

Tartu Tervishoiu Kõrgkool
bioanalüütiku õppekava

Aivar Uus

**OPTIMAALSE LEISHMAN-GIEMSA VÄRVINGU JUHEND TARTU TERVISHOIU
KÕRGKOOLI HEMATOLOOGIA PRAKTIKUMIDES KASUTAMISEKS**

Lõputöö

Juhendaja: Anneli Raave-Sepp
Tartu Tervishoiu Kõrgkool

Tartu 2012

Käesoleva diplomitöö on autor koostanud iseseisvalt. Kõik töös kasutatud teiste autorite, kirjandusallikate ja muudest allikatest pärinevad andmed on nõuetekohaselt viidatud.

Lõputöö autori allkiri:

Kuupäev “.....”20.....a.

Otsus kaitsmisele lubamise kohta

.....
.....

Juhendaja:

/nimi ja akadeemiline kraad/

/allkiri/

Kuupäev “.....”201....a.

KOKKUVÕTE

Leishman-Giemsa värving on hematoloogia laborites levinud vereäiete värvimise meetod, mida kasutatakse ka Tartu Tervishoiu Kõrgkooli õppelaboris. Sellel värvingul on palju variatsioone ning iga labor töötab välja endale sobiva optimeeritud protokoll.

Uurimistöös selgitati katseliselt välja kvaliteetset tulemust tagav Leishman-Giemsa värvingu protokoll Tartu Tervishoiu Kõrgkooli hematoloogia õppelabori tingimustes hematoloogia praktikumides kasutamiseks. Selleks viidi läbi kolm värvimiskatset kokku 22 erineva protokolliga. Iga katse järel hindas tulemusi ekspert. Eksperti hinnangul andis parimaid tulemusi protokoll, kus hoiti vereäideid 8 minutit Leishmani värvis, loputati kraaniveega vannis, hoiti 18 minutit Giemsa värvis ja loputati seejärel jooksva kraanivee all. Parimast protokollist tehti ka juhend.

Märksõnad: hematoloogia, preparaat, vereäie, Leishman, Giemsa, värving.

ABSTRACT

The Leishman-Giemsa stain is applied in most Estonian medical haematological laboratories, as well as in Tartu Health Care College, for the purpose of staining blood smears in preparation for microscopic evaluation. It is a variation of the Romanowsky stain, with no fixed protocol, leaving each laboratory to develop their own specific protocol.

In this research, a Leishman-Giemsa protocol for application in the haematological laboratory of Tartu Health Care College was developed. For this purpose, 22 dissimilar protocols were tested in the laboratory. All protocols were appraised by an expert. The results of utmost quality were achieved by the protocol, following which blood smears were kept in Leishman for eight minutes, rinsed in a coplin jar repleted with tap water, then kept in Giemsa working solution for 18 minutes and eventually rinsed under running tap water. Comprehensive instructions were composed peculiar to the protocol of utmost quality. It ought to be noted that the Giemsa working solution was concocted by diluting the Giemsa concentrate 1:10 in purified water with pH 8,5.

Keywords: hematology, haematology, blood smear, Leishman, Giemsa, stain.

SISUKORD

KOKKUVÕTE	3
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Vereäige mikroskopeerimine tänapäeval	8
1.2. Vereäige valmistamine	10
1.3. Romanowsky värving	13
1.4. Juhendi roll laboris	17
2. METOODIKA	18
3. UURIMISTULEMUSED	21
3.1. Katsete tulemused	21
3.2. Valitud protokoll järgi värvitud preparaadil ilmnevad tunnused	24
3.3. Ekspertide tagasiside juhendi kohta	26
4. ARUTELU	27
5. JÄRELDUSED	31
ALLIKALOEND	32
LISAD	35

SISSEJUHATUS

Vere äigepreparaadi hindamine on laialt levinud hematoloogiline test. Seda kasutatakse tavaliselt vere vormelementide morfoloogia hindamiseks ja loendamiseks, ehkki saab kasutada ka malaaria plasmoodiumi diagnoosimiseks. Hinnatava preparaadi valmistamine koosneb vereäige tõmbamisest ja selle värvimisest.

Värvimiseks kasutatakse tänapäeval Romanowsky värvingul põhinevaid Giemsa, Wrighti, May-Grünwaldis ja Leishmani värvinguid. Eesti meditsiinilaborites levinuim ja seetõttu ka Tartu Tervishoiu Kõrgkooli hematoloogia õppelaboris kasutatav on kahe etapiline Leishman-Giemsa värving. Universaalselt kindel protokoll värvimiseks puudub, kuid igas laboris on olemas optimeeritud variant omade nüanssidega, mis tagavad just selles laboris parima värvumise.

Probleem on aga selles, et vaatamata erinevate protokollide katsetamisele ei ole TThK-s nende järgi värvimine seni reeglina edukalt õnnestunud. Osa rakkude tunnuseid ilmneb, kuid leukotsüütide tsütoplasma ja seal olevad graanulid, eriti neutrofiilsed graanulid, ei ole värvunud adekvaatselt. Seega ei ole õppelaboril veel sellist tööprotokolli, mille järgimine annaks soovitud tulemuse.

Laborites peavad nii vereäige kui ka teiste kasutatavate meetodikate kohta olema kehtestatud etapilised juhendid. Juhend annab võimaluse tegevust standardiseerida ja peab olema kergesti järgitav. Õppelaboris värvivad preparaate tudengid, kelle kogemus värvimisega on varieeruv. Seetõttu ei piisa lihtsalt protokollist vaid on vaja korralikku juhendit, mis oleks arusaadav nii suuremate kui ka vähemate erialaste teadmistega inimestele.

Uuringu eesmärk on katseliselt välja selgitada kvaliteetset tulemust tagav Leishman-Giemsa värvingu protokoll Tartu Tervishoiu Kõrgkooli hematoloogia õppelabori tingimustes hematoloogia praktikumides kasutamiseks ja koostada sellest hõlpsasti järgitav juhend. Sellest lähtuvalt on püstitatud ülesanded:

- 1) Selgitada välja parimat värvumist tagav aeg, loputusmeetod ja vee tüüp.
- 2) Koostada parimast protokollist juhend ja kontrollida selle arusaadavust.

Uurimistöö meetodiks on empiiriline uuring, tulemused saadi laboris läbiviidud katsete abil, lisaks kasutati katsete tulemuste hindamisel eksperdi abi. Selle töö tulemusena on saadud hõlpsasti järgitav juhend, mille abil on võimalik hematoloogia praktikumides valmistada adekvaatselt värvunud preparaate.

Autor tänab töö valmimisele kaasa aitamise eest juhendaja Anneli Raave-Seppa, preparaatide ja rakkude kirjeldamise eest ekspert Milvi Topmanni, abi eest juhendi koostamisel ja eksperimendis värvimise eest bioanalüütiku õppekava kolmanda kursuse tudengit Terje Lokk'i, juhendi arusaadavuse hindamise eest bioanalüütiku õppekava teise kursuse tudengeid ja juhendi vormistamise alase nõu eest õppejõudu Aivar Oravat.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Vereäige mikroskopeerimine tänapäeval

Vere äigepreparaadi mikroskoopia on olnud üks laiemalt levinumaid ja sagedasemaid teste. Patsiendilt võetud verest tõmmatakse alusklaasile õhuke äigepreparaat, mis värvitakse ja mida vaadatakse mikroskoobi all. Mikroskoopiat kasutatakse tavaliselt vere vormelementide loendamiseks ja morfoloogia hindamiseks, ehkki võib kasutada ka malaaria plasmoodiumi diagnoosimiseks. Vererakke uurides on võimalik saada infot erinevate verehaiguste kohta, nagu leukeemiad ja aneemiad. Alguses vaadatakse kogu äie üle nõrgema suurendusega et hinnata preparaadi üldpilti, trombotsüütide agregatsiooni ning leida parim koht rakkude võimsama suurendusega uurimiseks. Seejärel loendatakse ja vaadatakse rakke lähemalt õli-immersiooniga preparaadi hõredamas osas. Vere äigepreparaadil võib vormelemente loendada bioanalüütik, keerulisemate morfoloogiliste iseärasuste ja hematoloogiliste haiguste puhul on vaja arsti poolset ülevaatamist (Tkachuk ja Hirschmann 2007). On olemas ka automatiseeritud ja digitaliseeritud vereraku morfoloogia hindamise automaatanalüsaator, mis preklassifitseerib valgevere rakud, iseloomustab punavere rakkude morfoloogiat ja annab hindamiseks trombotsüütide arvu. Esmane preklassifitseerimine toimub automaatselt, kuid analüsaator kuvab rakud ekraanil, kus bioanalüütik või vajadusel ka arst need kõik üle vaatab. Uurimisel leiti, et analüsaatori ja manuaalse mikroskoopia tulemused korreleeruvad hästi, lisaks on analüsaator kiirem ning väldib inimlikke vigu (Kuusik 2010).

Vererakkude loenduse ja leukotsüütide diferentseerimise rolli on tänapäeval enda peale võtnud täisverest hematoloogilisi parameetreid määravad automaatanalüsaatorid. Need loendavad rakke, mõõdavad nende suuruse ja hemoglobiini kontsentratsiooni. Tartu Tervishoiu Kõrgkoolis automaatanalüüse ja spetsialisti poolset vereäige mikroskopeerimist võrreldes on leitud, et leukogrammide parameetrite korrelatsioon on mõlema meetodiga hea; et kõige halvemini korreleeruvad kahe erineva meetodiga saadud monotsüütide tulemused ja et vere säilitamine 24 tundi heades tingimustes toob kaasa leukogrammide korreleeruvuse halvenemise, aga leukotsüütide üldhulk on stabiilne (Ratassepp 2005). Kuna tavaliselt automaatanalüsaatorid ei suuda hinnata raku morfoloogiat, ei suuda nad mikroskoopiat täielikult asendada. Analüsaatorid ei tuvasta kõiki tunnuseid, mis mikroskopeerimisel

nähtavad on (Howell-Jolly kehakesed, blastid, hüpersegmenteerunud neutrofiilid, trombotsüütide agregaadid, erütrotsüütide fragmendid) ehkki osa analüsaatoreid võivad nende komponentide leidumise korral anda hoiatuse (Froom jt 2009, Peterson jt 2001). Vere äigepreparaadi mikroskoopia võimaldab hinnata rakkude morfoloogiat, täpsemalt tuvastada perifeerses veres esinevaid rakke ning selle abil saab verehaiguseid uurida. Esiteks on vereäie kindlasti näidustatud verehaiguste kahtluse puhul, sõltumata automaatanalüsaatori tulemustest (Theml jt 2004). Teiseks on vereäie mikroskopeerimine arsti poolt näidustatud ka juhul, kui automaatanalüsaatorist tulnud vere tulemustes on rakkude hulga ja suuruse tugevad kõrvalekalded, mis ei sobi patsiendi haiguspildiga. Täpsed kriteeriumid, mille puhul analüsaatorist tulnud verd on vaja mikroskopeerida, paneb paika iga labor sõltuvalt nende analüsaatorite võimekusest, töötajatest, töömahust, patsientide haiguslugudest jne. Et vähendada ebavajalikku tööd, on Lantise jt töös välja toodud soovitus teha vereäie analüsaatorist tulnud verest ja esmalt üle vaadata, kas seal on analüsaatori poolt loendamatuid rakke. Kui neid ei esine, on soovitatud tööaja säästmiseks väljastada analüsaatori poolne vastus ilma mikroskoobis rakke uuesti lugemata. Bioanalüütiku või arsti poolne rakkude loendus on vajalik vaid juhul, kui tõesti leidub ebatüüpilisi rakke mida analüsaator võis valesti lugeda (Lantis jt 2003). Peale lisainfo saamise võimaldab mikroskopeerimine läbi viia ka pidevat täiendõpet ja kvaliteedi kontrolli töötajatele. Soovitatav on iga päev saata mingi osa bioanalüütiku poolt loetud mittepatoloogilisest verest tehtud ägeid laboriarstile üle vaatamiseks (Gulati jt 2002).

Vereäigel morfoloogia hindamine on vereloomehaiguste puhul informatiivne, aga leukeemiate laboratoorsel uurimisel on viimase kümne aasta jooksul vereäiete kõrval oluliseks muutunud ka teistsugune lähenemine, rakkude fenotüübi määramine. Voolutsütomeetria abil uuritakse teatud markerite olemasolu rakkudel ja määratakse nende fenotüüp. Tegemist on äärmiselt tundliku meetodiga, mis võimaldab avastada ka üksikuid kasvajakke rakke, mis võivad mikroskoopilisel morfoloogia uurimisel märkamata jääda. Seetõttu eelistatakse voolutsütomeetriat leukeemiate diagnoosimiseks, ravi prognoosimiseks ja ravijärgse residuaalse haiguse tuvastamiseks (Craig ja Foon 2008).

1.2. Vereäige valmistamine

Vereäige jaoks võetakse patsiendilt verd tavaliselt veenist, ehkki vajadusel tehakse äie ka kapillaarsest verest. Veri kogutakse antikoagulanti sisaldavasse katsutisse. Antikoagulantidest on võimalik kasutada EDTA-d (etüleendiamiintetraatseethape), tsitraati või hepariini (Houwen 2000). Kõige levinum antikoagulant on EDTA, kuna selles säilib veri kõige paremini (Narasinha jt 2008). On olemas nii K₂EDTA-d kui K₃EDTA-d sisaldavad katsutid, kuid nendel ei ole täheldatud olulist vahet (Van Cott jt 2003). Mõnel harval juhul reageerib patsiendi veri *in vitro* EDTA-ga nii, et trombotsüüdid ümbritsevad rosetjalt neutrofiile. Sel juhul ei saa trombotsüüte loendada. Probleemi lahendamiseks tuleb sellistel patsientidel kasutada antikoagulandina tsitraati (Kopcinovic ja Pavic 2012). Tsitraat on kasutusel ka naatriumtsitraati või tsitraatdekstroosi vormis. Hepariini sisaldavates katsutites tekivad trombotsüütide agregaadid, seega pole hepariini kasutamine antikoagulandina soovitatav (Houwen 2000). Ehkki antikoagulant mõjutab artefaktide tekkimise kiirust, hakkavad vere säilitamisel tekkima rakkude morfoloogilised artefaktid. Seega tuleks pärast vere võtmist äie tõmmata võimalikult kiiresti. Houweni soovitusel ei tohiks verd hoida üle 8 tunni, ka siis oleks soovitatav säilitada proovi 4°C juures (Houwen 2000). Uurides artefaktide tekkimise kiirust erinevate antikoagulantidega katsutites säilitamisel, leidsid Narasimha jt, et esimesed morfoloogilised artefaktid hakkavad tekkima EDTA-ga katsutis juba tunni aja möödudes, tsitraadiga katsutis kohe pärast võtmist (Narasimha jt 2008).

Vereäige tõmbamiseks peab kasutama puhast alusklaasi ja tõmbamisvahendit. Tõmbamisvahenditena kasutatakse kas teist alusklaasi või spetsiaalset ühekordset plastmassist painduvat spaatlit. Alusklaas peab olema terve, defektideta, läbipaistev, selge ja õhuke, seal ei tohi olla rasva, tolmu ega isegi niiskust. Kõik defektid võivad mõjutada värvumist või anda artefakte. Võimalik on kasutada spetsiaalseid kommertsiaalseid alusklaase, mida on soovitatav kuni kasutamiseni karbist mitte välja võtta. Kui ei kasutata spetsiaalselt tellitud alusklaase, aitab ka see, kui klaase enne kasutamist etanooli ja eetri lahuses hoida ja neil kuivada lasta (Theml jt 2004).

Äige lugemisel õige tulemuse saamiseks on vaja, et veri oleks homogeenne. Kuna rakud settivad ajaga põhja, tuleb vahetult enne äige tõmbamist verd katsutis ettevaatlikult segada. Kui verd on säilitatud pikemalt, soovitatakse teha vähemalt kümme 180° pööret (Houwen 2000). Alusklaasile pannakse üks tilk verd, alusklaasi ühest servast umbes 1 cm kaugusele (joonis 1). Veri tõmmatakse spaatliga laiali, hoides seda veretilga suhtes umbes 30° nurga all. Spaatliga minnakse aeglaselt vastu veretilka nii, et veri jaotub joonena vastu spaatli alumist serva. Seejärel liigutakse spaatliga mööda alusklaasi ning veri tõmmatakse laiali (joonis 2). Oluline on verd järele tõmmata, mitte lükata. Mida kiiremini tõmme tehakse ja mida väiksem on spaatli nurk, seda õhem tuleb äie (Theml 2004). Äige lõpuosas peab jääma piisavalt suur kiht mikroskoobis loetavat osa, kus rakud paiknevad ühes kihis üksteise kõrval, eraldiseisvalt (Houwen 2000). Liiga tihedas kohas ei saa rakke eristada. Liiga õhukeses kohas võib olla ebaproportsionaalselt palju leukotsüüte ja erütrotsüütidel ei pruugi nõgusus näha jääda (College of... 2004).



Joonis 1. „Lille“ torkamine läbi katsuti korgi ja tilga laskmine klaasile.



Joonis 2. Vereäige laiali tõmbamine.

Tõmmatud äie tuleb enne värvimist kuivatada ja fikseerida. Tavaliselt piisab õhu käes kuivada laskmisest, niiskes keskkonnas võib kasutada ka näiteks fööni. Kuivad preparaadid tasuks fikseerida ühe tunni jooksul pärast kuivamist, vältida tuleks fikseerimata preparaadi õhu käes hoidmist üle nelja tunni, et vältida plasma poolt tekitatavat taustahägu (Houwen 2000). Kuivi preparaate võib fikseerida enne värvimist, hoides neid 10 minutit metanoolis (Theml jt 2004). Samas võib fiksaator olla ka värvi sisse segatud, näiteks on Leishmani värvis suur kogus metanooli ja seda sobib kasutada nii värvi kui fiksaatorina (College of... 2004). Eesti meditsiinilaborites kasutataksegi tänapäeval kahe etapilisi Leishman-Giemsa värvimisprotokolle, kus Leishman on fiksaatori rollis. Universaalset kindlat kasutatavat protokollit pole, üldised juhised värvimiseks saadakse kirjandusest. Igas laboris töötatakse välja oma protokoll eri nüanssidega, mis annavad parima värvumuse just selle labori tingimustes (Houwen 2000). Eesti meditsiinilaborite kahe etapilist värvimist saab kokkuvõtvalt kirjeldada nii: kuivad preparaadid pannakse kelgu (joonis 3) peale, ühele kelgule mahub korraga kümme preparaati. Esmalt tõstetakse kelk Leishmani värviga täidetud vanni. Seejärel eemaldatakse liigne värv ja tõstetakse kelk Giemsa töölahusega täidetud vanni. Lõpuks loputatakse üleliigne värv maha ja preparaat on vaatamiseks valmis.



Joonis 3. Preparaatide asetamine kelgule.

Põhja-Eesti Regionaalhaigla protokoll järgi värvitakse vere äigepreparaadid järgmiselt: tehakse Giemsa töölahus, lahjendades kontsentraati fosfaatpuhvriga 1:11. Kuivanud preparaate hoitakse Leishmanis 4 minutit, loputatakse puhvri töölahuses, Giemsa töölahuses hoitakse 5 minutit ja pärast seda loputatakse jooksva kraanivee all (Jerjomina 2011).

Lääne-Tallinna Keskhaigla protokoll järgi värvitakse vere äigepreparaadid järgmiselt: tehakse Giemsa töölahus, lahjendades kontsentraati fosfaatpuhvriga 1:21. Kuivanud preparaate hoitakse Leishmanis 3 minutit, loputamiseks kastetakse 10-12 korda puhvri töölahusesse, lastakse vahepeal 5 minutit õhu käes kuivada, Giemsa töölahuses hoitakse 4 minutit ja pärast seda kastetakse veel 10-12 korda esimesse ja teise puhvri töölahusesse (Lopatina ja Mardi 2009).

Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabori protokoll järgi värvitakse vere äigepreparaadid järgmiselt: tehakse Giemsa töölahus, lahjendades kontsentraati fosfaatpuhvriga 1:9. Preparaadid fikseeritakse metanoolis. Kuivanud preparaate hoitakse Leishmanis 8 minutit, seejärel Giemsa värvis 18 minutit ja loputatakse (Preparaatide värvimine i.a).

Quattromed HTI vanema protokoll järgi värvitakse vere äigepreparaadid järgmiselt: tehakse Giemsa töölahus, lahustades 15 mL Giemsa kontsentraati 200 mL fosfaatpuhvris. Kuivanud preparaate hoitakse Leishmanis 15 minutit, preparaatidelt nõrutatakse liigne värv paberrätikule, Giemsa töölahuses hoitakse 20 minutit ja pärast seda loputatakse preparaadid kraaniveega (Raave-Sepp 2009).

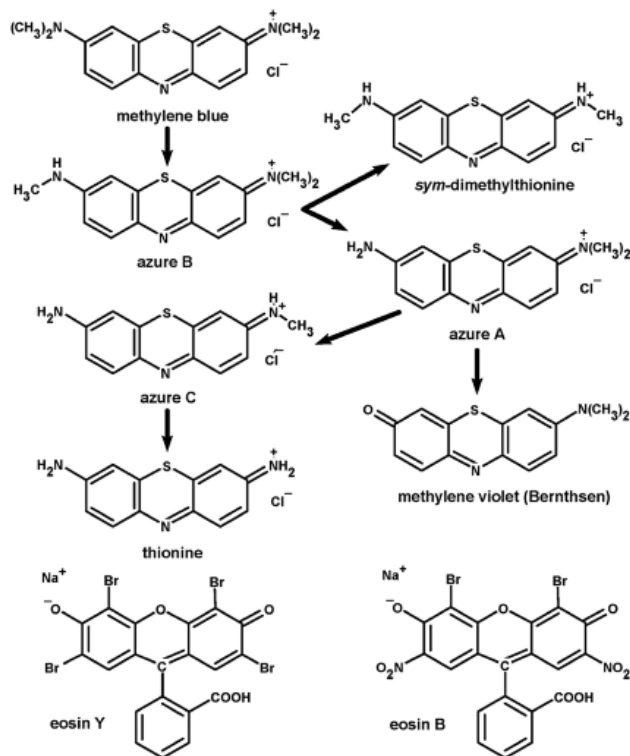
Quattromed HTI uuema protokoll järgi värvitakse vere äigepreparaadid järgmiselt: tehakse Giemsa töölahus, lahjendades kontsentraati fosfaatpuhvriga 1:10, Kuivanud preparaate hoitakse Leishmanis 7 minutit, preparaatidelt nõrutatakse liigne värv paberrätikule, Giemsa töölahuses hoitakse 20 minutit ja pärast seda loputatakse preparaadid kraaniveega (Raave-Sepp 2011).

1.3. Romanowsky värving

Enamik vereäige ja lümfotsüütide värvimiseks kasutatavaid värve kuuluvad Romanowsky laadsete värvide alla. Romanowsky värv on tegelikult laialt kasutatav nimetus erinevate liitvärvide kohta, mis koosnevad eosiinist, metüleensinisest ja metüleensinise laguproduktidest (joonis 4). Need annavad vererakke hästi visualiseerivat nn Romanowsky efekti: polükroomse värvingu, kus sinine katioon (tavaliselt asuur B) ja oranž anioon (tavaliselt eosiin Y) annavad

koos kasutades lisaks sinisele ja oranžile ka intensiivselt lilla tooni (ICSH reference... 1984). Kusjuures sama tulemust ei saa nende värvide järjestikkuse kasutamisega. Romanowsky värve on vereäige vaatamiseks kasutatud juba üle saja aasta. Metüleensinist ja eosiini kasutati vereäige vaatamiseks aastast 1888. Aastal 1891 avastasid Romanowsky ja Malachowski korraga, et kui kasutada eosiini koos aegunud metüleensinisega, saadakse värv, mis annab vererakkudele lilla värvi ning värvib ka malaaria parasiite paremini (Krafts 2011). Algselt valmistati selles stiilis värve, lastes metüleensinisel laguneda kontrollimatult laguproduktideks ning seega vaid spekulatiivset värvi täpse koostise üle. Romanowsky ise sai edukaid tulemusi vaid siis, kui kasutas metüleensinist, mille peal kasvas värvikomponente lammutav hallitus (Klerner 2010). Juba aastal 1907 kirjeldas Wilson tänapäevaste teadmistega kokkusobivalt eosiini, metüleensinise ja selle laguproduktide keemiat. Tema kirjeldusest saab teada, et eosiinid on broomidega halogeenitud dianioonsed (summaarse laenguga -2) fluorestsüinid, mis värvivad raku aluselised (katioonsed) komponendid punakas-oranžiks ilusa kollakas-rohelise fluorestsentsiga ja värvivad paremini kergelt happelises keskkonnas. Eosiinide puhul eristas ta kahte varianti, nagu tänapäevalgi: eosiin Y ja eosiin B. Eosiin Y on tetrabroom-fluorestsüin, eosiin B on dibromiid-fluorestsüin (Wilson 1907). Ka tänapäeval on kasutusel need kaks varianti eosiinist ning on leitud, et neil värvimaduste poolest olulist vahet ei ole (Horobin 2011). Metüleensinise ehk tetrametüüldiaminodifentiasiini puhul joonistas Wilson õigesti välja keemilised struktuurid, teadis et tegemist on katiooniga laenguga +1, mis värvib materjali siniseks paremini aluselises keskkonnas ja ta kirjeldas pikemalt meetodeid, kuidas tekitada metüleenvioletti ja tioniini, ehkki erinevaid asuure nimetas ta veel ühe sõnaga metüleenasuurideks (Wilson 1907). Tänapäeval suudetakse vahet teha erinevatel asuuridel ja kõiki komponente on saada puhtal kujul. On leitud, et kõige paremaid tulemusi andvad variatsioonid sisaldavad eosiini, asuur B-d ja mõnel juhul metüleensinist (Horobin 2011, Krafts 2011). ICSH (*International Committee for Standardization in Haematology*) on aastast 1984 defineerinud Romanowsky värvi kitsamalt kui värvi, mis sisaldab segu katioonsest asuur B-st ja anioonsest eosiin Y-st, mis on vesilahuses omavahelises suhtes 6:5 kuni 7:3 (ICSH reference... 1984). Aga lisaks sellele käivad ka Leishmani, Wrighti, Giemsa, May-Grünwaldi ja veel mõned variatsioonid Romanowsky värvide gruppi. Leishmani värv erineb teistest selle poolest, et sisaldab eosiin B-d ja värvikomponendid on lahustatud metanoolis. Giemsa lahus peaks sisaldama puhtast asuur B-d koos metüleensinisega ja eosiini, mis on lahustatud võrdses osas metanoolis ja

glütseroolis (Klernan 2010). Katioonide ja anioonide suhe on umbes 2:1 (College of... 2004). Giemsa töölause jaoks on ette nähtud kontsentratsiooni lahjendamine destilleeritud vees pH 6,5-7,0 juures (Klernan 2010).



Joonis 4. Romanowsky värvis esinevad kemikaalid (Klernan 2010).

Metüleensinise laguproduktid tekivad metüleensinise demetüleerimisel (asuurid, tioniin) ja deanimeerimisel (metüleenviolett). Laguproduktidel säilib kolmetsükliline struktuur, omavahel erinevad need peamiselt hüdrofiilsete omaduste poolest. Kõik nimetatud laguproduktid peale metüleenvioleti on tavatingimustes katioonsed (aluselised) ja värvivad aniooneid (happelisi) raku komponente: DNA, nukleoproteiinid, basofiili hepariiniirikkad graanulid. On teada, et asuur B on kõige olulisem anioonne komponent, mis tagab Romanowsky efektiks vajaliku lillaka tooni. Asuur A suudab samuti anda lillakat tooni, aga asuur A-ga ei teki värvides kontrasti basofiilse tsütoplasma ja tuuma vahel. Metüleensinine annab helesinise tooni RNA rikkale basofiilsele tsütoplasmale. Millest täpselt tekib Romanowsky efekt, ei ole veel täielikult teada. Värvimolekulidel on nii laenguga hüdrofiilseid kui ka ilma laenguta hüdrofoobsed kohti. Laenguga regioonide abil saavad kõik värvimolekulid kinnituda vastaslaenguga rakukomponendile. Kuna eosiinil on kaks negatiivse laenguga kohta, suudab see siduda enda külge nii katioonse värvi kui rakukomponendi

(Klerman 2010). Aga ka hüdrofoobsed omadused võivad värvingus rolli mängida, kuna hüdrofoobsed piirkonnad seonduvad omavahel. Värvid võivad leida biomolekuli hüdrofoobse koha millele kinnituda. Võimalik, et värvimolekulide hüdrofoobsed kohad seonduvad omavahel ning rakukomponendile kinnitub ühe molekuli asemel kompleks, andes uue tooniga värvi (Horobin 2011).

Värvumust mõjutavad peale komponentide veel erinevad tegurid. Aeg, mille vältel preparaadi värvuvad, on oluline nii värvingu intensiivsuse kui värvumuse poolest. Esmalt värvuvad preparaadi komponendid siniseks ning mida pikemat aega neid värvis hoida, seda rohkem lisandub lillakat tooni. Õhema kihiga preparaadi värvuvad kiiremini, paksema kihiga preparaadi, nt koematerjal, värvuvad aeglasemalt. Värvumisel on oluline ka aluseliste ja happeliste komponentide omavaheline suhe. Suhe on tavaliselt aluseliste komponentide kasuks 2:1 kuni 16:1, kusjuures aluseliste komponentide nõrk ülekaal ei taga head värvumust (Horobin 2011). Sellepärast kasutataksegi Giemsa tihti kahe etapilises värvimises koos teise Romanowsky värviga, mis peaks kindlasti sisaldama asuure (College of... 2004). Edukalt on katsetatud ka ühe sammulist Leishman-Giemsa värvimist, kus mitme järjestikuse värvimise asemel kasutatakse ühte nn kokteili, kuhu on segatud nii Leishmani kui Giemsa (Garbyal jt 2006). Lahustis peab olema vees lahustuvaid orgaanilisi aineid (nagu metanool), mis väldiks aluseliste ja happeliste värvide soolade sadestumist. See on ka põhjus, miks Giemsa töölahus kaua ei säili. Stabilisaatorina on kasutatud ka DMSO-d ja glütserooli (Horobin 2011).

Kui värvid on andnud õige Romanowsky efekti, värvuvad rakud kindlate kriteeriumite järgi, mille järgi saab ka värvingut hinnata. Erütrotsüüdid on roosad. Rakkude kromatiin/tuumad on sügavlillad. Neutrofiilide, trombotsüütide ja lümfotsüütide graanulid on asuuride poolt värvitud heledamaks lillakaks. Basofiilide spetsiifilised graanulid on sügavlillad ja eosinofiilide spetsiifilised graanulid on oranžid. Tsütoplasma on lümfotsüütidel sinine, monotsüütidel hallikas sinine, neutrofiilidel heleroosa ja trombotsüütidel sinakaslilla (College of... 2004, Houwen 2000).

1.4. Juhendi roll laboris

Iga protseduuri jaoks, mida tahetakse standardiseerida, on vaja etapilisi ja täpseid juhendeid. Kuna laborites on kasutusel hulk erinevaid analüüsimetoodikaid on oluline, et nende kõigi kohta leiduks ka juhendid. Esiteks on neid vaja töö reguleerimiseks, kuna ilma juhendita ei saa ka töötajale esitada kindlaid nõudmisi ja töötaja ei tea, mida ta tegema peab. Teiseks on neid vaja ka asutuse töö selgitamiseks: ilma etapiliste juhenditeta pole võimalik enda asutust akrediteerida. Nagu Eesti Akrediteerimiskeskuse kodulehel kirjas on, on akrediteering sisuliselt tõend asutuse või labori pädevuse kohta ja akrediteerimine on vajalik nii klientide usalduse võitmiseks ning tihti ka volituse taotlemiseks õigusaktidega reguleeritud sfääris (Eesti Akrediteerimiskeskus 2012). Põhjalikud nõuded sellele, millised peavad olema meditsiini laborite juhendid ja üldine kvaliteedisüsteem, on sätestatud meditsiini laboritele mõeldud ISO 15189 standardis. Laborilt nõutakse käsiraamatut, kus oleks viited kõigile protseduuridele. Kõik laboris läbiviidavad protseduurid peavad pärinema teaduslikest allikatest. Kui mõni protseduur on tekitatud labori siseselt, peab sellise protseduuri vajalikus ulatuses valideerima. Kõik kasutatavad protseduurid peavad olema korralikult dokumenteeritud ja dokumentatsioon kättesaadav kõigile, kes seda läbi viivad. Töökohal võib olla dokumendist lühendatud variant ehk nn tööjuhise, kuid see peab viitama täismahus dokumendile. Dokument peaks sisaldama protsessi eesmärki ja põhimõtet, uuritavat proovimaterjali, vajalikke reagente ja tarvikuid, protseduuri samme ja ohutusnõudeid (Medical laboratories... 2008). Nõuded labori kvaliteedisüsteemile ja juhenditele on põhjendatud, kuna kasutatakse keerulisi protseduure, millel on palju nüansse ja millest meditsiinilaborite puhul sõltub tihti inimeste tervis. Sel põhjusel on oluline mitte ainult juhendite teaduspõhisus, olemasolu ja info vaid ka ühene arusaadavus lugejale, kes selle järgi töötama peab. Oluline on juhenditesse kirjutada täpsustavaid detaile nagu mis, kes, millal, kus ja kuidas tegema peab. Michie ja Johnston leidsid arste jälgides, et arusaadavaid ja täpseid juhiseid järgiti 67% juhtudest ja küsimusi tekitavaid juhendeid vaid 36% juhtudest (Michie ja Johnston 2004).

2. METOODIKA

Uurimistöö meetodiks on empiiriline uuring, mille tulemused saadi TThK hematoloogia õppelaboris ajavahemikul 25. juuni – 21. september 2012 läbiviidud katsete abil. Katsete tulemusi (preparaatide värvingut) hindas ekspert Milvi Topmann, kes on suure kogemusega laboriarst ning hematoloogia õppejõud. Tema hinnangu põhjal koostati optimaalne värvingu protokoll. Edasi tehti protokollist ekspertide poolse tagasiside abil lihtsalt jälgitav juhend. Juhendi arusaadavust hindasid eksperdid, kelleks olid Tartu Tervishoiu Kõrgkooli bioanalüütiku õppekava tudengid. Juhend vormistati vastavalt TThK õppejõud Aivar Orava soovitudele ja ISO 15189 standardi eeskujul.

Uurimistöö viidi läbi järgmiselt:

- 1) Pandi kirjanduse ülevaate põhjal paika protokollid erinevate muutujatega, mida katsetada. Need muutujad olid:
 - a. värvumisajad;
 - b. loputamiseks kasutatav vesi;
 - c. loputusmeetod.
- 2) Viidi läbi kolm eksperimenti, igal kolm etappi:
 - a. vereäiete tõmbamine;
 - b. erinevate protokollide järgi värvimine;
 - c. eksperdi poolne hindamine.
- 3) Parimast protokollist tehti ekspertide poolse tagasiside abil juhend.

Värvumisaegadest kasutati Eesti suuremates laborites kasutusel olevaid aegu. See võimaldas läbi proovida lühemaid ja pikemaid aegu ning ka erinevaid aegade suhteid. Katsetatud ajad on toodud minutites. Neist esimene on preparaate Leishmani ja teine Giemsa värvis hoidmise aeg. Katsetatud ajad on: a) 3:4; b) 8:18; c) 7:20; d) 15:20.

Vee tüübid valiti vastavalt sellele, mis koolis kergesti kättesaadavad olid. Kokku kasutati kolme erinevat tüüpi, kusjuures iga pH mõõdeti enne katsete algust. Need vee tüübid on:

- 1) Tartu Veevärgi vesi (pH 7,2) ilma majapoolse filtreerimiseta, edaspidi linnavesi.

- 2) Tartu Veevärgi vesi, mida majas on filtreeritud hariliku mehhaanilise peenfiltriga ja seejärel pehmendatud NaCl-ga ning mida võeti katsetes labori kraanist (pH 7,8), edaspidi kraanivesi.
- 3) Laboris eraldi veepuhastussüsteemiga Elix Advantage töödeldud vesi (pH 8,5), mis peaks vastama ISO 3696 standardi poolt esitatud teise taseme puhtuse nõuetele, edaspidi laborivesi.

Loputusmeetodid olid:

- 1) Vannis loputamine, vannis hoidmine kestis umbes 20 sekundit, tulemuste tabelites 1, 2 ja 3 lühendatult vann.
- 2) Voolava vee all loputamine seni, kuni loputusvesi oli värvist puhas, tulemuste tabelites 1, 2 ja 3 lühendatult vool.

Tartu Tervishoiu Kõrgkoolis kasutusel olevad Giemsa värvi kontsentraat ja Leishmani värv on toodetud firma Merck poolt. Giemsa kontsentraat sisaldab 2,4 g/L eosiin Y-t ja 4,1 g/L metüleensinist koos täpsustamata asuuridega. Kõigis katsetes kasutati kontsentreeritud Giemsa värvist tehtud värsket töölahust, mida lahjendati laboriveega 1:10. Leishmani värv sisaldab 0,9 g/L eosiin Y-t ning 0,9 g/L metüleensinist koos tioniiniga.

Kuna kõiki muutujaid ja kõiki nende kombinatsioonidest tekkivaid protokolle oleks liiga töömahukas katsetada, tehti katsed kolme eksperimendina. Iga eksperimendi jaoks tuli vahetult enne värvimist valmistada vereägeid. Selleks piisas töö autori enda verest, mis võeti kolmel korral EDTA-ga katsutisse värskelt enne eksperimendi algust. Vereäged tõmmati vahetult enne kindla protokolliga katsetamist ning värvimine algas kohe, kui veri preparaadil oli kuivanud. Igas eksperimendis värviti äigepreparaadid erinevate protokollide järgi ja hinnati eksperdi poolt.

Esimeses eksperimendis värviti 12 preparaati erinevate protokollide alusel. Reagendi kulu vähendamiseks kasutati väiksemaid vanne, kus preparaate värviti ükshaaval. Katsetati ühte pikemat ja ühte lühemat aegade kombinatsiooni. Võrreldi erinevaid vee tüüpe. Katsetati ka loputusmeetodeid pärast Leishmani värvis hoidmist. Eksperdi hinnangu põhjal valiti välja paremaid tulemusi andnud protokollid oma muutujatega.

Teises eksperimendis jäeti alles esimesest värvingust paremad protokollid ja toodi sisse uued muutujad: kaks uut pikemat aegade kombinatsiooni ja kõik variandid erinevatest loputusmeetodite kombinatsioonidest pärast nii Leishmani kui Giemsa värvis hoidmist. Värviti 12 erineva protokolliga järgi, korraga 10 preparaati kelkudes. Hindamiseks esitati iga erineva protokolliga järgi värvitud juhuslik korralikult tõmmatud preparaat. Hinnangu põhjal jäeti valikusse vaid kaks adekvaatset tulemust andvat protokollid.

Kolmandas eksperimendis tehti lõplik valik kahe parema, sarnase protokolliga vahel. Valikusse olid jäänud ajad 8:18 ja sellega sarnane 7:20. Nende kahe vahel valimiseks ja protokolliga kinnitamiseks värvis mõlema protokolliga järgi ühe 10-perparaadise kelgu esiteks 3. kursuse tudeng Terje Lokk, seejärel samuti mõlema järgi ühe kelgu ka töö autor. Värvimine tudengi poolt oli vajalik selleks, et kinnitada protokolliga järgitavust ka teiste inimeste poolt. Kuna kolmanda kursuse tudengil oli juba eelnevaid kogemusi värvimisega, olid välistatud algajalikud vead ja värvimistulemus pidi olema sarnane töö autori värvimistulemusele. Ekspert hindas mõlema värvingu järgi kahte preparaati, teadmata seejuures, kumb seda värvitud oli. Hinnangute põhjal otsustati parima protokolliga kasuks.

Üheselt arusaadava juhendi koostamiseks tekitati juhendi sobilikkuse hindamise ekspertide valim. Valimisse kuulusid Tartu Tervishoiu Kõrgkooli bioanalüütika õppekava tudengid. Esiteks kolmanda kursuse bioanalüütik Terje Lokk, kelle kommentaaride ja küsimuste põhjal pandi lakooniliselt koostatud protokollist kokku juhendi esimene variant. Temalt koguti tagasisidet kolmanda eksperimendi vältel, kirjutades kommentaare ja jälgides tema tegevust. Teiseks kuulusid ekspertide valimisse teise kursuse bioanalüütika õppekava tudengid, kes ei olnud varem vere äigepreparaati värvitud ja hindasid juhendit „puhta lehena“. Nad jaotusid kahte rühma, kes pidid hematoloogia praktikumis värvima preparaate, toetudes vaid juhendile. Mõlema praktikumi ajal viibis kohal töö autor, kes jälgis, et nende tegevus kattuks sellega, mida oli tehtud eksperimentide käigus ja kogus nendepoolset tagasisidet. Saadud tagasiside põhjal tehti juhendi teine ja kolmas variant. Ekspertide poolne tagasiside on välja toodud tulemuste all.

3. UURIMISTULEMUSED

3.1. Katsete tulemused

Esimeses katses hindas ekspert 12 erineva protokoll järgi värvitud preparaati (tabel 1). Ekspert pidas teistest tunduvalt paremateks protokolle 9 ja 10 ning soovitas nende põhjal edasi minna. Välja jäetud said lühemad värvumisajad, edasi tuli minna pikematega. Parimaks loputusveeks osutus labori kraanivesi. Loputusmeetodi kohta selget järeldust ei saanud.

Tabel 1. Spetsialisti hinnangud esimese katse värvimistulemustele.

Nr	Värvingu protokoll	Eksperti hinnang
1.	3 min Leishman Vann (laborivesi) 4 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Neutrofiilide ja lümfotsüütide tuumad heledad. Neutrofiilide graanulid halvasti ilmestunud. Punaveri kahvatu. Basofiil punaste graanulitega. Trombotsüüdid heledad. Eosinofiilid ülevärvunud.
2.	3 min Leishman Vool (laborivesi) 4 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Sama leid mis preparaat 1-l.
3.	3 min Leishman Vann (kraanivesi) 4 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Neutrofiilide graanulid nähtavad – paremini kui 1 ja 2 preparaatidel. Eosinofiilid seal liiga punased. Trombotsüütidel tahaks veel tumedamat fooni. Erütrotsüütide foon hall (aga ka prep ka ise suhteliselt kehv).
4.	3 min Leishman Vool (kraanivesi) 4 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Neutrofiilide graanulid päris ilusti nähtavad. Lümfotsüüdid ilusad. Eosinofiilid veidi ülevärvunud. Erütrotsüüdid hallid – tahaks punakamat fooni (ei tea kuidas polükromaasia välja siin näeks).
5.	3 min Leishman Vann (linnavesi) 4 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Lümfotsüüdid, neutrofiilid eosinofiilid paremad kui eelmistel. Häirib kehv äigetechnika – ei saa paksemas piirkonnas hinnata.
6.	3 min Leishman Vool (linnavesi) 4 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Neutrofiilide graanulid nõrgalt värvunud. Eosinofiilid ülevärvunud.
7.	8 min Leishman Vool (laborivesi) 18m Giemsa Vool (kraanivesi)	Punane preparaat. Kõlbmatu värving: eosinofiilid ülevärvunud, neutrofiilide graanulid pole praktiliselt nähtavad.
8.	8 min Leishman Vann (laborivesi) 18 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Sama leid mis preparaat 7-l.
9.	8 min Leishman Vool (kraanivesi) 18 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Rakke kerge eristada! Silm puhkab! Granulatsiooni erinevus basofiilide ja neutrofiilide vahel hästi eristatav. Trombotsüüdid hästi eristatavad. Siit edasi minna! Ja võtke sinist värvi komponenti veidi-veidi vähemaks. Monotsüütide tsütoplasma peaks saama veidi heledamaks.

10.	8 min Leishman Vann (kraanivesi) 18 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Ka sobiv värvumus. Natuke ülevärvunud sinakas foon – lümfotsüütide ja monotsüütide tsütoplasma liiga basofiilsed.
11.	8 min Leishman, Vool (linnavesi) 18 min Giemsa Vool (kraanivesi)	OK värvumus, kuid neutrofiilide tsütoplasma foon roosa – vajab intensiivsemat granulatsiooni. Aga preparaati ennast oli vaid jupike!
12.	8 min Leishman, Vann (linnavesi) 18 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Basofiilselt ülevärvunud. Halb hinnata sellist jupikest!

Teises katses kommenteeris ekspert 12 erineva protokoll järgi värvitud preparaati (tabel 2). Ilmnes, et ajad 15:20 andsid liiga punaseid preparaate. Hinnangutel osutusid paremateks need preparaadid, mis olid pärast Leishmani värvis hoidmist vannis loputatud ja pärast Giemsa värvis hoidmist voolava vee all loputatud. Paremateks peeti 4. ja 8. protokoll.

Tabel 2. Eksperti hinnangud teise katse värvimistulemustele.

Nr	Protokoll	Eksperti hinnang
1.	8 min Leishman, Vool (kraanivesi) 18 min Giemsa Vann (kraanivesi)	Monotsüüdid hallimaks. Tugev rõhutatud granulatsioon. Eosinofiil on vähe punane, sinakas on juures. Erütrotsüüdid sinakad, aga OK. Trombotsüüdid tugevad. Monotsüüdid roosakad.
2.	8 min Leishman, Vool (kraanivesi) 18 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Lümfotsüüdi tsütoplasma veidi roosa. Monotsüüt liiga roosa. Erütrotsüüdid tulevad OK välja, võiks sinisemad olla. Palju violett/roosa. Monotsüüdid roosad.
3.	8 min Leishman, Vann (kraanivesi) 18 min Giemsa Vann (kraanivesi)	Monotsüüdid on head. Neutrofiilides vakuoolid. Eosinofiilid OK. Lümfotsüütides näha asurofiilne sõmerus, tsütoplasma võiks olla sinakam. Halvem kui 4.
4.	8 min Leishman, Vann (kraanivesi) 18 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Toksiline granulatsioon on OK, näha osades. Neutrofiilid head. Monotsüüdid OK. Basofiilsus tuleb välja. Eosinofiilid hästi eristatavad.
5.	7 min Leishman, Vool (kraanivesi) 20 min Giemsa Vann (kraanivesi)	Neutrofiilidel tugev granulatsioon. Eosinofiilidel on sinine toon. Monotsüüdid on roosakad. Erütrotsüüdid hallikas-sinised. Lümfotsüüdid on hallid. Foon on sinakas.
6.	7 min Leishman, Vool (kraanivesi) 20 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Erütrotsüüdid head, sinakad. Monotsüüdid roosad.
7.	7 min Leishman, Vann (kraanivesi) 20 min Giemsa Vann (kraanivesi)	Eosinofiilid punased, OK. Monotsüüdid hallid, OK. Lümfotsüüdid liiga roosakad. Neutrofiilidel liiga punakas tsütoplasma.

8.	7 min Leishman, Vann (kraanivesi) 20 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Erütrotsüüdid on roosad (OK), tsütoplasma hea. Granulatsioon OK. Segmenttuumsed OK. Eosinofiilid head! Puna hea!
9.	15 min Leishman, Vool (kraanivesi) 20 min Giemsa Vann (kraanivesi)	Preparaat on punane!
10.	15 min Leishman, Vool (kraanivesi) 20 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Preparaat on punane!
11.	15 min Leishman Vann (kraanivesi) 20 min Giemsa Vann (kraanivesi)	OK, punasus normaalne. Erütrotsüüdid halvasti värvunud.
12.	15 min Leishman, Vann (kraanivesi) 20 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Trombotsüüdid head. Monotsüütides tsütoplasma liiga punane, lümfotsüüdid liiga punased.

Kolmandas katses hindas ekspert kahe parema protokoll järgi erinevate värvivate poolt värvitud nelja preparaati (tabel 3). Võrreldes selgus, et protokollide peamine vahe seisneb selles, et 8:18 on natuke sinakam (basofiilsem) ja 7:20 punakam (eosinofiilsem). Ekspert hindas mõlemaid adekvaatseks, kuid paremaks luges natuke basofiilsemalt värvunud 8:18, kus tuli paremini välja reaktiivse lümfotsüüdi serva basofiilne rõhutatus. Olulist erinevust kahe värvija tulemuste vahel ei ole.

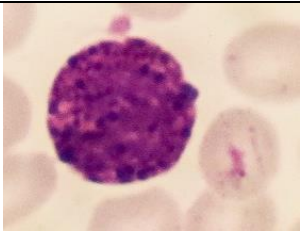
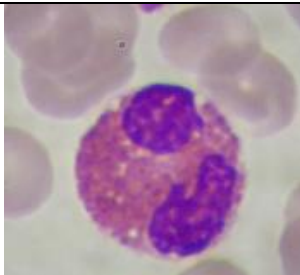
Tabel 3. Eksperti hinnangud kolmanda katse värvimistulemustele.

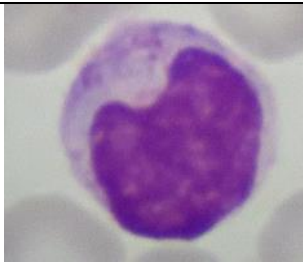
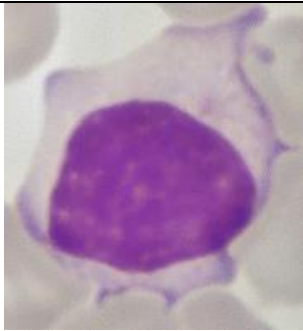
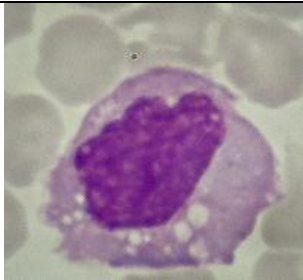
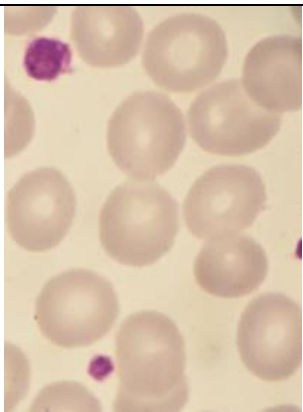
Nr (värvija)	Protokoll	Eksperti hinnang
1. (Terje)	8 min Leishman Vann (kraanivesi) 18 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Eosinofiilid normaalsed. Granulatsioon nähtav. Neutrofiilidel granulatsioon erinev (st erinevus rakkude vahel nähtav). Basofiil normaalne. Foon on natuke rohkem sinine kui 3-l. Sinakas on isegi parem. Sinine tuleb hästi esile. Erütrotsüüdid on roosakas-hallid.
2. (Aivar)	8 min Leishman, Vann (kraanivesi) 18 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Natuke sinakas, aga pole oluline. Trombotsüüdid on selgelt eraldatavad. Monotsüüdid selged. Segmentidel granulatsioon selge. Lümfotsüüdid normaalsed. Eosinofiilid tumedad, kuna on paksus kohas, aga eristatav. Trombotsüütide sõmerus hästi näha.
3. (Terje)	7 min Leishman Vann (kraanivesi) 20 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Erütrotsüüdid roosakamad. Reaktiivne lümfotsüüt on liiga roosa. Ääred peaksid olema basofiilse rõhuga. Monotsüüdid ka natuke punakad. Eosinofiilid ilusad.
4. (Aivar)	7 min Leishman Vann (kraanivesi) 20 min Giemsa Vool (kraanivesi)	Selgem kui 3. Trombotsüüdid hästi eralduvad, sama. Üldse pole olulist vahet. Mõlemad adekvaatsed. Eosinofiil on oranžim, lõhe-kalamari (aga ka õhemas kohas, nii et ei näita värvumise kvaliteeti).

3.2. Valitud protokoll järgi värvitud preparaadil ilmnevad tunnused

Parima protokoll järgi värvitud rakkudel ilmnesid olulised tunnused, mille järgi värvumist hinnata. Tabelis 4 on toodud 1000x suurendusega läbi õli-immersioon objektiivi tehtud fotod kolmandas eksperimendis värvitud preparaadilt, kus rakud on iseloomulikult värvunud. Juures on tunnuseid lahtiseletavad kommentaarid eksperdi poolt.

Tabel 4. Juhendi järgi värvitud rakkude fotod koos eksperdi kommentaaridega.

Basofiil	
	Tuum on mõõdukalt violetne, ebaühtlase liigendusega, raskesti eristatav tsütoplasmaatiliste graanulite tõttu. Kromatiin on tihenendunud ja määrdunud ilmega, sest kromatiini ja parakromatiini vahelduvus on ebaselgelt eristatav.
	Tsütoplasma on kerge roosaka varjundiga.
	Graanulid on suured, erineva kuju ja suurusega sügav-violetsed kuni mustjad. Korrapärase paigutusega, katavad tuuma.
	Puudu basofiili ümbritsev „halo“.
Eosinofiil	
	Tuum on roosaka varjundiga, mis on heledam kui neutrofiilide tuumadel. Kahesegmendiline nagu tavaliselt. Segmendid on ühendatud peene filamentniidikesega. Kromatiini ja parakromatiini vaheldumised on selgelt eristatavad.
	Tsütoplasma on värvitu.
	Spetsiifilised graanulid on valgustmurdvad oranz-roosakad, ühesuguse suurusega, ümarad. Tsütoplasmas paigutunud ühtlaselt, ei kata tuuma.
Neutrofiil	
	Segmenttuumne neutrofiil, tuum on sügav violetne, 3 loobulisega. Kromatiin on jämedateraline ja kämpunud. Kromatiini ja parakromatiini vaheldumised on hästi eristatavad.
	Tsütoplasma on heleroosa, rohke granulatsiooni tõttu halvasti nähtav.
	Graanulid on rohkearvulised väikesed ühesuurused roosakas-lillad spetsiifilised graanulid, mis annavad tsütoplasmale sõmerja väljanägemise.

Normaalne lümfotsüüt	
	Tuum on keskmiselt violetse värvivarjundiga, tuumasõmerusega, normaalne. Kromatiini ja parakromatiini vaheldumised on ebaselgelt eristatavad, nagu väikeste lümfotsüütide puhul tavaline.
	Tsütoplasma on helesinine.
	Tsütoplasmas õrn azurofiilne sõmerus, mis esineb osades väikestes lümfotsüütides.
Reaktiivne lümfotsüüt	
	Tuum normaalne: mõõdukalt violetse värvivarjundiga, suur, väljendunud ebakorrapärasus. Kromatiinis helenenud sõmerus. Tuumake pole visualiseeritav, kuna pole hõrenenud tuumakromatiinjoonist.
	Tsütoplasma mõõduka perifeerse basofiilse rõhutatusega.
	Graanuleid ei tähelda.
Monotsüüt	
	Tuum mõõdukalt violetne, ovaalse lobuleeritud kujuga. Kromatiin tserebriformne, kromatiini-parakromatiini vaheldumised selgesti eristatavad.
	Tsütoplasma suitsjas-hall.
	Graanulid on halvasti nähtavad, moodustavad „azurofiilse tolmu“.
	Mõõdukalt vakuole.
Trombotsüüt / erütrotsüüdid / foon	
	Trombotsüüdid sisaldavad peent punakas-violetset azurofiilset granulatsiooni, on ilma tuumata, moodustavad erütrotsüüdi diameetrist 1/4-1/3. Paigutunud hajusalt erütrotsüütide vahele, agregaatideta. Kerge trombotsüütide anisotsütoos.
	Erütrotsüüdid värvunud roosakalt. Kerge anisotsütoos.
	Fooni värvumus hea. Ei esine värvisadet.

3.3. Ekspertide tagasiside juhendi kohta

Tagasiside kolmanda kursuse tudengilt, kes värvis lakoonilise protokoll järgi:

- Mis reagente ja tarvikuid on vaja tööks valmis võtta?
- Kas ühest vannist tuleb teise otse tõsta?
- Kas värve peab pipeteerima?
- Värv oleks mugav pipeteerida automaatpipetiga.

Tagasiside teise kursuse tudengilt, kes värvisid juhendi esimese variandi järgi.

- Juhendi alguses peaks olema lühitutvustus, eesmärk.
- Ettevalmistuse esimest sammu ei ole vaja kirjutada.
- Kui hoiatused on juhendi lõpus, ei loe neid keegi enne värvima hakkamist.
- Mis temperatuuril vesi peab olema?
- Mida teha, kui on vaja korrata värvida üle 10 preparaadi?
- Kust värvid jms võtta?
- Kas Giemsa värvi ja vett peab omavahel segama?
- Kuidas toimub nõrutamine?
- Kuidas toimub kaldnurga all kuivama tõstmine?
- „8 minutit Leishmaniga vannis“ on puuduliku infoga lause.
- Mis tähendab, et vannidel peavad peal olema klaasid?
- Kui kiiresti pärast kuivamist tuleks preparaadid värvida?

Tagasiside teise kursuse tudengilt, kes värvisid juhendi teise variandi järgi:

- Mis siis saab, kui vannid ei ole sildistatud?
- Mis siis saab, kui midagi värviga kokku saab?
- Kas lahjendus 1:10 tähendab üks osa Giemsat ja 10 osa vett?
- Hüüumärke on liiga palju.
- Mida kelguga loputamisel täpselt tegema peab?
- Kui nõrutamised on eraldi tegevused, võiks need olla eraldi punktidenä välja toodud.
- Kui kaua tuleb voolava kraanivee all loputada?
- Mis on preparaadi loetav osa?
- Tähelepanu juhiti ka õigekirjale ja korduvatele väljenditele.

Tähelepanekud, mille tõttu juhendit täiendati:

- Kelk tõsteti ühest värvist teise, ilma vahepeal nõrutamata.
- Voolava vee all loputati väga tagasihoidlikult.
- Tudengid kasutasid Giemsa töölahuse valmistamiseks mõõtsilindrit.

4. ARUTELU

Proovitud said värvumisajad ja loputamise variandid. Kuna õnnestus leida värvimisprotokoll, mis toob välja kõik olulised tunnused, jäid proovimata tagavaraks jäetud muutujad. Erinevatel põhjustel tagavaraks jäetud muutujad on eelfikseerimine, fosfaatpuhvri kasutamine, loputusvee temperatuur, loputusvees pikemalt hoidmine, vahepeal õhu käes kuivada laskmine, teistsugused lühikesed ajad, Leishmani värvist Giemssasse otse üle tõstmine ja Giemsa töölahuse erinevad variandid. Eelfikseerimine toimuks metanoolis ja kui arvestada, et õppelaboris värvivad tudengid, võib selle kasutamine olla ohtlik. Juba kerge kokkupuude vee või isegi veeauruga rikub metanooli kvaliteedi. Pealegi on Leishmani värvis ~90% metanooli. Fosfaatpuhver oleks koolile rahaline lisakulutus ja teeks kogu tegevuse töömahukamaks. Loputusvee temperatuuri jälgimine on keeruline ja raskesti standardiseeritav. Ülejäänud muutujad oleksid töö lihtsalt tunduvalt mahukamaks teinud. Seega on hea, et korraliku protokolliga saamiseks ei pidanud katsetama tagavaraks jäetud muutujaid.

Loputusmeetodid ja värvimisajad on siin töös võetud Eesti suuremate meditsiinilaborite juhenditest ning omavahel sobivalt kombineeritud. Täiesti originaalne on aga see, et Giemsa töölahus valmistati veega, mille pH on 8,5. Kirjandusallikate põhjal peaks Giemsa töölahuse pH olema alla seitsme, kergelt happeline ja kõigis eeskujuks võetud juhendites on nõutud töölahuse valmistamiseks puhvri kasutamine. Selle järgi hinnates ei pruugiks siin kasutatud töölahust isegi Giemsa töölahuseks nimetada, kuna tegemist on uue variatsiooniga. Katsetest selgunud tingimustes värvib ka see uus variatsioon hästi.

Esimesest eksperimendist võib üldistada, et TThK õppelaboris Leishman-Giemsa meetod lühikeste värvimisaegadega ei tööta. Kuna algseks probleemiks oli neutrofiilsete graanulite värvumine, mis värvuvad lillakaks ja lillakas värv tekib pikema värvumisaja juures, ei ole see tulemus üllatav. Samas õnnestuvad lühikeste aegadega värvingud Lääne-Tallinna Keskhaiglas ja Põhja-Eesti Regionaalhaiglas. Neis mõlemas kasutatakse nii värvide vaheliseks loputuseks kui Giemsa töölahuseks fosfaatpuhvrit, nii et põhjus võib olla selles.

Ühegi kasutatud vee pH ei olnud <7, kuid mida kõrgem oli loputusvee pH, seda vaevalisemalt jäid külge aluselised värvid ja seda ülevärvunumad olid eosinofiilsed komponendid. Kõige

madalama kasutatud pH-ga vee puhul värvusid preparaadid liiga basofiilselt ja jätsid petliku toksilise granulatsiooni (neutrofiilide graanulid on intensiivselt tumedad sinakad) mulje. Kirjandusallikate põhjal peaksid kõrgema pH juures aluselised värvid tugevamalt värvima. Kuna siin töös on katsetatud erineva pH-ga loputusvee tüüpe ja kirjandusallikates räägitakse pH-st värvimiskeskonnas, on loogiline järeldada et kõrgem pH „avab“ rakukomponentidel happelised (aluseliste värvide) sidumuskohad, lastes värvil paremini kinnituda ja loputamisel ka paremini eralduda. Võib arvata, et loputusvee pH madaldamine puhvri abil ei oleks midagi parandanud vaid pigem tekitanud üleliigset basofiilset värvingut. Samas tuleb ka ära mainida, et pole võimalik kindlalt öelda, kas mõju tuli pigem pH-st või teistest vee töötlemisel muudetud omadustest.

Esialgsed preparaadid olid tõmmatud liiga väikese hinnatava osa ehk „sabaga“. Kommentaarides on neid nimetatud „juppideks“. Võimaliku kvaliteetse värvingu puhul oleks see oluline probleem, kuna kõik värvumise omadused ei paista halva äige tõttu välja ja see segab eksperdi poolset hindamist. Kuna liiga lühikese sabaga preparaadid olid nagunii ka ilmselgelt halvasti värvunud, ei ole see aga oluline. Kvaliteetsed värvingud said kinnitust korralikult tõmmatud preparaatidel.

Loogilist seletust sellele, mis vahe on vannis ja jooksva vee all loputamisele ei õnnestunud leida. Õiget loputusmeetodit oligi kõige raskem valida. Nii Leishman kui Giemsa on variatsioonid Romanowsky värvist, mis on tegelikult liitvärv. Erinevus võib olla tingitud metüleensinise laguproduktide erinevast hüdrofiilsusest ja oleks väga töömahukas hakata uurima, milliselt värvimolekulid millise loputusmeetodiga kergemini maha tulevad. Praktilistest katsetest selgus aga, et loputusmeetod mõjutab kindlasti värvumust. Nõus ~20 sekundit loputamine pärast Leishmani värvis hoidmist ja jooksva vee all loputamine pärast Giemsa värvi töötab kõige kindlamalt. Kahe värvi vahel kraani all hoidmine ei mõjutanud mõnel juhul oluliselt tulemust, andis mõnel juhul leukotsüütidele punaka varjundi ja ühel juhul erütrotsüütidele sinaka varjundi. Kuna see võib aga ei pruugi anda punakat värvumust, on selle kasutamine ebakindlam. Pärast Giemsa värvis hoidmist vannis loputamine andis ainult ühel juhul enam-vähem normaalse tulemuse, seega sobis paremini lõpus vee all loputamine.

Kuna enne katsete algust toimus labori kolimine ühest koolimajast teise ja seetõttu muutus ka kasutatav kraanivesi, mängis tulemustes kindlasti rolli uude majja minek. On väga võimalik, et vanas koolimajas oleks paremini töötanud mõni teine protokoll. Viimati kasutatud protokollist erinesid peamiselt vee tüüp ja loputusmeetod, aegade erinevus on vaid mõni minut.

Parimat protokollit katsetati juba esimeses eksperimendis, kuid esimene kord olid selle järgi värvunud rakud natuke liiga basofiilsed ja sellele ei saanud veel pidama jääda. Põhjus, miks sama meetod andis edaspidi rahuldavaid tulemusi, võib olla kas juhuslik või seda võis mõjutada ka suuremas vannis koos teiste preparaatidega värvimine. Kolmandas katses värvisid kaks eri inimest terve kelgutäie preparaate nii parima kui ka teise, sarnase protokollit järgi ja mõlemal inimesel värvusid preparaadid valitud protokollit järgi korralikult. Ka teise kursuse poolt värvitud preparaadid õnnestusid. Algne probleem, neutrofiilsete graanulite mittevärvumine, sai lahendatud. Seega võib protokollile kindel olla.

Pärast protokollit on uue tagasiside põhjal tulnud kolm varianti juhendist, iga variant täiustatud. Sooviti tunduvalt rohkem infot ja ka kirjandusallikatest tuleb välja, et kõigi detailide olemasolu ja küsimuste tekke ennetamine määravad ära selle, kas juhendit üldse üritatakse järgida. Osad tudengid soovisid rohkem infot, teised vähem aga konkreetsemat, seega kõiki ei ole võimalik täielikult rahuldada. Kuna oluline on see, et juhend oleks arusaadav kasutajale ja sisaldaks kõike, mida neil tegutsemiseks vaja teada on, pandi juhendi koostamisel peamine rõhk sellele, et lõpuks saaksid sisse kõik vajalikud detailid ja et need oleksid üheselt mõistetavad. Ohutusnõuded ja nõuannetused pandi töökäigust ettepoole, et neid ei ignoreeritaks. Täpsustusi selle põhjal, mida tudengid juhendit lugedes valesi tegema hakkasid, oli vaid kaks. Lõpliku juhendi koostamisel võeti arvesse lisaks arusaadavusele ka korrektset vormistust ja see on kooli kvaliteedi käsiraamatus viitega ÕL-KH-3. Juhendite arengut saab jälgida lisas, kus on näha esimene, teine ja lõplik variant juhendist.

Nagu ISO 15189 standardis on välja toodud, võivad töökohal olla ka lühendatud juhendid. Värvimisprotseduuri puhul vajavad inimesed, kes värvivad esimest korda, rohkem infot. Need, kes on juhendiga tuttavad ja selle järgi juba värvunud, vajavad ainult üksikuid detaile meeldetuletuseks. Liigne info, mida nad juba teavad, segaks juhendi jälgimist. Seetõttu on

juhis koostatud nii, et olulisemad punktid, mida vaatab kogenum värvija, on välja toodud rasvaselt. Tudengitel ei olnud selle mõtte vastu midagi, kuid juhendi teise variandi hindamisel leiti, et seda pole vaja ka eraldi välja kirjutada (teise variandi ettevalmistuse punkt üks).

Värvi oleks mugav pipeteerida automaatpipetiga. Ehkki töö autor on seda teinud eksperimentide käigus, tohib värve pipeteerida vaid klaasist pipetiga. Põhjus on selles, et kui värvivad vähese kogemusega tudengid, on oht, et värvil lastakse pipeti sisse minna. Seega jäi automaatpipeti kasutamine keelatuks. Samas tegid tudengid enda töö lihtsamaks, võttes kasutusele mõõtsilindri.

Lahjendus 1:10 tekitas segadust. Et teha lahjendust 1:10, tuleb võtta üks osa värvi (lahustatavat ainet) ja üheksa osa lahustit. Kui seda ei tea, võib peale vaadates jääda mulje, et on vaja võtta üks osa lahustatavat ainet ja kümme osa vett. Et tudengid teaksid kindlalt millist lahjendust teha, on kaasas ka konkreetne näide sobivast värvi ja vee hulgast. Valearusaama vältimiseks on juhendist eemaldatud ka sõna „suhtes“. Segadust tekitas ka sõna „nõrutamine“ juhendis. Algselt tõstis tudeng kelgu salvräti kohal ühest vannist teise. Kuna oluline on just preparaatidelt liigse vedeliku eemaldamine, on juhendisse kirjutatud nõrutamise eesmärk ja soovitus kelgu servi salvrätiga kuivatada.

Siin töös on uuritud, kuidas värvuvad katsetatud protokollide abil ühe inimese mittepatooloogilisest verest tehtud preparaadid. Edaspidistes uurimustes oleks kasulik välja selgitada ka värvimismeetodi sobivus patoloogilise vere vaatamiseks, kuna seal leidub rohkem raku tüüpe. Kasulik oleks uurida ka seda, kui kaua värvid säilivad ehk kui tihti neid vahetama peab.

5. JÄRELDUSED

- 1) Parimaid tulemusi andis variant, kus värvimisajad olid 8:18, värvide vahel loputati vannis ja pärast värvimist kraani all ning parimaks loputusveeks osutus kraanivesi.
- 2) Saadud protokollist tagasiside abil koostatud korrektselt vormistatud juhend on välja toodud lisas 4. Eksperdid leidsid peamiselt et juhend peab sisaldama rohkem infot. Tegevuse kirjeldus oli arusaadav, juhendi järgi tegutsemisel esines vaid üksikuid vigu.

ALLIKALOEND

College of Physicians and Surgeons of Alberta. (2004). Blood Film Staining Effects. Alberta: Alberta Laboratory Quality Enhancement Program.

Craig, F., E., Foon, K., A. (2008). Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, 111:3941-3967.

Eesti Akrediteerimiskeskus (2012). Miks on akrediteerimine vajalik? <http://www.eak.ee/?pageId=49> (20.12.2012).

Froom, P., Havis, R., Barak, M. (2009). The rate of manual peripheral blood smear reviews in outpatients. *Clin Chem Lab Med*, 47(11):1401-1405.

Garbyal, R. S., Agarwal, N., Kumar, P. (2006). Leishman-Giemsa cocktail. *Acta cytologica*, 50:4.

Gulati, G., L., Alomari, M., Kocher, W., Schwarting, R. (2003). Criteria for Blood Smear Review. *Laboratori Hematology*, 33:374-377.

Horobin, R. W. (2011). How Romanowsky stains work and why they remain valuable – including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotech Histochem*, 86(1):36-51.

Houwen, B. (2000). Blood Film Preparation and Staining Procedures. *Laboratory Hematology*, 6:1-7.

International Committee for Standardization in Haematology (1984). ICSH reference method for staining of blood and bone marrow films by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). *British Journal of Haematology*, 57:707-710.

Jerjomina, J. (2011). Vereäige värvimine. Tallinn: Põhja-Eesti Regionaalhaigla.

Klerner, J., A. (2010). On Chemical Reactions and Staining Mechanisms.

Lantis, K. L., Harris, R., J., Davis, G., Renner, N., Finn, W., G. (2003). *American Journal of Clinical Pathology*, 119:656-662.

Lopatina, G., Mardi, M. (2009). Vere äigepreparaatide valmistamine ja hindamine. Tallinn: Lääne-Tallinna Keskhaigla.

Peterson, P., Blomberg, D. J., Rabinovich, A., Cornbleet, P. J. (2001). Physician Review of the peripheral Blood Smear: When and Why. *Laboratory Hematology*, 7:175-179.

Raave-Sepp, A. (2009). Juhend: Vereäige värvimine. Tartu: Quattromed HTI.

Raave-Sepp, A. (2011). Juhend: Vereäige värvimine. Tartu: Quattromed HTI.

Rätassepp, K. (2005). Hematoloogilise rakuloendaja 3-osalise leukogrammi võrdlus mikroskoopiaga. Tartu Tervishoiu Kõrgkool, bioanalüütiku õppekava. Tartu. Lõputöö.

Kopcinovic, L., M., Pavic, M. (2012). Platelet satellitism in a trauma patient. *Biochemica Medica*, 22(1):130-3.

Krafts, K., P., Hempelmann, E., Oleksyn, B., J. (2011). The color purple: from royalty to laboratory, with apologies to Malachowski. *Biotechnic & Histochemistry*, 86:7-35.

Kuusik, M. (2010). Vereäige hindamine Cellavision DM96 meetodil. Tartu Tervishoiu Kõrgkool, bioanalüütiku õppekava. Tartu. Lõputöö.

Medical laboratories – Particular requirements for quality and competence EVS-EN ISO 15189:2008. (2008). Tallinn: Eesti standardikeskus.

Michie, S., Johnston, M. (2004). Changing clinical behaviour by making guidelines specific. *BMJ*, 328(7435):343-345.

Narasimha, A., Kumar, H., Prasad, C. (2008). Anticoagulant induced artefacts in peripheral blood smears. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 24(2):43-48.

Theml, H., Diem, H., Haferlach, T. (2004). *Color Atlas of Hematology*. New York: Thieme.

Tkachuk, D. C., Hirschmann, J.V. (2007). *Wintrobe's Atlas of Clinical Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Van Cott, E. M., Lewandrowski, K. B., Patel, S., Grzybek, D. Y., Patel, H. S., Fletcher, S. R., Kratz, A. (2003). Comparison of Glass K3EDTA versus Plastic K2EDTA Blood Drawing Tubes for Complete Blood Counts, Reticulocyte Counts, and White Blood Cell Differentials. *Laboratory Hematology*, 9:1.

Preparaatide värvimine. Tartu: Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabor

Wilson, T., M. (1907). On the chemistry and staining properties of certain derivatives of the methylene blue group when combined with eosin. *The Journal of Experimental Medicine* 9(6).

LISAD

I Värvimisprotokoll:

Võta valmis 3 vanni, kelk, stopper, Leishmanni ja Giemsa värvid, dest vesi, pipetid.

1. Vala esimesse vanni Leishmanni värvi.
2. Lase teise vanni labori kraanist vett.
3. Tee kolmandasse vanni Giemsa töölalus: sega Giemsa kontsentrati ja destilleeritud vett suhtes 1:10 (ühte vanni sobib 180mL dest vett ja 20mL kontsentreeritud Giemsat).

Värvimiskäik:

1. 8 minutit Leishmanniga vannis.
(nõrutada)
2. Loputada korra (~20 sekundit) kraaniveega vannis.
(nõrutada)
3. 18 minutit Giemsa vannis.
4. Loputada jooksva kraanivee all.
5. Tõsta preparaadid kuivama (soovitavalt kaldnurga all)

NB!

- Pane preparaadid värvi kohe pärast kuivamist!
- Vannid on sildistatud, pane värvid õigesti vannidesse!
- Pane värve/vett vanni piisavalt, et preparaadid oleks vannis täielikult kaetud!
- Värve ei tohi pipeteerida automaatpipetiga!
- Nõruta kelgu ümbertõstmiste vahel kelku salfrätiku kohal!
- Hoia vannidel klaase peal!

II Värvimisprotokoll

Käesolev juhis on Leishmann-Giemsa värvingu protokoll: mõeldud vereäige preparaadi värvimiseks ja optimeeritud kasutamiseks TThK hematoloogia õppelaboris.

Ettevalmistus:

1. Kui värvid esimest korda, loe juhis lõpuni läbi! Kui mitmendat, võid lähtuda rasvasest kirjast.
2. **Võta valmis** 3 vanni, kelk, stopper, Leishmanni ja Giemsa värvid, dest vesi, pipetid, mõõtsilinder! Õppelaboris on metallkandikul kõrvale pandud spetsiaalsed värvinõud.
3. Vala **esimesse vanni Leishmanni** värvi!
4. Lase **teise vanni labori kraanist** jahedat-toasooja vett!
5. Tee **kolmandasse vanni Giemsa töölahus**: Pipeteeri Giemsa kontsentraati ja destilleeritud vett suhtes 1:10! Ühte vanni sobib **180mL dest vett ja 20mL kontsentreeritud Giemsat**.
6. Kontrolli üle, et **preparaatidel on nimed** harilikuga peale kirjutatud.
7. **Aseta kuivanud preparaadid kelgule** ühte pidi. Kui on vaja värvida korraga üle 10 preparaadi, võib kaks preparaati panna kelgu ühte vahesse nii, et tagumised (so ilma vereta) pooled on vastamisi.

Värvimiskäik:

1. Hoia kelku **8 minutit Leishmanni** värviga vannis!
(**Nõruta** salfräti peal!)
2. **Loputa** kelku korra (~20 sekundit) kraaniveega vannis!
(**Nõruta** salfräti peal!)
3. Hoia kelku **18 minutit Giemsa** värviga vannis!
4. **Loputa jooksva kraanivee all** kuni oled kindel, et oled kõik alusklaasid mõlemalt poolt loputanud ja paistab, et värvi enam ei tule! Ära karda vett survega lasta.
5. **Tõsta preparaadid kuivama!** Tagumise poole võib salfrätiga kuivatada. Soovitatavalt toetada nad kaldnurga all seljaga vastu tuge, nii, et loetav osa (saba) jääks ülespoole.

NB!

- Pane värvid õigesti vannidesse! TThK õppelaboris on vannid sildistatud.
- Hoia vannidel õiged klaaskaaned peal!
- Pane värve/vett vanni piisavalt, et preparaadid oleks vannis täielikult kaetud!
- Pane preparaadid värvi 4h jooksul pärast kuivamist!
- Kelgu ümbertõstmiste vahel kelku salfrätiku peal nõrutades võid natuke kuivatada kelgu välispinda. Oluline on, et võimalikult vähe vedelikku ühest vannist teise kaasa tuleks!
- Kontrolli pärast värvimist üle, kummal pool materjal on! Ära seda kogemata maha tõmba!
- Ole värvidega ettevaatlik! Kanna kindlasti kindaid ja kitlit! Värve ei ole lubatud pipeteerida automaatpipetiga. Värvine pipett loputa pärast kasutamist ja toeta see kuivama salfräti kohale! Värv on kuum laava!

TARTU TERVISHOIU KÕRGKOOL				Dokumendi liik:	
Kvaliteedikäsiraamat				Juhend	
Bioanalüütiku ja tervisekaitse õppekava laborid				Tähis	Viide
				ÕL-KH	ÕL-KH-3
Koostas:	Aivar Uus	Kinnitas:		Version 1	
Kuupäev:	12.21.2012	Kuupäev:			

Vereäige värvimine Leishmann-Giemsa meetodil

1. Eesmärk

Käesolev juhend on mõeldud täisverest tõmmatud äigepreparaadi värvimiseks Leishman-Giemsa meetodil Tartu Tervishoiu Kõrgkooli hematoloogia õppelaboris. Kui juhend korrektselt järgida, värvuvad vererakud Romanowsky efektiga ja on mikroskopeerimisel kergesti eristatavad.

2. Tegevusjuhend

a. Ettevalmistus:

- Reagendid ja vahendid:** Võta valmis 3 vanni, kelk, stopper, Leishmani ja Giemsa värvid, Elix Advantage'i laborivesi, pipetid, mõõtsilinder. Õppelaboris on metallkandikul kõrvale pandud spetsiaalsed värvinõud.
- Kui vannid on sildistamata, siis sildista. Värvid peavad olema õiges vannis!
- Vala **esimesse vanni Leishmani** värvi.
- Lase **teise vanni labori kraanist** leigut vett.
- Tee **kolmandasse vanni Giemsa töölahus**: Lahjenda Giemsat laboriveega 1:10. Ühte vanni sobib pipeteerida **180mL laborivett ja 20mL kontsentreeritud Giemsat**.
- Kontrolli üle, et **preparaadid oleksid markeeritud** harilikuga pliiatsiga.
- Aseta kuivanud preparaadid kelgule** ühte pidi. Kui on vaja värvida korraga üle 10 preparaadi, võib kaks preparaati panna kelgu ühte vahesse nii, et tagumised (so ilma vereta) pooled on vastamisi.
- Alusta värvimisega tunni aja jooksul pärast preparaatide kuivamist!

NB!

- *Hoiat vannidel õiged klaaskaaned peal!*
- *Pane värve/vett vanni piisavalt, et preparaadid oleksid täielikult kaetud!*
- *Ole värvidega ettevaatlik! Värv on määriv ja mürgine. Kanna kindlasti kindaid ja kitlit! Värve ei ole lubatud pipeteerida automaatpipetiga. Värvine pipett loputa pärast kasutamist ja toeta see kuivama salvrätik kohale! Värske värvi saab veel des vahendiga maha pesta. Värv on „kuum laava“!*

b. Töökäik:

1. Hoia kelku **8 minutit Leishmanni** värviga vannis.
2. **Nõruta** salvräti peal. Võid ka kelgu servi kergelt kuivatada. Oluline on, et ühest vannist teise tuleks võimalikult vähe vett kaasa.
3. **Loputa** kelku kraaniveega vannis 20 sekundi vältel nõrgalt üles-alla liigutades.
4. **Nõruta** nagu punktis 2.
5. Hoia kelku **18 minutit Giemsa** värviga vannis.
6. **Loputa jooksva kraanivee all** kuni oled kindel, et oled kõik preparaadid mõlemalt poolt loputanud ja loputusvees ei ole näha värvi. Ära karda vett survega lasta.
7. **Tõsta preparaadid kuivama.** Tagumist poolt võib salvrätiga kuivatada. Ära materjali maha tõmba! Soovitavalt toetada nad kaldnurga all seljaga vastu tuge nii, et vereäige saba (äige tõmbamise hõredam lõpu pool) jääks ülespoole.

3. Kasutatud kirjandus

Houwen, B. (2000). Blood Film Preparation and Staining Procedures. Laboratory Hematology Vol 6:1-7.

Alberta Laboratory Quality Enhancement Program (2004). Blood Film Staining Effects.

Raave-Sepp, A. (2011). Juhend: Vereäige värvimine. Tartu: Quattromed HTI.

Preparaatide värvimine. Tartu: Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabor.



Joonis 5: Värvimistarvikud kandikul