

**Krevní buňky a principy jejich
vyšetřování
na hematologických
analyzátorech a mikroskopicky**

Bourková L., OKH FN Brno

Příklady webových stránek

- **hematologický atlas**

- <http://www.hematocytologie.eu/>
- <http://www.hematologyatlas.com/>
- <http://www.grsmu.by/files/file/university/cafedry/klinicheskaya-immynologiya/files/fiu/atlas.pdf>

- **RBC**

- https://www.google.cz/search?hl=cs&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1280&bih=908&q=erythroblasts&oq=erythroblasts&gs_l=img.1.3.0i19l10.6606.9583.0.12410.8.8.0.0.0.0.68.208.8.8.0...0...1ac.1.64.img..0.8.201.NRloSelUgdk
- http://www.sekk.cz/infoservis/2006_Morfologie_erytrocytu.pdf

- **WBC**

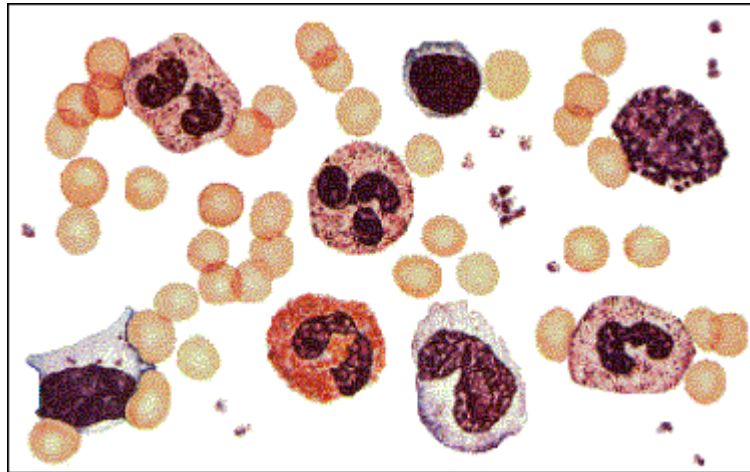
https://www.google.cz/search?hl=cs&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1280&bih=908&q=leukocytes&oq=leukocytes&gs_l=img.1.2.0l3j0i30l7.1937.12377.0.15795.7.6.0.1.1.0.244.565.5j0j1.6.0....0...1ac.1.64.img..0.7.577.pvdZx9LICHk

- **PLT**

https://www.google.cz/search?hl=cs&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1280&bih=908&q=platelets&oq=platelets&gs_l=img.1.0.0i19l10.1770.5225.0.7869.9.7.0.2.2.0.207.325.6j0j1.7.0....0...1ac.1.64.img..0.9.349.CiouVP0aXo0

Vyšetřování krevních buněk v periferní krvi

- nesrážlivá periferní krev
- antikoagulační činidlo: K3EDTA nebo K2EDTA
- vyšetření:
 - ✓ hematologické analyzátoy
 - ✓ mikroskop



KOSTNÍ DŘEŇ

myeloblast

proerytroblast

promyelocyt

časný erytroblast
(bazofilní normoblast)

monoblast

megakaryoblast

lymfoblast

neutrofilní myelocyt

eozinofilní myelocyt

bazofilní myelocyt

středně zralý erytroblast
(polychromní normoblast)

promonocyt

promegakaryocyt

prolymfocyt

neutrofilní metamy

eozinofilní metamy

bazofilní metamy

pozdní erytroblast
(ortochromní/oxyfilní normoblast)

makrofág

megakaryocyt

plazmat. b.

PERIFERNÍ KREV

neutrofilní tyč

eozinofilní tyč

bazofilní tyčí

retikulocyt

monocyt

trombocyty

lymfocyt

neutrofilní segment

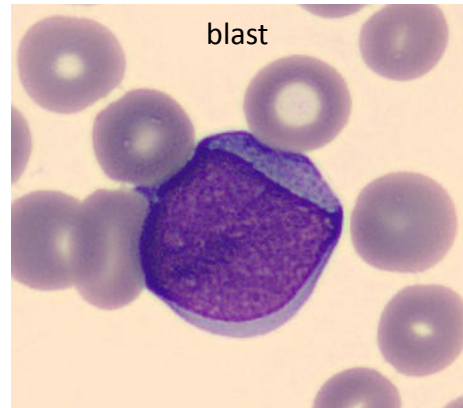
eozinofilní segment

bazofilní segment

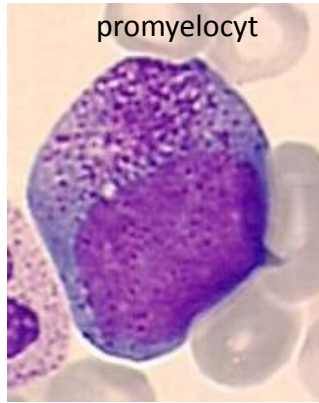
erytrocyt

Leukocyty

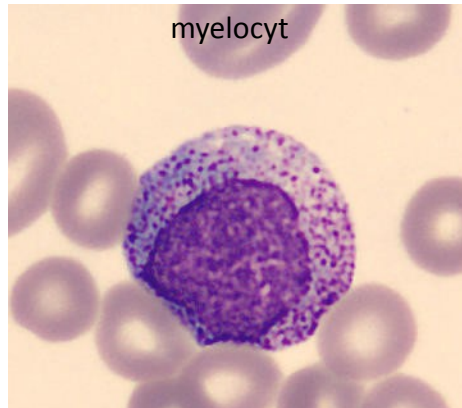
blast



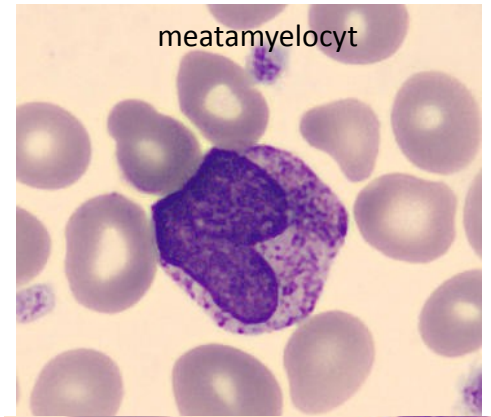
promyelocyt



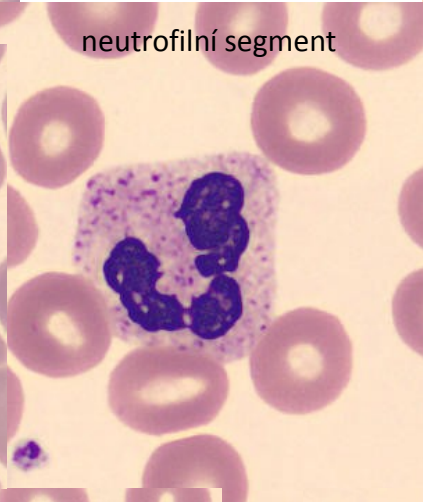
myelocyt



metamyelocyt



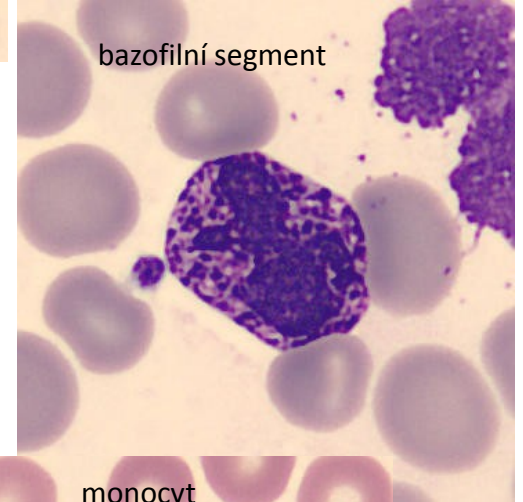
neutrofilní segment



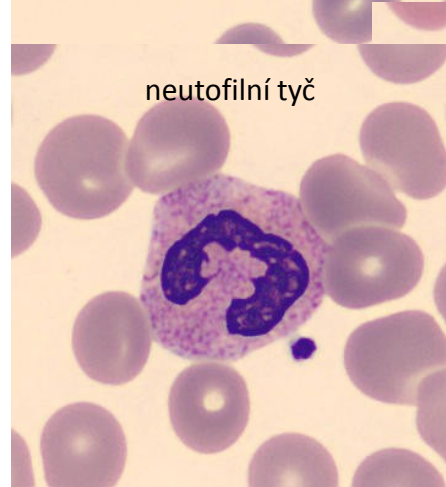
eozinofilní segment



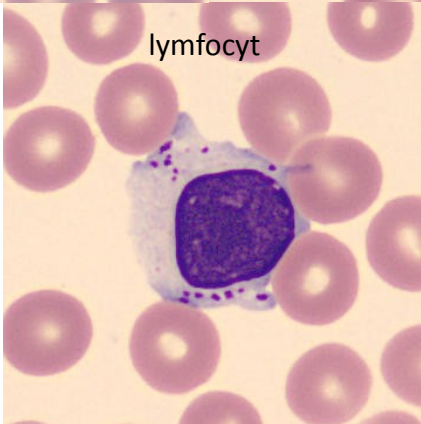
bazofilní segment



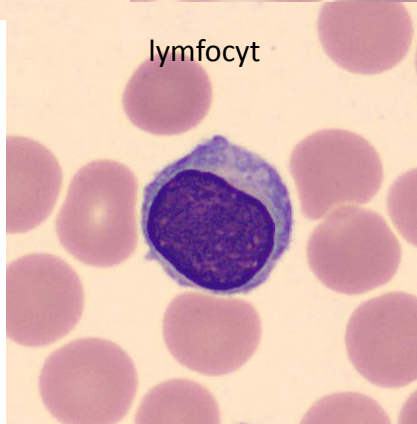
neutrofilní tyč



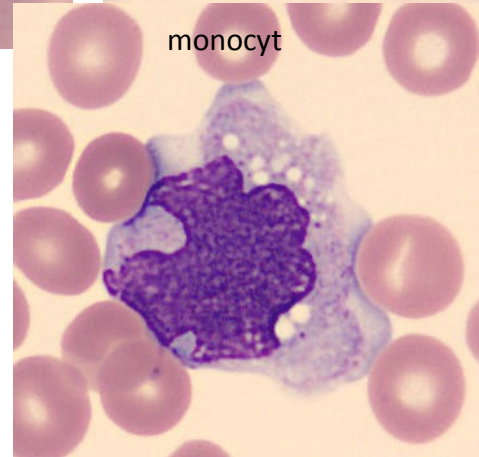
lymfocyt



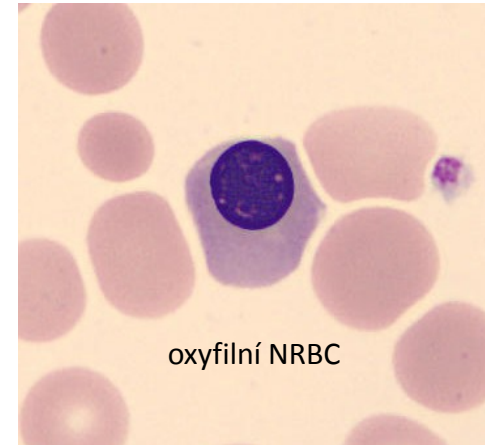
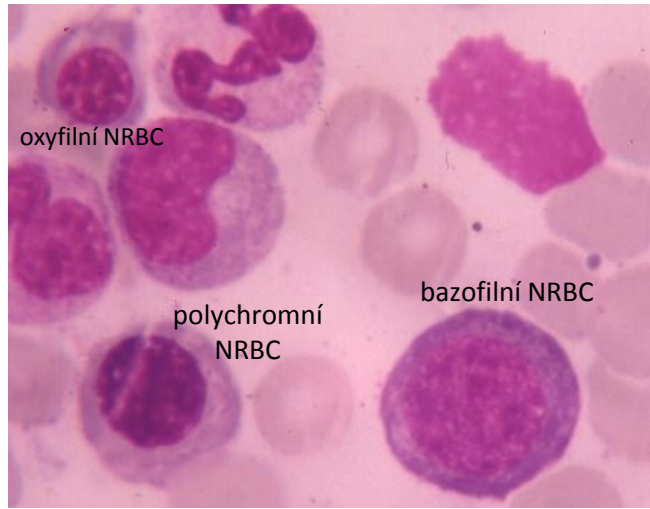
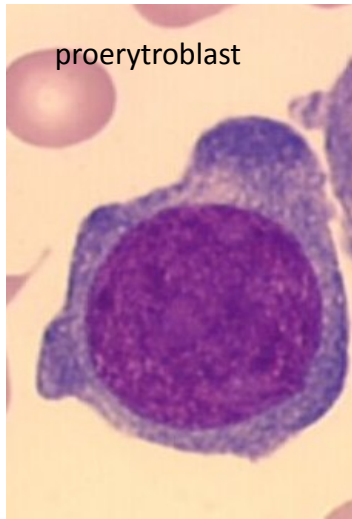
lymfocyt



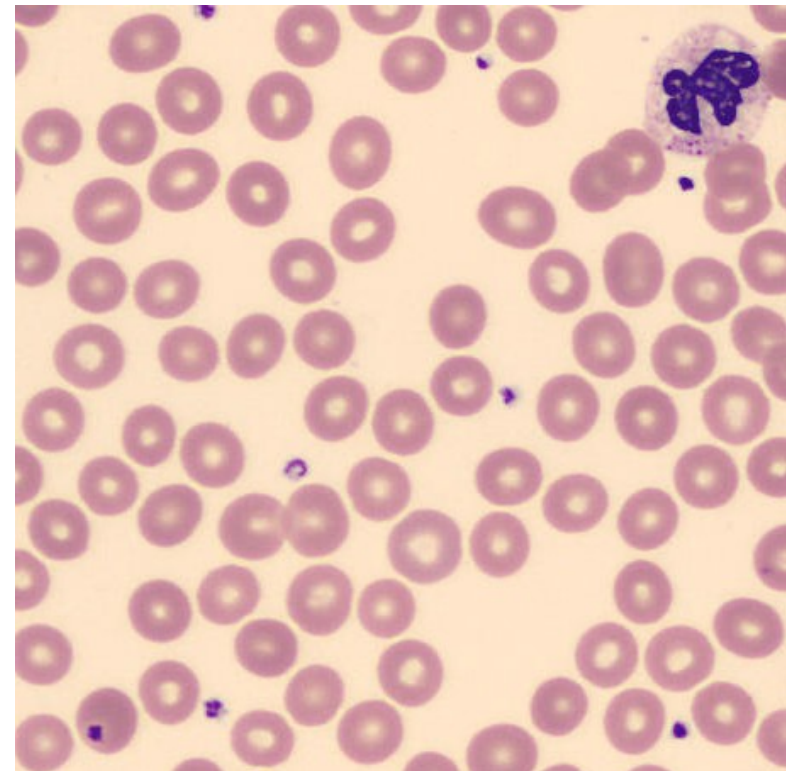
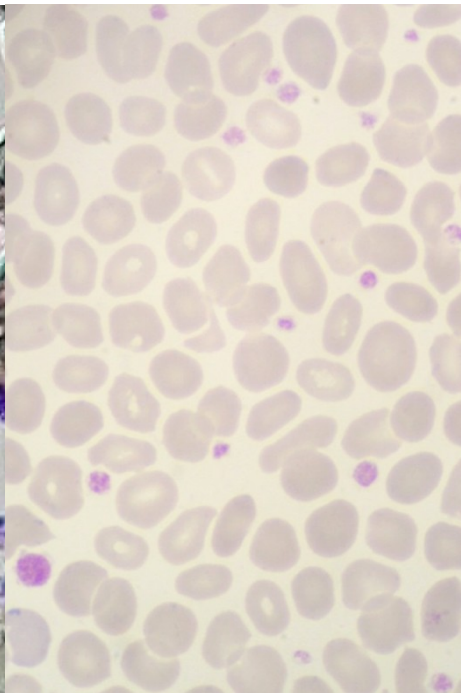
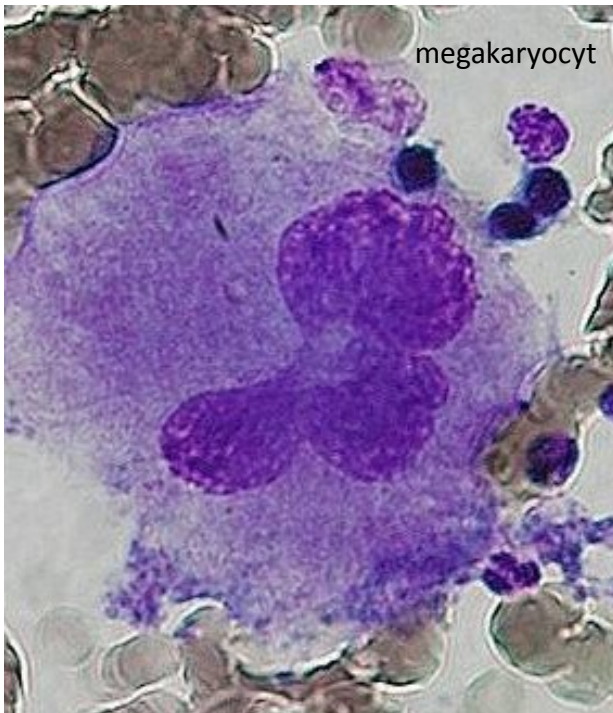
monocyt



Erythrocyty



Trombocyty



Hematologické analyzátory



Principy měření hematologických analyzátorů

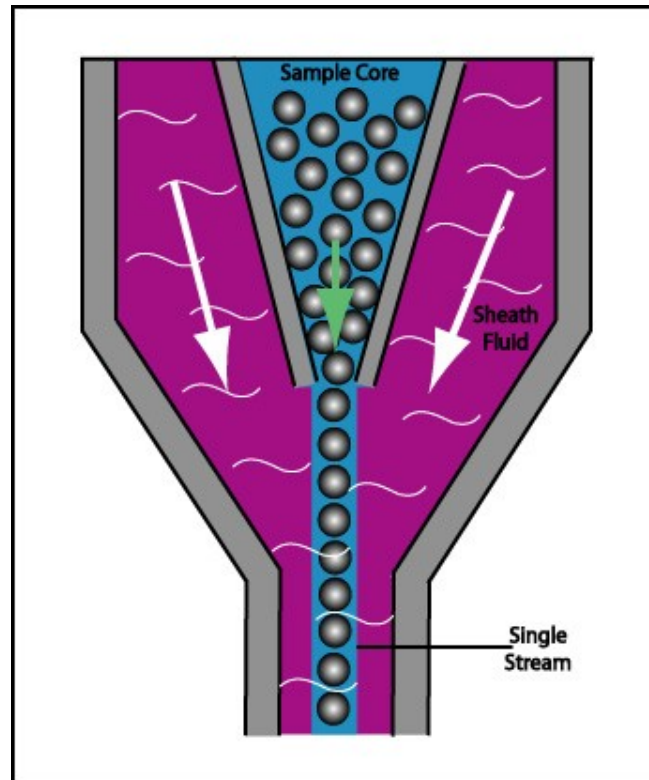
- *hydrodynamická fokusace*
- principy měření:
 - ✓ impedanční analýza
 - ✓ optická analýza
 - *kombinace různých principů analýzy*
- spektrofotometrická analýza hemoglobinu

Principy měření umožňují vyšetření:

- kvantitativní – počet buněk
- kvalitativní – morfologie buněk
 - ✓ tvar buňky
 - ✓ tvar a velikost jádra
 - ✓ obsah cytoplazmy

Hydrodynamická fokusace

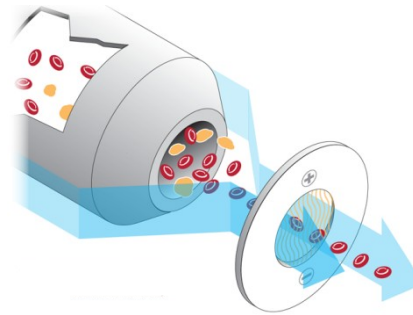
- usměrnění buněk proudem nosné izotonické kapaliny (diluent) při průchodu měřícím kanálem „po jedné“



Impedanční analýza

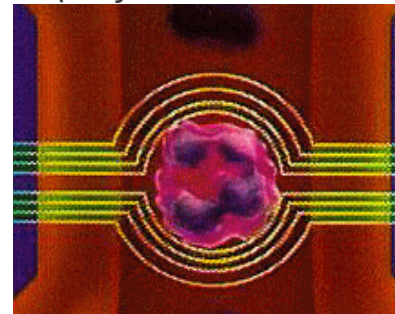
➤ ředění buněčné suspenze

- ✓ diluent - vodivý
- ✓ krevní buňka – nevodivá



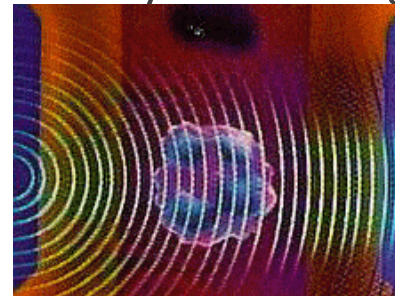
➤ průchod buněk mezi elektrodami (*stejnoseměrné elektrické pole*) → impuls

- ✓ počet impulsů = počet buněk
- ✓ velikost impulsů = velikost buněk



➤ možné doplnění vysokofrekvenční analýzou

- ✓ na buňku superponováno vysokofrekvenční elektrické pole
- ✓ analýza vysokofrekvenčního napětí buňky = morfologie buňky



Optická analýza

➤ ředění buněčné suspenze

- ✓ diluent – opticky inaktivní
- ✓ krevní buňka – opticky aktivní

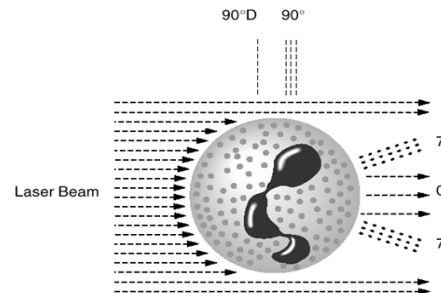
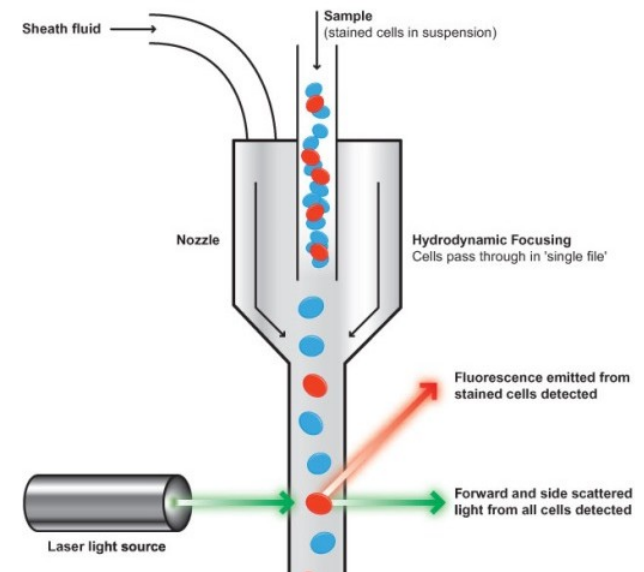
➤ interakce buněk s monochromatickým laserovým paprskem

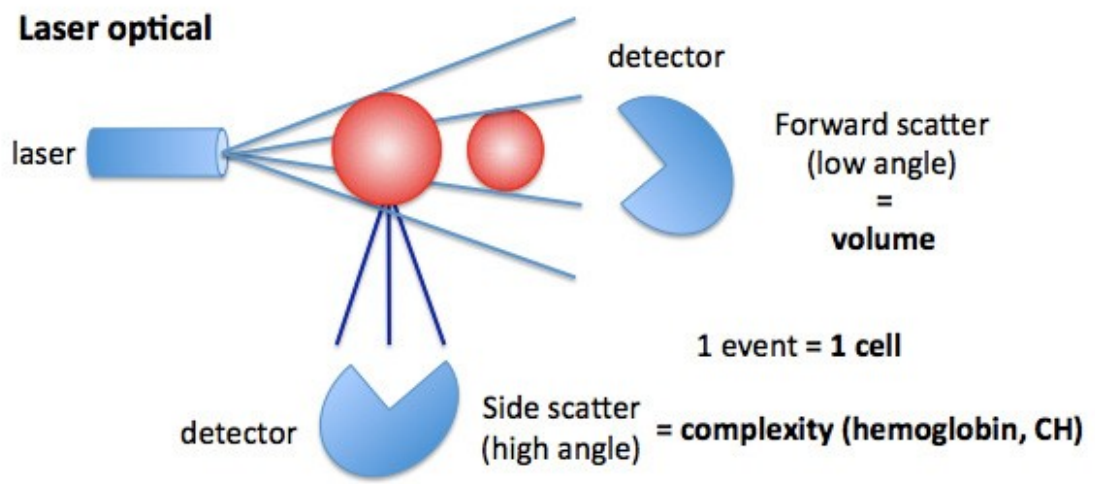
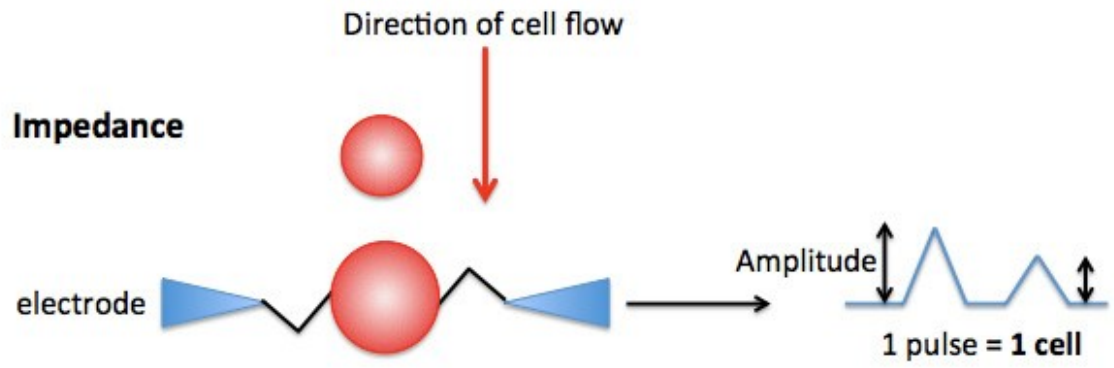
➤ po interakci buňky s paprskem se provádí analýza:

- ✓ prošlého světla (0°)
- ✓ odraženého světla
- ✓ depolarizovaného světla
- ✓ fluorescence
- *cytochemické barvení buněk, doplňková analýza absorpce světla dle stupně probarvení cytoplazmy (u některých typů přístrojů)*

➤ vyšetření:

- ✓ kvantitativní a velikost buňky → detekce ve směru (0°)
- ✓ kvalitativní/morfologie buňky → detekce odraženého a depolarizovaného světla, fluorescence, případně kombinace s cytochemickou analýzou

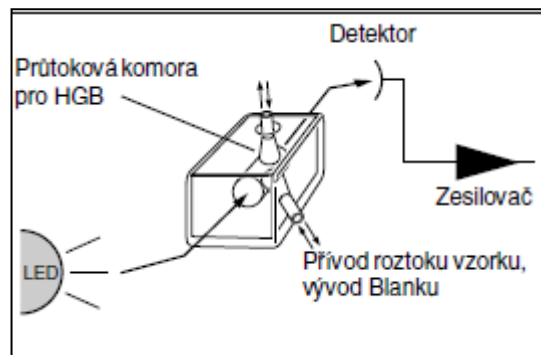




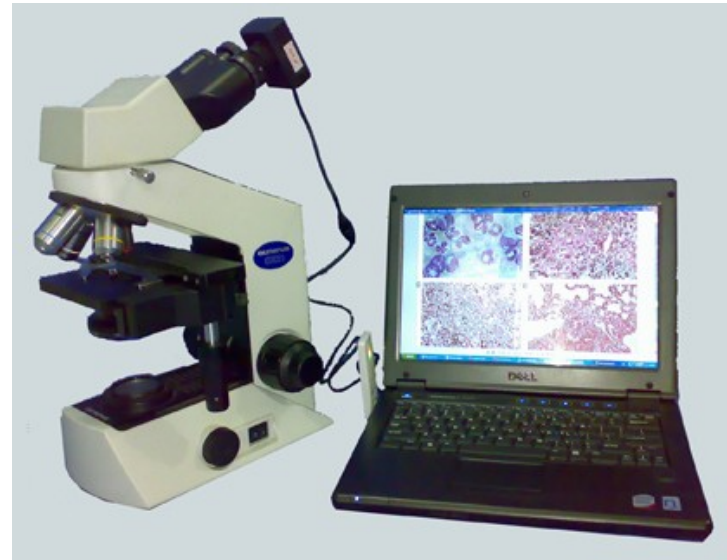
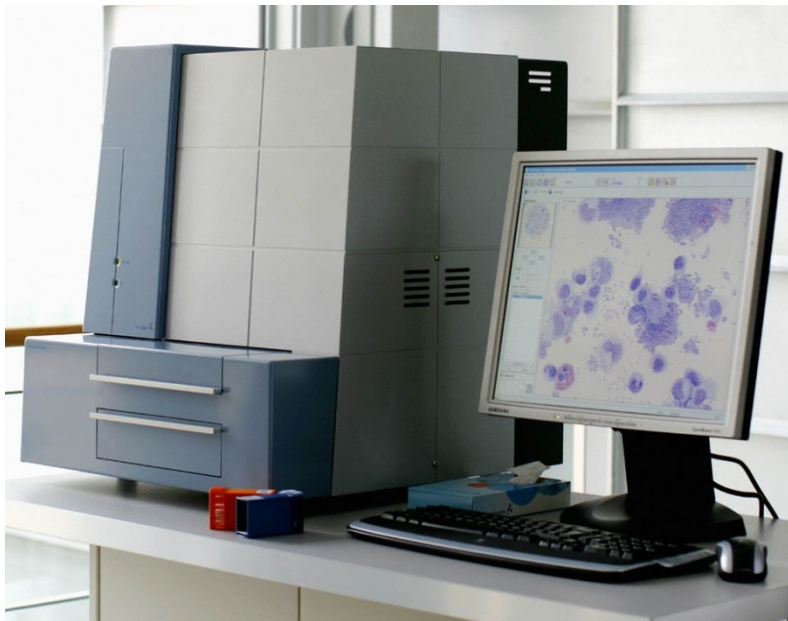
<http://www.eclinpath.com/hematology/tests/hemoglobin/rbc-analysis-2/>

Spektrofotometrická analýza hemoglobinu

- hemolýza všech erytrocytů lyzačním (*bezkyanidovým*) roztokem
- uvolněný HGB je převeden na chromogenní formu s nejvyšší hodnotou absorbance při $\lambda = 540 \text{ nm}$
 - ✓ HGB je převeden na chromogenní formu reagensy (*např. imidazolem nebo sodium lauryl sulfátem*), která vytváří hemoglobinový komplex
- měření absorbance hemolyzovaného vzorku a blanku (*lyzační roztok*)
 - ✓ měření cca 8x (*dle typu přístroje*)
- z rozdílu absorbancí je vypočítána koncentrace HGB

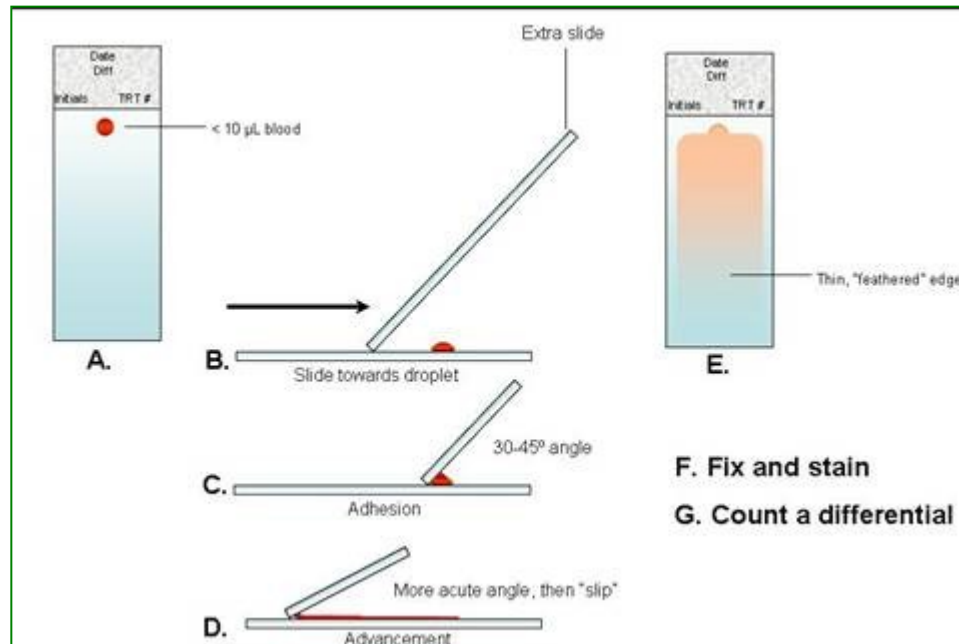


Mikroskopovací zařízení



Zhotovení nátěru krve

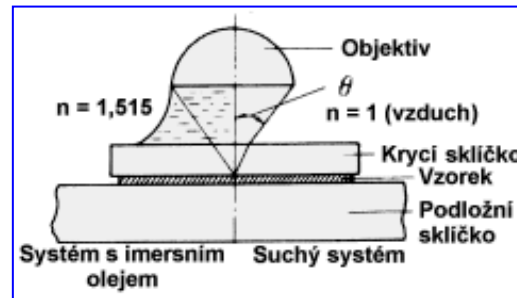
- roztírací sklíčko položit před kapku krve na podložním skle pod úhlem cca 30 - 40° (*nikdy ne do kapky krve*); po doteku krve a roztíracího skla se krev rozlije podél hrany skla; po té rychle krev rozetřít po podložním skle
- sílu nátěru zvažovat – čím větší úhel, tím silnější nátěr
- nátěr musí být: rovnoměrný, přiměřeně tenký, dlouhé okraje musí být rovné, na konci přechází „do ztracena“



Mikroskopování

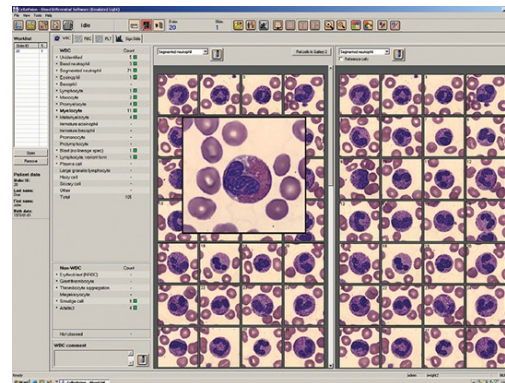
➤ mikroskop

- ✓ suchý objektiv: mezi preparátem a objektivem je vzduch
 - ✓ imerzní objektiv: mezi preparátem a objektivem je imerzní olej
 - imerzní olej má podobný index lomu jako sklo – vznikne opticky homogenní prostředí, zvýší se index lomu prostředí mezi preparátem a objektivem
- imerzí může být: voda, parafinový olej, glycerol, cedrový olej, kanadský balzám (voda má vyšší index lomu než vzduch, ale nižší než imerzní olej)*



➤ digitální morfologie

nové generace analyzátorů svým softwarovým vybavením digitálně zpracovávají a vyhodnocují krevní nátěry, hovoří se o virtuální mikroskopii (telehematologie), digitální analýza vytváří databázi digitálních fotografií krvinek, které lze i exportovat e-mailem nebo po internetu odborníkům ke konzultaci



Barvení nátěrů periferní krve a aspirátů kostní dřeně

➤ Panoptická barvicí technika:

- ✓ fixační roztok May-Grunwald – složení: eozin Y, metylenová modř, metylalkohol, glycerol
- ✓ barvicí roztok Giemsa-Romanowsky – složení: metylenová modř, azur-eozin, azur II, metylalkohol, glycerol, fosfátový pufr pH 6,8-7,0

➤ Základní principy barvení:

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

Celkové obarvení nátěru je výsledkem řady různých kombinací těchto barevných reakcí, které nakonec dávají výsledný vzhled nabarveného preparátu.

Poznámka: preparáty lze také připravovat na nátěrových a barvicích automatech.