

**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=imghp&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**

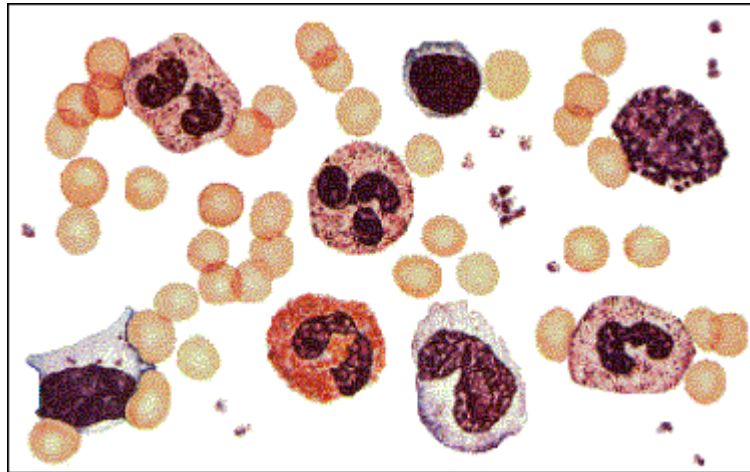
https://www.google.cz/search?hl=cs&site=imghp&tbm=isch&source=hp&biw=1280&bih=908&q=leukocytes&oq=leukocytes&gs_l=img.1.2.0l3j0i30l7.1937.12377.0.15795.7.6.0.1.1.0.244.565.5j0j1.6.0....0...1ac.1.64.img..0.7.577.pvdZx9LICHk

- **PLT**

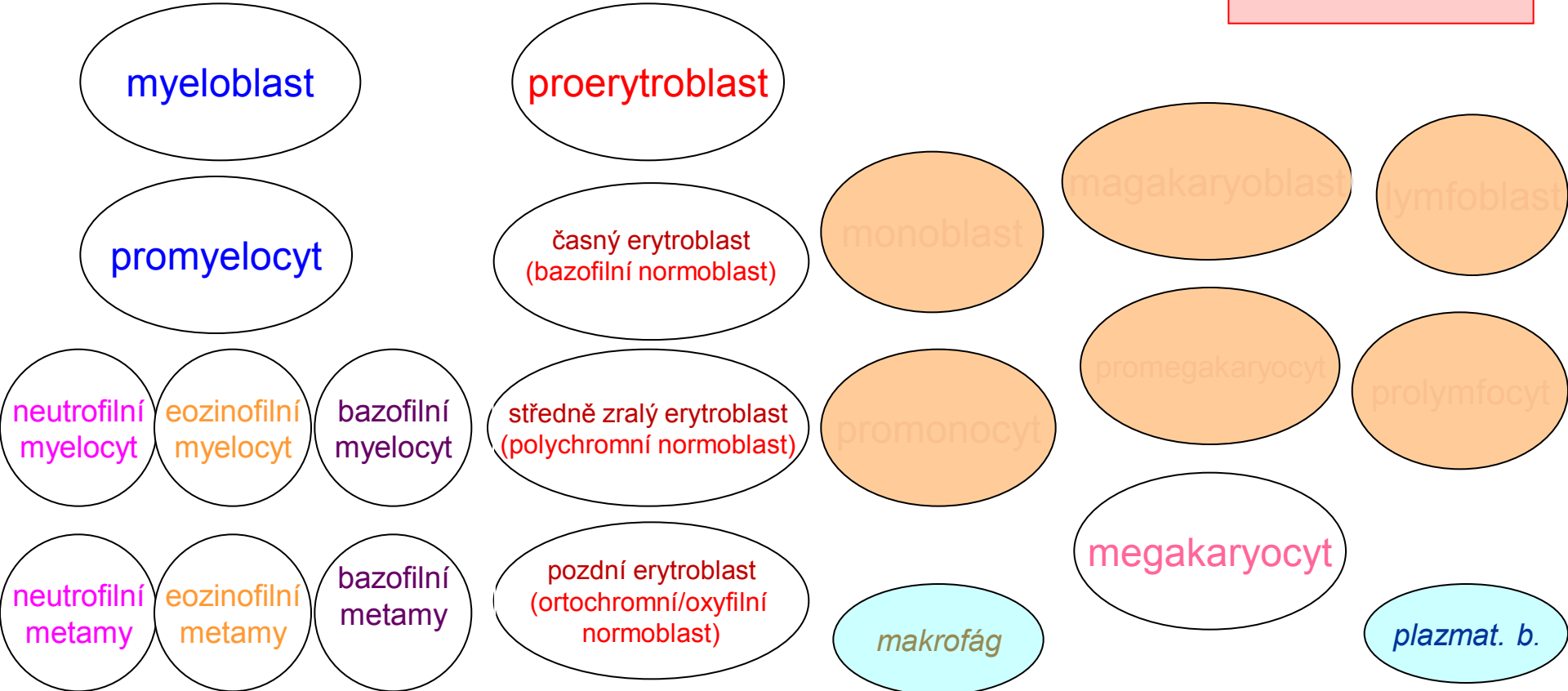
https://www.google.cz/search?hl=cs&site=imghp&tbm=isch&source=hp&biw=1280&bih=908&q=platelets&oq=platelets&gs_l=img.1.0.0i19l10.1770.5225.0.7869.9.7.0.2.2.0.207.325.6j0j1.7.0....0...1ac.1.64.img..0.9.349.CiouVP0aXo0

Vyšetřování krevních buněk v periferní krvi

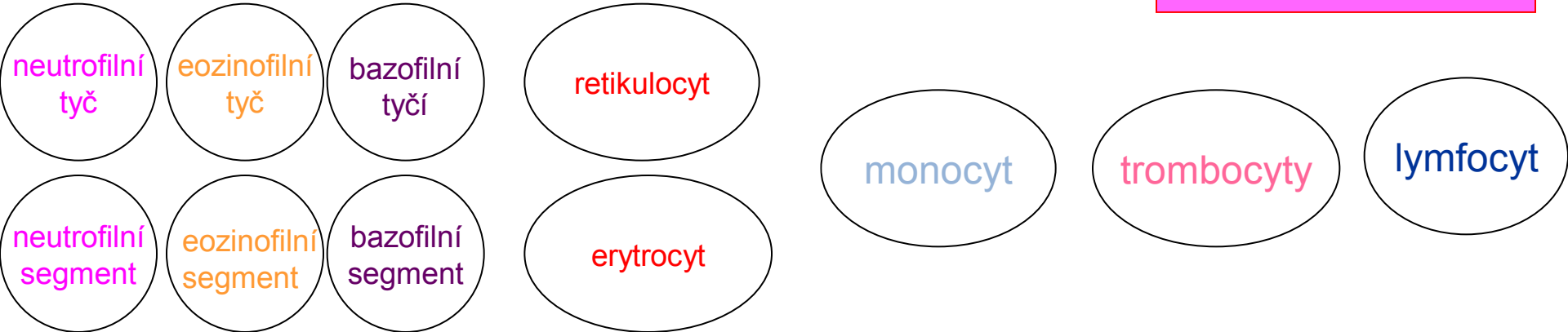
- nesrážlivá periferní krev
- antikoagulační činidlo: K3EDTA, K2EDTA nebo Na2EDTA
- vyšetření:
 - ✓ hematologické analyzátoy
 - ✓ mikroskop



KOSTNÍ DŘEŇ



PERIFERNÍ KREV



Leukocyty

blast

promyelocyt

myelocyt

metamyelocyt

neutofilní tyč

neutofilní segment

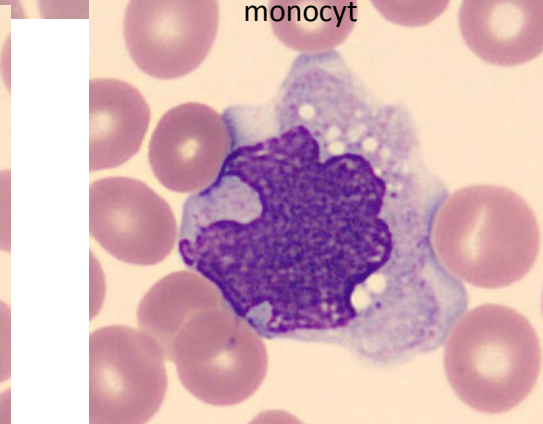
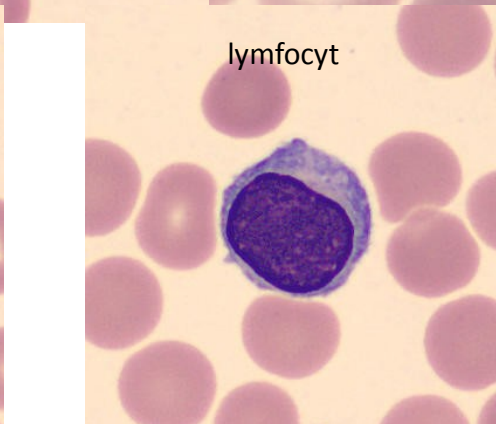
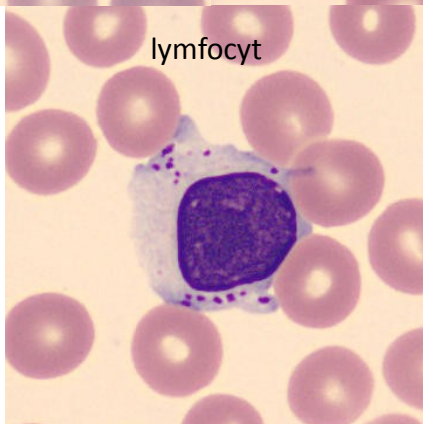
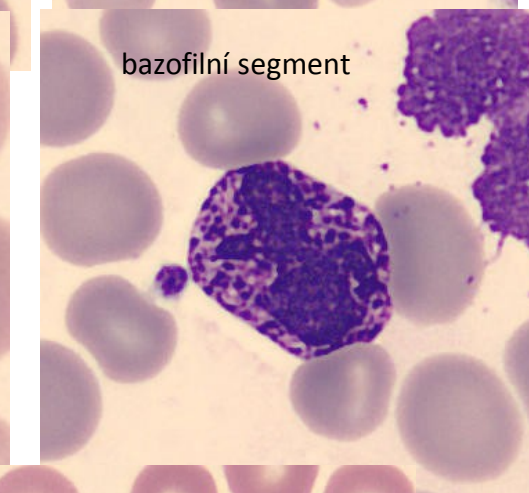
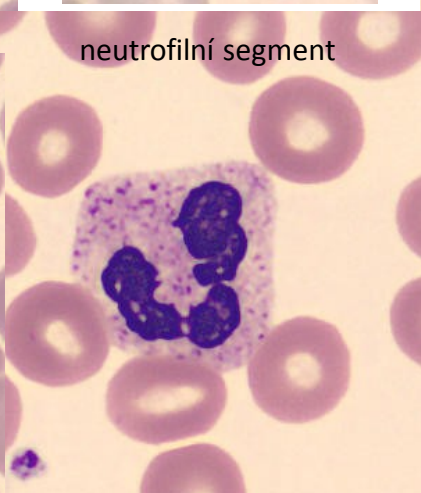
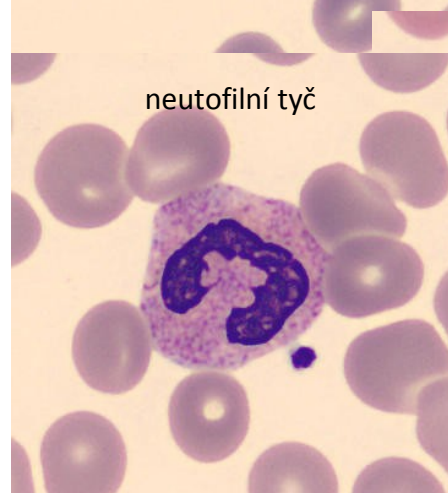
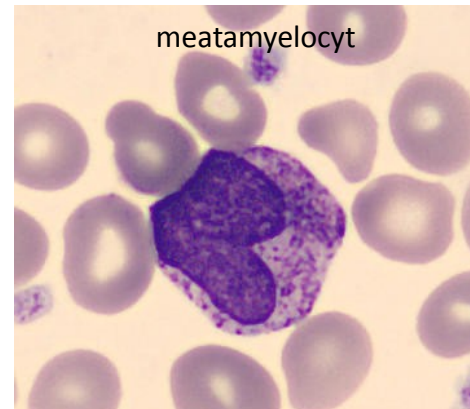
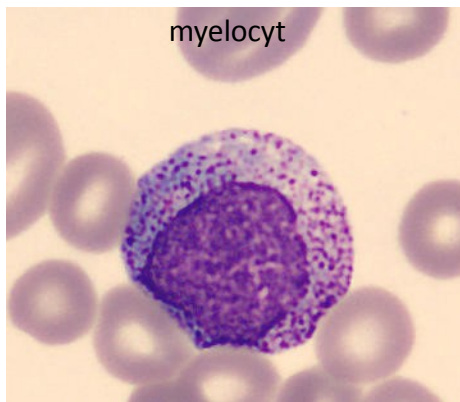
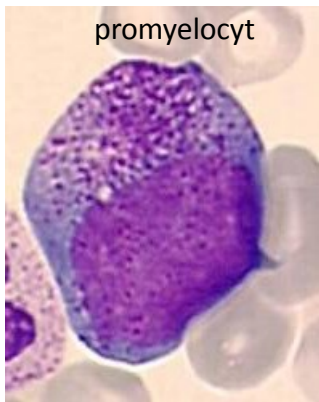
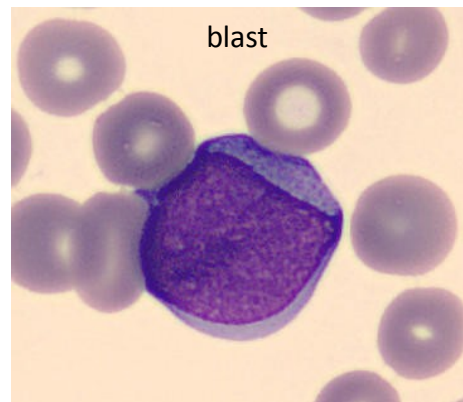
eozinofilní segment

bazofilní segment

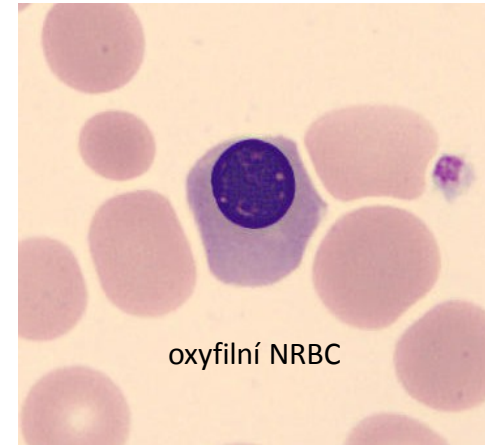
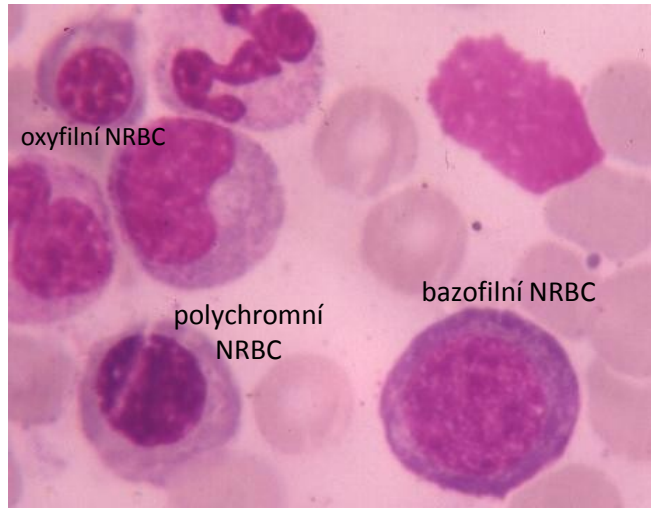
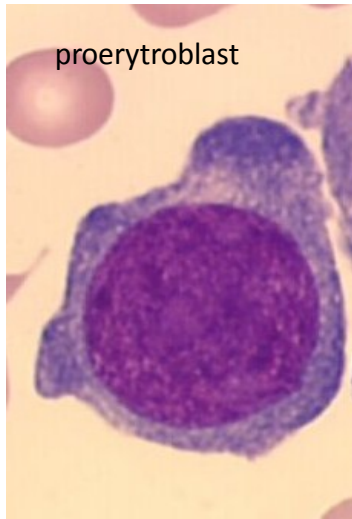
lymfocyt

lymfocyt

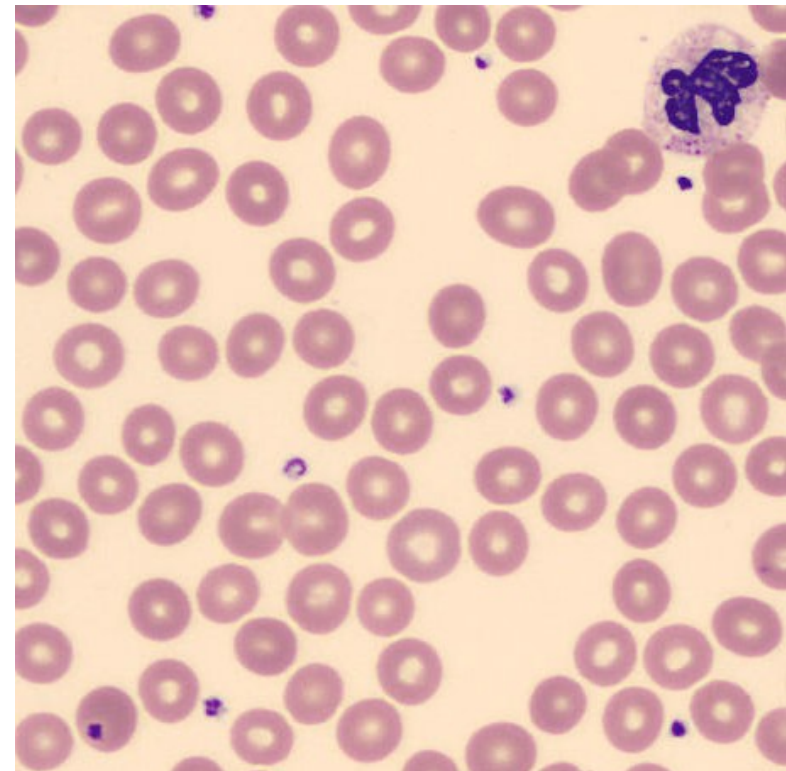
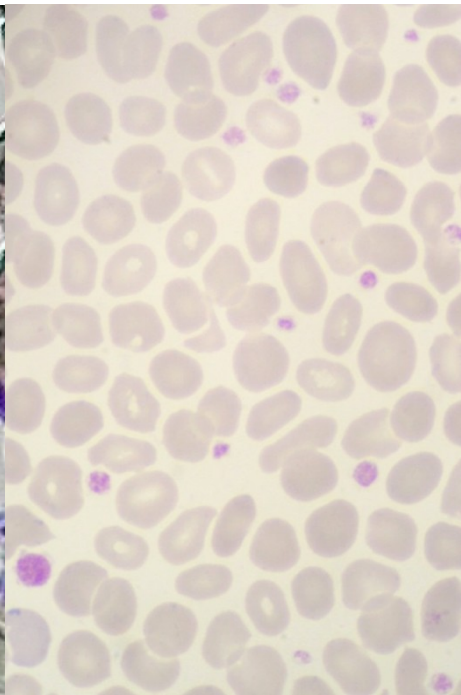
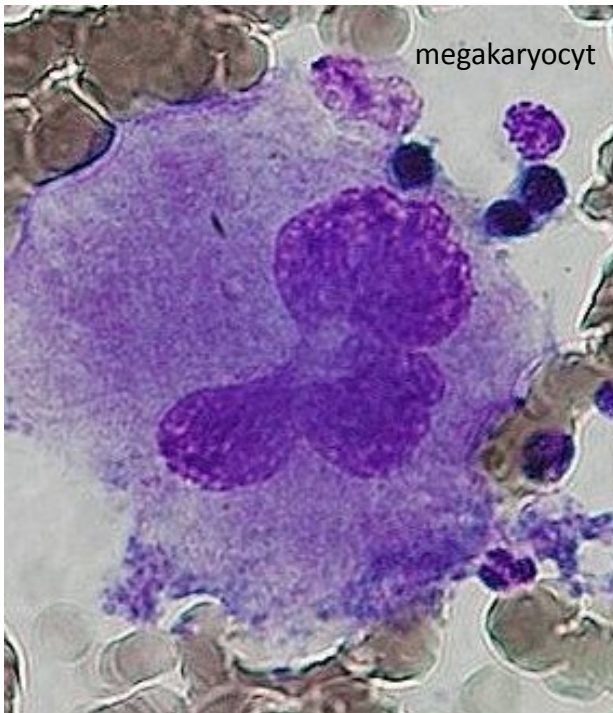
monocyt



Erythrocyty



Trombocyty



Hematologické analyzátory



Principy měření hematologických analyzátorů

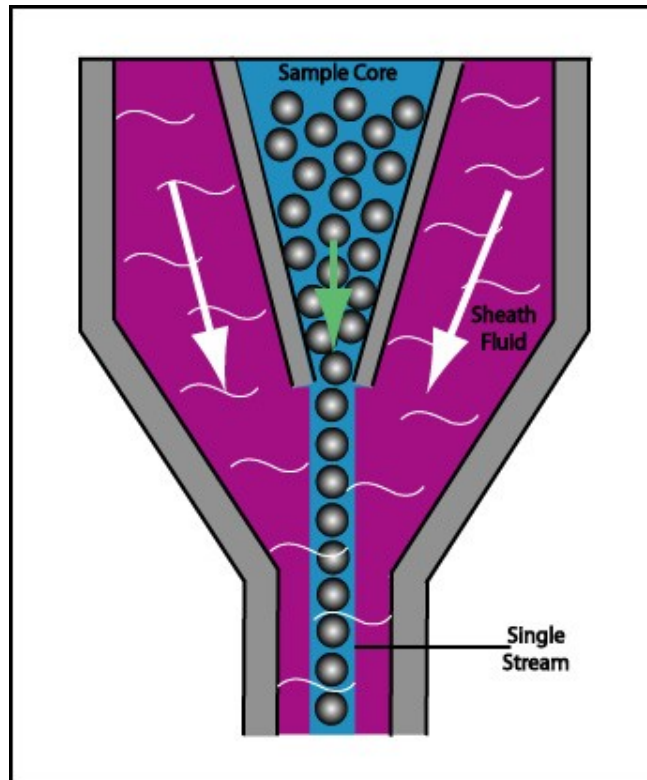
- *hydrodynamická fokusace*
- principy měření:
 - ✓ impedanční analýza
 - ✓ optická analýza
 - *kombinace různých principů analýzy*
- spektrofotometrická analýza hemoglobinu

Principy měření umožňují vyšetření:

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

Hydrodynamická fokusace

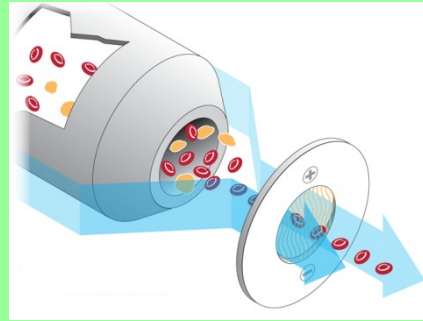
- usměrnění buněk proudem nosné izotonické kapaliny (diluent) při průchodu měřícím kanálem „po jedné“



Impedanční analýza

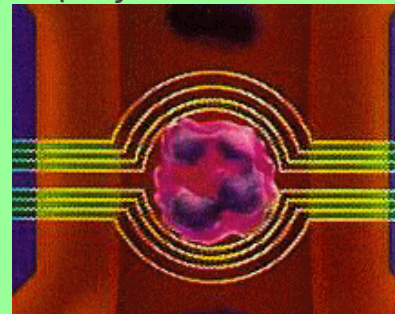
➤ ředění buněčné suspenze

- ✓ diluent - vodivý
- ✓ krevní buňka – nevodivá



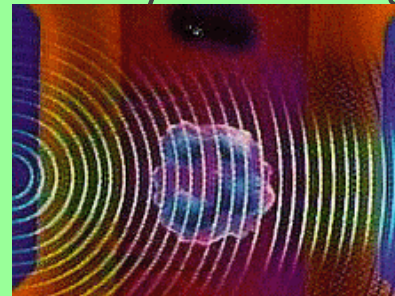
➤ průchod buněk mezi elektrodami (*stejnoseměrné elektrické pole*) → impuls

- ✓ 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

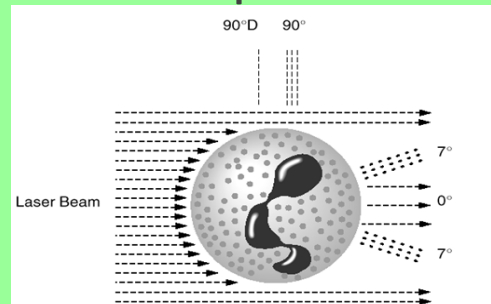
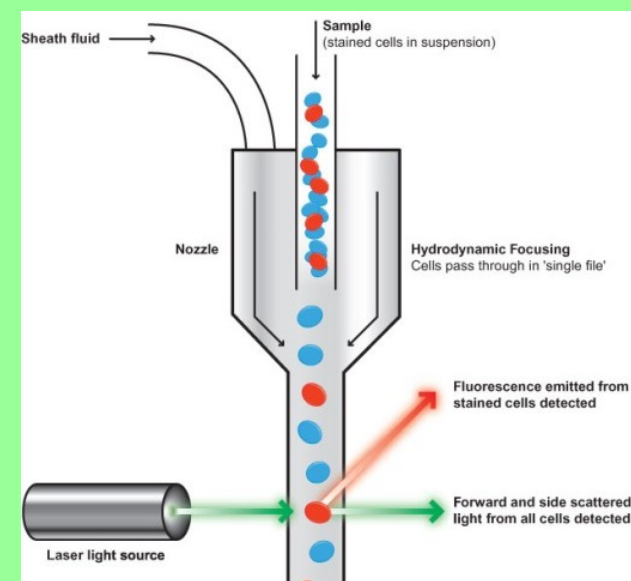
➤ po interakci buňky s paprskem se provádí analýza:

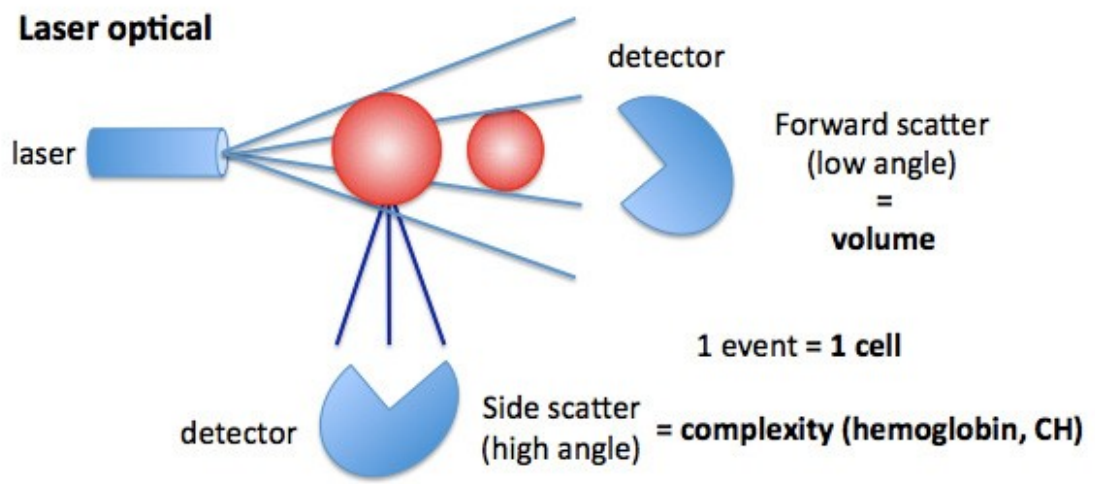
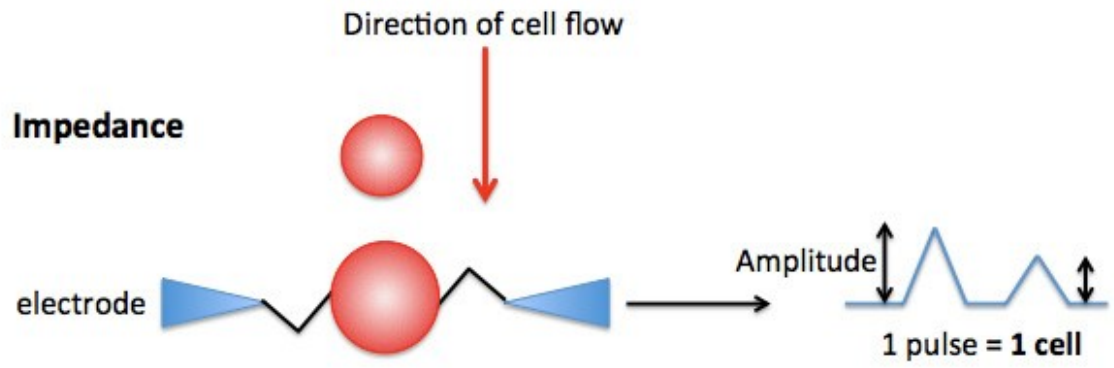
- ✓ prošlého světla (0°)
- ✓ odraženého světla
- ✓ depolarizovaného světla
- ✓ fluorescence

- *cytochemické barvení enzymu (peroxidáza) v buňkách, doplňková analýza absorpce a rozptylu 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

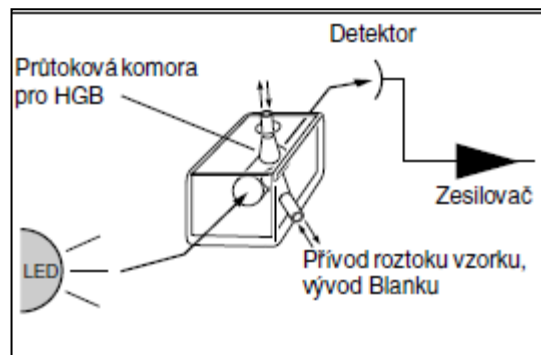




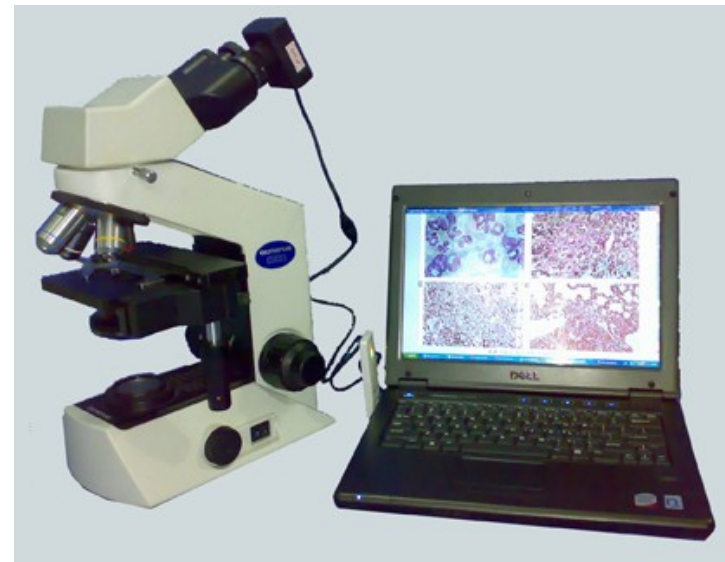
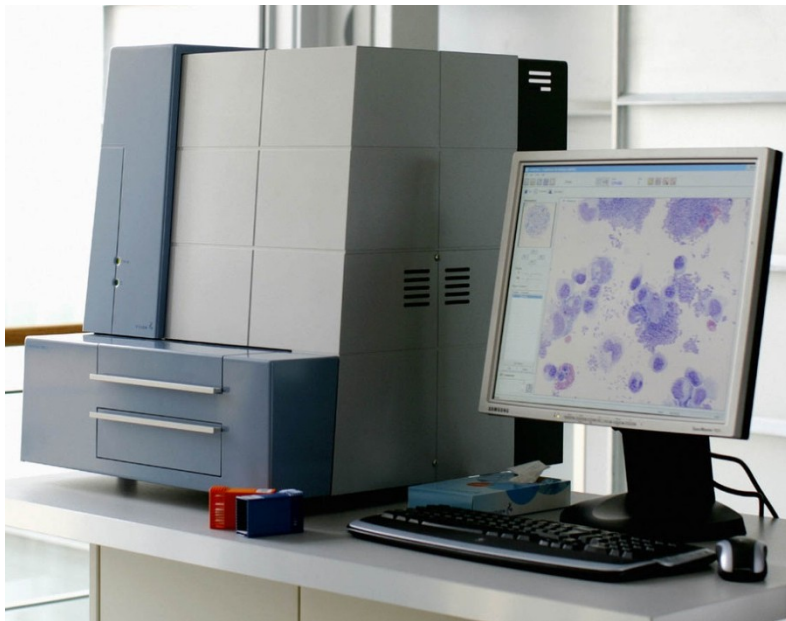
<http://www.eclinpath.com/hematology/tests/hemoglobin/rbc-analysis-2/>

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 lauril 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

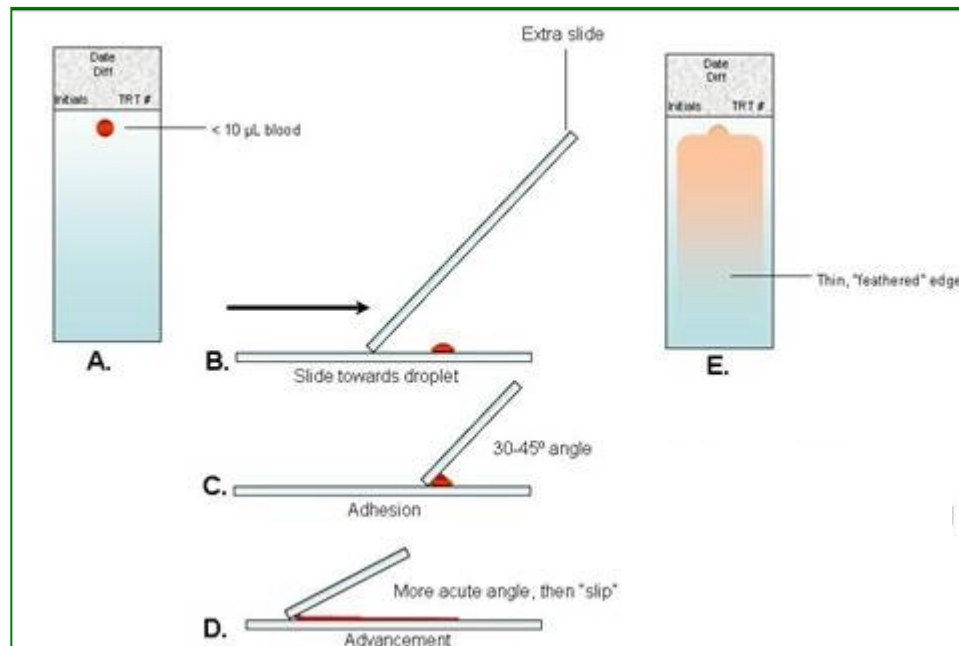


Mikroskopovací zařízení



Zhotovení nátěru krve

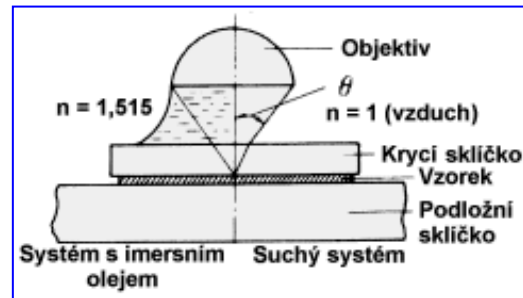
- roztírací sklíčko položit před kapku krve na podložním skle pod úhlem cca 30 - 40° (*nikdy ne do kapky krve*); po dotyku krve a roztíracího skla se krev rozlije podél hrany skla; po té rychle krev rozetřít po podložním skle
- sílu nátěru zvažovat – čím větší úhel, tím silnější nátěr
 - ✓ úhel se řídí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



Mikroskopování

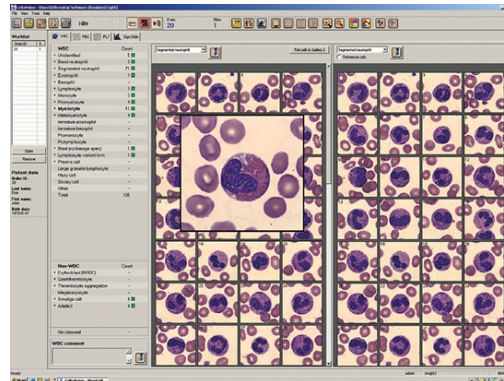
➤ mikroskop

- ✓ suchý objektiv: mezi preparátem a objektivem je vzduch (*přehledné prohlížení a buněčnost preparátu*)
- ✓ imerzní objektiv: mezi preparátem a objektivem je imerzní olej (*morfologie buněk*)
 - 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.