovanou vodou
0,067 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 9,45 g + doplnit do 1000 mL deionizovanou vodou

- Uchovávat v lednici (při teplotě 2 až 8 °C).
- Vyměňovat dle potřeby.
- Lze použít komerčně vyráběný fosfátový pufr používaný v nátěrových a barvicích automatech (výhoda CE označení).

**Příprava a barvení nátěru periferní krve, aspirátu kostní dřene a tělních tekutin, včetně kontrolní činnosti**

#### 4.2.2. Pracovní postup barvení

##### a) Fixace nátěrů:

Fixace je nezbytná v případě uchovávání nenabarvených skel (nefixovaný nátěr nelze dlouhodobě skladovat). Pro rutinní barvení nátěrů se nevyžaduje. Fixovaný nátěr lze před vlastním barvením skladovat až několik týdnů při laboratorní teplotě.

- Nátěry periferní krve fixovat v kyvetě s metanolem 5 minut, nátěry aspirátu kostní dřeně 20 minut (metanol nesmí přijít do kontaktu s vodou!)
- Fixované nátěry nechat zaschnout na vzduchu.

##### b) Barvení nátěrů:

- V první kyvetě nátěry barvit 10-15 minut roztokem May-Grünwald (roztok nesmí přijít do kontaktu s vodou.)
- Ve druhé kyvetě oplachovat fosfátovým pufrem.
- Ve třetí kyvetě nátěry barvit 10-15 minut pracovním roztokem Giemsa-Romanowsky.
- 2x opláchnout fosfátovým pufrem.
- Nátěry řádně opláchnout pod tekoucí vodou a nechat zaschnout.

##### **Poznámky:**

*Uvedený doporučený postup je možné modifikovat (např. v otázce uvedených časů barvení, typu promývacích roztoků, četnosti promývání) v závislosti na odlišnostech mezi dodavateli barvicích roztoků, kvalitě mikroskopických preparátů a podobně.*

*Barvení skel na mřížce či na barvicím stolku je méně vhodné, může způsobovat arteficiální změny v nátěru (vysychání, krystalizace barvy). Při tomto postupu barvení je vhodná práce v digestoři.*

*Tzv. „rychlé barvení“ není vhodné k barvení nátěrů periferní krve ani aspirátu kostní dřeně.*

## 5. Zhotovení a barvení nátěrů na automatech

V současných hematologických laboratořích je především pro periferní krev čím dál rozšířenější využití nátěrových a barvicích automatů, které využívají Pappenheimovu barvicí metodu, a to s výhodou standardizace celého procesu a použití certifikovaných reagensů a barvicích roztoků.

Vzorky aspirátu kostní dřeně odebrané do EDTA mohou obsahovat pevné částice a nejsou proto vhodné pro tvorbu nátěru pomocí automatu (riziko ucpání pipetovací jehly).

Automaty lze využít rovněž pro barvení nátěrů kostní dřeně. Vzhledem k velké variabilitě nativních mikroskopických preparátů aspirátu kostní dřeně (buněčnost, tloušťka, délka nátěru) je obtížnější zvolit pro tento typ vzorku univerzální barvicí protokol; kvalita obarvení se tak může lišit.

Barvicí automaty lze využít pro barvení nátěrů a centrifugovaných/sedimentovaných preparátů tělních tekutin.

### 5.1. Spotřební materiál, reagentie, pracovní roztoky

Nutno používat podložní a roztěrová skla, fixační i barvicí roztoky speciálně určené pro používaný automat.

**Příprava a barvení nátěru periferní krve, aspirátu kostní dřeně a tělních tekutin, včetně kontrolní činnosti**

## 5.2. Zhotovení a barvení nátěrů automatem

Zhotovení, fixace (pro archivaci k dalšímu použití) i barvení nátěru probíhá dle platného protokolu pro daný automat.

## 6. Kontrola kvality

Správně zhotovené a kvalitně nabarvené nátěry jsou zásadní pro správnou diagnostiku. Proto je nutné při jejich přípravě dodržovat následující minimální požadavky.

### 6.1. Preventivní pravidla pro správné barvení

- a) Odběr daného typu biologického materiálu do správné odběrové zkumavky.
- b) Zamezení kontaminace aspirátu kostní dřevě dezinfekčním prostředkem na ošetření kůže před odběrem
- c) Správné provedení nátěru (přiměřený tlak na roztěrové sklíčko, provedení roztěru pod správným úhlem.)
- d) Dostatečné zaschnutí nátěru, zamezení nadměrné vlhkosti okolního vzduchu (chladicí jednotky v laboratořích!) a zamezení usazení prachových částic na nátěru.
- e) Zamezení vlhkosti v roztocích (již 1% příměs vody v metanolu může znemožnit správnou interpretaci vyšetření, zvláště je ovlivněna morfologie erytrocytů).
- f) Při manuálním barvení je vhodné pracovat v uzavřených kyvetách, předchází se tím vypařování metanolu a vysrážení barev na sklíčkách. Při barvení na mřížce či barvicím stolku je vhodné pracovat v digestoři.
- g) Při práci na barvicích automatech je třeba s ostatními zásadami dodržovat pokyny výrobce.
- h) Včasná fixace: nátěry je ideální barvit okamžitě po jejich zaschnutí. Pokud to není možné, je vhodné provést fixaci metanolem nejpozději do 5 hodin od zhotovení a zaschnutí nátěru (optimální je fixovat do jedné hodiny). Fixované nátěry lze následně skladovat neomezenou dobu.
- i) Použití čerstvě naředěných barvicích roztoků. Použitelnost roztoku je dána počtem nabarvených skel, roztok nemá být používán déle než 24 hodin. Barví-li se v průběhu dne větší počet skel, doporučuje se připravit čerstvé roztoky několikrát.

### 6.2. Kontroly před barvením nátěru

**Vždy se musí ověřit:**

- a) Kvalita skel (nepoužívat poškozená, zašpiněná, mastná skla apod.).
- b) Délka, šířka a síla nátěru.
- c) Doba expirace všech reagensů (pozor na případné vysrážení barvicích roztoků).
- d) Podmínky skladování reagensů – vedle splnění požadavků výrobce je vhodné:
  - barvicí roztoky uchovávat ve tmě,
  - při skladování diagnostik dodržovat předepsanou teplotu – změna teploty může způsobit vysrážení barvicích roztoků,
  - barvicí roztoky nesmí zmraznout, proto pozor na přepravu reagensů v zimních měsících,
  - reagensie nesmí být vystaveny vyšším teplotám – dochází k odpařování roztoků (především metanolu).
- e) Množství fixačních a barvicích roztoků a pufrů v kyvetách.

**Příprava a barvení nátěru periferní krve, aspirátu kostní dřevě a tělních tekutin, včetně kontrolní činnosti**

- f) Kvalita pufru: makroskopicky je pufr bez viditelných příměsí a barevných změn (vysrážené soli, plíseň).

### 6.3. Kontroly po nabarvení nátěru

Preventivní kontrolu je vhodné provádět s každou novou sérií připravených fixačních a barvicích roztoků (1 až 2 skla při manuálním barvení; při použití barvicího automatu 1 až 2 skla u každé nové šarže používaných diagnostik, případně po větší údržbě automatu). Pro tuto kontrolu používáme nátěr krve od zdravého jedince, případně od vhodného pacienta. Nátěr hodnotíme makroskopicky a mikroskopicky.

#### Makroskopicky ověřujeme zbarvení:

Krevní nátěry a nátěry aspirátu kostní dřeně mají být zbarveny purpurově,

- je-li zbarvení nátěru do modra, pufr má příliš vysoké pH nebo je nátěr přebarvený,
- jeli zbarvení do růžova, pufr má příliš nízké pH nebo je nátěr nedobarvený,
- zbarvení nátěru je ovlivněno také typem vzorku (PK, aspirát KD atd.) a jeho vlastnostmi (vysoký či nízký hematokrit, paraproteinémie, buněčnost).

*Poznámka: Jestliže jsou na nátěrech patrné rozdíly v barvitelnosti buněk (viz výše) ve stejném barvicím cyklu a ve stejné barvicí lázni, potom jsou změny v obarvení nátěrů dány vlastnostmi biologického materiálu (výsledek barvení může být ovlivněn i buněčným složením).*

#### Mikroskopicky hodnotíme jednotlivé elementy, které mají být:

- **Erythrocyty:** růžovohnědé, **erythroblasty:** cytoplazma dle stádia vývoje (bazofilní, polychromatofilní, ortochromní/oxyfilní), jádra tmavě fialová s typickou loukoťovitou strukturou chromatinu
- **Trombocyty:** tmavě růžové, **megakaryocyty:** jádra tmavě fialová, cytoplazma s tmavě růžovou granulací
- **Leukocyty:** jádra tmavě fialová
- **Eozinofily:** granula jasně oranžová
- Neutrofilny a granulované lymfocyty: granula purpurová
- **Bazofily:** granula temně purpurová

### 6.4. Kontrola zařízení

Pro správné hodnocení nátěrů je potřeba mikroskopu pravidelně čistit, seřizovat a kontrolovat mechanické a optické části (v zahraniční literatuře se používá pojem kalibrace). Údržbu mikroskopů je vhodné provádět 1× ročně servisním technikem, ale tento interval je velmi individuální a závisí na frekvenci používání mikroskopu, jeho stáří a kvalitě.

Objektivy mikroskopu je nutné čistit po každém použití.

Pro nátěrové a barvicí automaty je nutné dodržovat pokyny výrobce a provádět pravidelnou validaci přístroje.

## 7. Uchování nátěrů

- a) Nenabarvené, nefixované – vhodné zpracovat do 5 hodin,

**Příprava a barvení nátěru periferní krve, aspirátu kostní dřeně a tělních tekutin, včetně kontrolní činnosti**

- b) Nenabarvené, fixované – je možné uchovávat po neomezenou dobu
- c) Nabarvené – je možné uchovávat po neomezenou dobu (nátěry periferní krve je doporučeno uchovávat minimálně 1 měsíc, aspiráty kostních dření po dobu 10 let; některé nátěry vzácných diagnóz je doporučeno uchovávat neomezenou dobu).

Pro uchovávání obarvených nátěrů je nezbytné zbavit nátěr imerzního oleje otěrem (šetrný prostředek je např. ether nebo benzín lékařský).

### **Poznámka:**

*Zbytky oleje mohou buňky v nátěru znehodnotit (dle typu oleje již druhý den). Před zvažováním nákupu nového imerzního oleje je vhodné si jeho kvalitu v praxi otestovat (nátěry kontrolovat i několik dní po sobě – některé oleje již druhý den jakoby buňky proděraví a následně zcela „rozpuští“).*

*Umývání skel (pokud je nutné) by mělo být prováděno dle ověřených postupů a popsáno v SOP.*

- a) *Vložit skla na 24 hodin do čistícího roztoku (používá se běžně naředěný saponát používaný v umývárně).*
- b) *Po vyjmutí z čistícího roztoku promývat proudem tekoucí vody a potom provést oplach destilovanou vodou.*
- c) *Opláchnutá skla namočit do lihobenzinu a potom jedno po druhém osušit a vyleštit čistým plátnem.*
- d) *Čistá skla přikrýt nebo je uložit do krabičky.*

## 8. Bezpečnostní aspekty

**Metanol:** toxický při vdechnutí, při styku s kůží a při požití.

Bezpečnostní pokyny k reagentům, které byly použity při procesu přípravy a barvení: viz Bezpečnostní listy.

## 9. Dokumentace

Pracoviště musí mít vypracován vlastní SOP na přípravu a barvení mikroskopických preparátů všech biologických materiálů, které zpracovává, včetně kontrolních postupů. O prováděných kontrolách je nutné vést záznamy.

## 10. Použité zkratky

EDTA	etylendiaminotetraoctová kyselina
ICSH	International Council for Standardization in Haematology
KD	kostní dřev
MGG	May-Grünwald-Giemsa
PK	periferní krev
SOP	Standardní Operační Postup

**Příprava a barvení nátěru periferní krve, aspirátu kostní dřevě a tělních tekutin, včetně kontrolní činnosti**



## 11. Literatura

1. BAIN, Barbara J., Imelda BATES a Michael A. LAFFAN. *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 12. vyd. Philadelphia: Elsevier, 2017, s. 50–60. ISBN 978-0-7020-6696-2.
2. BROWN, B. A. *Hematology: principles and procedures*. London: Lea & Febiger, 1993.
3. CORRONS, J-L. V. et al. Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. *Clin Chem Lab Med*. 2004, roč. 42, č. 8, s. 922–926.
4. DOBRÝ, E. a spol. *Hematologie a transfúzní služba*. Praha: Avicenum, 1987.
5. HOUWEN, B. Blood Film Preparation and Staining Procedures. *Laboratory Hematology*. 2000, č. 6, s. 1–7.
6. ICSH. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2008, roč. 30, č. 5, s. 349–364. ISSN 1751-5521.
7. ICSH. ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y. *British Journal of Haematology*. 1984, roč. 57, č. 4, s. 707–710. ISSN 0007-1048.
8. LOUGHRAN, T. P. Clonal Diseases of Large Granular Lymphocytes. *Blood*. 1993, roč. 82, č. 1, s. 1–14.
9. PECKA, Miroslav a kol. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art, 2010, s. 101–106. ISBN 978-80-903871-3-3.