

Protokol

Stanovení červeného obrazu krevního

Postupy práce

Stanovení počtu erytrocytů

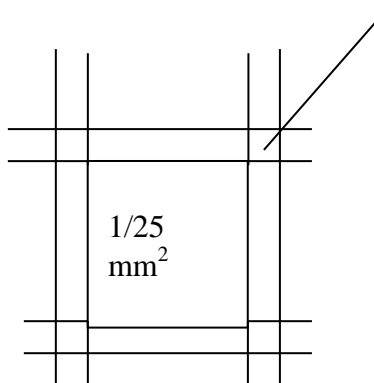
Potřeby: banička, Hayemův roztok, mikropipety 25 μl a 4 950 μl , kapátka, podložní sklíčko, Bürkerova komůrka, krev, emitní miska, čtverečky buničité vaty.

Postup práce:

Striktní zásada pro práci s krví: pracujeme pouze v gumových rukavicích!

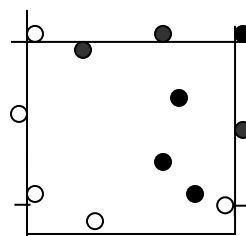
1. Do baničky odměříme velkou žlutě značenou mikropipetou 4950 μl Hayemova roztoku.
2. Lahvičku s krví krouživým pohybem zlehka promícháme, otevřeme a postavíme do emitní misky.
3. Na menší, modře značenou pipetu nasadíme špičku. Vnoříme ji do lahvičky s krví a nebereme 25 μl krve.
4. Špičku mikropipety s krví zevně otřeme tamponem a zmáčknutím vyprázdníme do baničky s Hayemovým roztokem.
5. Pomalým krouživým pohybem obsah baničky promícháme.
6. Nachystáme si Bürkerovu komůrku a překryjeme ji krycím sklíčkem.
7. Čistým kapátkem kápneme 1 kapku připraveného roztoku z baňky pod krycí sklíčko Bürkerovy komůrky.
8. Vložíme pod mikroskop a začneme odečítat počet erytrocytů v malých čtvercích ($1/400 \text{ mm}^2$ - obr.1) podle pravidla: počítáme pouze erytrocyty uvnitř čtverce a ty, které se dotýkají horní a pravé boční strany čtverce a to i z vnější strany (tmavé kroužky). Nezapočítáváme ty elementy, které se dotýkají čtverce na levé a spodní straně - světlé kroužky (viz obr. č. 2.).
Udávaná chyba tohoto vyšetření při tomto typu určení počtu erytrocytů je $\pm 200\,000/\mu\text{l}$ ($\mu\text{l} = \text{mm}^3$).

Obrázky č. 1 a 2: Bürkerova komůrka a zásady odečtu erytrocytů



Obr. č.1

$1/400 \text{ mm}^2$



Obr. č.2

Stanovení koncentrace hemoglobinu

Potřeby: transformační roztok, odměrný válec, kapátko, podložní sklíčko, mikropipeta 5000 μl , mikropipeta 20 μl , emitní miska, tampon

Postup práce:

1. Zkontrolujeme zapnutí přístroje pro odečet c Hb – Spekol.
2. Vložíme do paměti přístroje faktor pro přepočítání absorbance na látkovou koncentraci Hb (1Fe), vynulujeme oproti destilované vodě.
3. Do zkumavky žlutě značenou mikropipetou odměříme 5 ml transformačního roztoku. **Student, který bude pracovat s tímto roztokem - pracuje v modrých rukavicích se štítem před obličejem!!!**
4. Modrou mikropipetou odměříme 20 μl krve (obdobně dle návodu pro stanovení počtu erytrocytů).
5. Obsah mikropipety vyprázdníme do zkumavky s transformačním roztokem, promísíme a čekáme 5 minut na hemolýzu erytrocytů.
6. Pomocí kapátka připraveným roztokem naplníme kyvetu pro Spekol. Zasuňme ji do přístroje (kyveta je zde prosvícena světlem o vlnové délce 540 nm) a na displeji odečítáme výsledek koncentrace Hb (1Fe) v mmol/l, (přepočítání $\text{g/l} = \text{mmol/l} \times 16.115$).

Vypočítané hodnoty červené krevní řady

Po stanovení počtu červených krvinek, hematokritu a množství hemoglobinu v krvi dopočítejte následující parametry užívané v klinické praxi.

1. Průměrný objem červené krvinky (MCV = mean corpuscular volume)

$\text{MCV} = \text{Hematokrit} / \text{počet erytrocytů}$ (fyziologická hodnota: 80-95 fl)

Erytrocyty menšího objemu nazýváme mikrocyty, naopak většího makrocyty.

2. Průměrná hmotnost hemoglobinu v erytrocytu (MCH = mean corpuscular hemoglobin)

$\text{MCH} = \text{hemoglobin} / \text{počet erytrocytů}$ (fyziologická hodnota: 27-33 pg)

Erytrocyty s vyšší hmotností hemoglobinu nazýváme hyperchromní, naopak s nižší hypochromní.

3. Průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC = mean corpuscular haemoglobin concentration)

$\text{MCHC} = \text{hemoglobin} / \text{hematokrit}$ (fyziologická hodnota: 310-360 g/l)

Výsledky

Stanovení počtu erytrocytů

Výsledky:

Počet erytrocytů v jednotlivých čtvercích

(počítáme ve 40 malých čtvercích)

....
....
....
....

Průměrná hodnota počtu erytrocytů/čtverec

.....

objem malého kvádru („čtverce“): $1/4000 \mu\text{l}$

počet průměrně nalezených elementů v malém čtverci násobíme

$4 * 10^9$

.....

získanou hodnotu násobíme stupněm ředění krve

* 200

Počet erytrocytů/l:

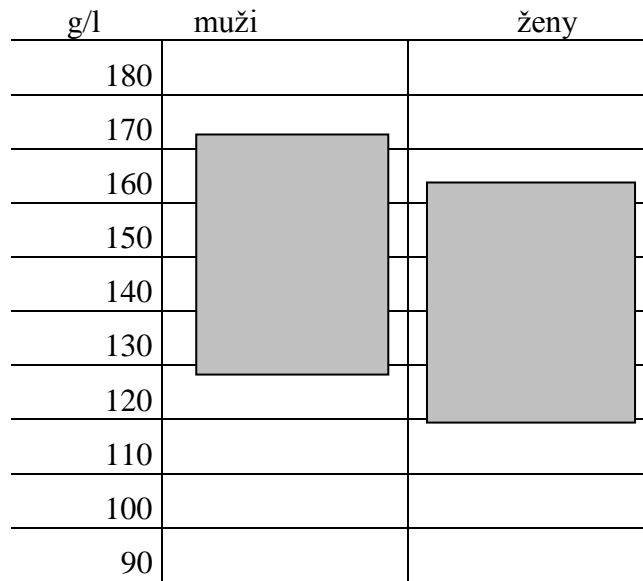
Stanovení koncentrace hemoglobinu

Výsledky:

Do grafu č. 1 doplňte nalezenou hodnotu koncentrace hemoglobinu. Tmavě jsou vyznačené fyziologické hodnoty hmotnostní koncentrace hemoglobinu pro muže 130 - 175 g/l [látková Hb (1Fe) 8,07 – 10,9 mmol/l], pro ženy 120 - 165 g/l [látková Hb (1Fe) 7,45 – 10,2 mmol/l].

snížené hodnoty: anémie; zvýšené hodnoty: dehydratace, polycytémie

Graf č. 1. Hmotnostní koncentrace hemoglobinu (g/l)



Vypočítané hodnoty červené krevní řady

1) Průměrný objem červené krvinky (MCV = mean corpuscular volume)

MCV = Hematokrit / počet erytrocytů (fyziologická hodnota: 80-95 fl)
 Výpočet: MCV =

2) Průměrná hmotnost hemoglobinu v erytrocytu (MCH = mean corpuscular hemoglobin)

MCH = hemoglobin / počet erytrocytů (fyziologická hodnota: 27-33 pg)
 Výpočet: MCH =

3) Průměrná koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC = mean corpuscular haemoglobin concentration)

MCHC = hemoglobin / hematokrit (fyziologická hodnota: 310-360 g/l)
 Výpočet: MCHC =

Závěr

Jsou Vaše zjištěné hodnoty fyziologické a pro které pohlaví? Pokud ne pokuste se na základě veškerých vašich výsledků určit typ anemie.

.....

.....

.....

.....

.....

Protokol

Určení krevní skupiny sklíčkovou metodou

Metoda

Potřeby:

kapátko, podložní sklíčka, standardní séra, emitní miska, tampón

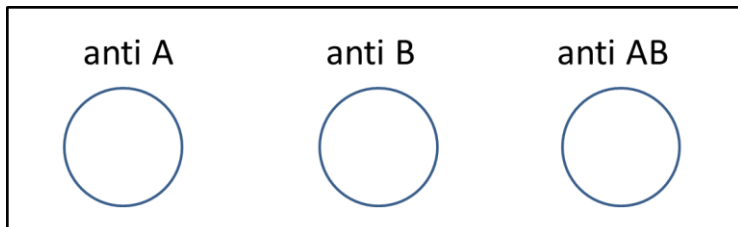
Postup práce:

1. Na podložní sklíčko kápneme jednotlivá krevní séra.
2. Na další podložní sklíčko kápneme z lahvičky testovaný vzorek krve.
3. Do kapky krve namočíme roh dalšího čistého podložního sklíčka a toto malé množství krve přeneseme do první kapky testovacího séra. Druhý – čistý roh téhož sklíčka opět namočíme do kapky vyšetřované krve a přeneseme do druhého testovacího séra v pořadí. Postup opakujeme i u vzorku třetího testovaného séra. Nikdy bychom neměli zapomenout dobře promíchat vyšetřovanou krev v séru.
4. Krev se séry promícháváme opatrným kolébáním podložního sklíčka na všechny strany, čímž urychlíme případnou aglutinaci. Výslednou reakci odečítáme, při nejasnostech lze použít i mikroskop. Aglutinace se projeví vytvořením vloček v testovacím séru.

Výsledky

Na předkreslené schéma sklíčka s testovanými séry (anti A, anti B, anti AB) dokreslete, co vidíte pod mikroskopem. Pak určete krevní skupinu a doplňte hodnotu (v %), jak často se daná krevní skupina vyskytuje v naší populaci.

Vzorek 1



Jedná se o krevní skupinu

Krevní skupina je v naší populaci zastoupena v%

Možné kombinace krevních skupin rodičů vyšetřované krve.

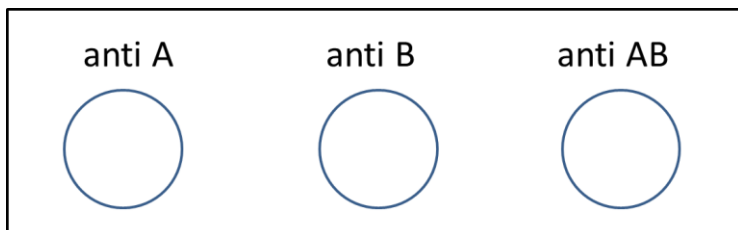
.....

.....

Současně uveďte, které vzájemné kombinace krevních skupin rodičů jsou vyloučeny.

.....

Vzorek 2



Jedná se o krevní skupinu

Krevní skupina je v naší populaci zastoupena v%

Možné kombinace krevních skupin rodičů vyšetřované krve.

.....

.....

Současně uveďte, které vzájemné kombinace krevních skupin rodičů jsou vyloučeny.

.....

Závěr

Uveďte kterým krevním skupinám je možno podat tyto transfúzní přípravky, jejímž dárcem byl váš pacient – erymasa a krevní plasma a z jakého důvodu?

.....

.....

.....

.....

Protokol

Sedimentace červených krvinek

Postup

Potřeby: kapátko, stojan se sedimentačními kapilárami a gumovými kalíšky, vzorky zkoumané krve (plná krev skotu, plná krev koňská, krev lidská a krev koňská, ve kterých byla plazma nahrazena fyziologickým roztokem – popř. **vzorky budou upřesněny přímo na praktiku**).

Postup práce:

1. Do každého z gumových kalíšků nalijeme po předchozím jemném promíchání asi 2 ml krve (každý vzorek má svůj vlastní kalíšek).
2. Levou rukou uchopíme sedimentační pipetu, která směřuje do středu gumového kalíšku s krví. Gumový váleček zmáčkneme, zmáčkнутý nasadíme na horní konec sedimentační pipety a pomalým povolováním stisku válečku tak nasáváme krev do sedimentační pipety až po rysku s označením 0. Po dosažení rysky levou rukou přitiskneme sedimentační pipetu proti středu spodiny gumového kalíšku, odděláme nasávací váleček a polohu pipety zafixujeme (utáhneme šroubem).
3. Při správném postupu sloupec krve neklesá.

V časových intervalech odečítáme v milimetrech rychlost sedimentace krevního sloupce erytrocytů, zapíšeme do grafu v protokolu.

Výsledky

Graf rychlosti sedimentace: (pro jednotlivé vzorky zvolte např. různé barvy)



Vyjmenujte faktory, které zrychlují sedimentaci krevních elementů:

.....
.....
.....
.....

Závěr

Vysvětlete rozdíly mezi různými typy krví, jejichž sedimentaci jste sledovali.

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Protokol

Stanovení osmotické rezistence červených krvinek

Postup

Potřeby: kapátko, krev, sada 13 skleněných zkumavek, destilovaná voda, 1 % roztok NaCl, fyziologický roztok NaCl (0,9%).

Postup práce:

1. Do 12 zkumavek odměříme podle rozpisu (viz tabulka 1) 1% roztok NaCl a destilovanou vodu, do 13. odměříme 10 ml 0,9% fyziologického roztoku jako kontrolní vzorek.

Tabulka 1.

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| NaCl 1% (ml) | 6,3 | 6,0 | 5,7 | 5,4 | 5,1 | 4,8 | 4,5 | 4,2 | 3,9 | 3,6 | 3,3 | 3,0 |
| H ₂ O (ml) | 3,7 | 4,0 | 4,3 | 4,6 | 4,9 | 5,2 | 5,5 | 5,8 | 6,1 | 6,4 | 6,7 | 7,0 |
| % NaCl | 0,63 | 0,60 | 0,57 | 0,54 | 0,51 | 0,48 | 0,45 | 0,42 | 0,39 | 0,36 | 0,33 | 0,30 |

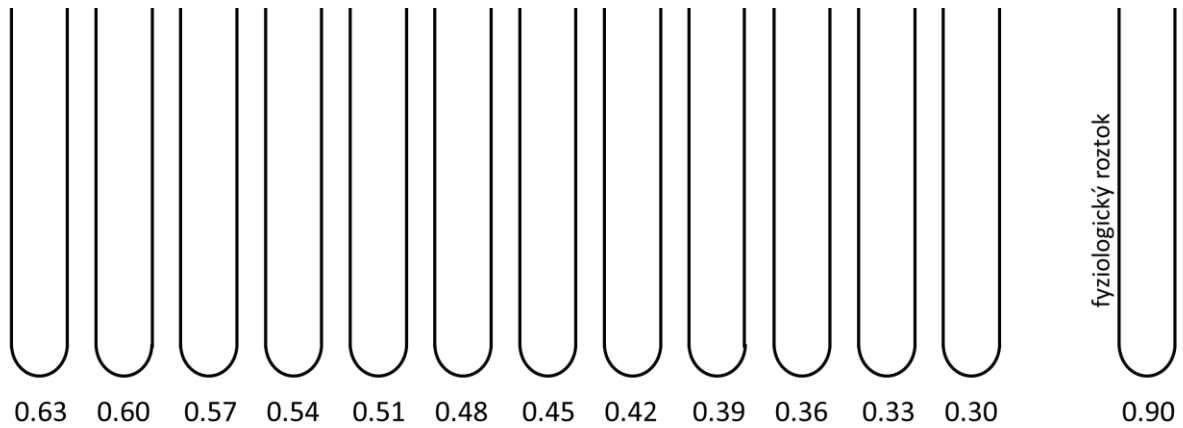
2. Promísíme.

3. Do každé ze zkumavek přidáme 2 kapky krve.

1. Opatrně promísíme.

5. Nejméně po půl hodině stání odečítáme výsledek.

Výsledky



Doplňte, ve které zkumavce je patrná a) minimální osmotická rezistence% NaCl

b) maximální osmotická rezistence% NaCl

Vyznačte rezistentní šíři.

Závěr

Uveďte všechny typy hemolýzy, které znáte (6) a vysvětlete je jejich mechanismus

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....