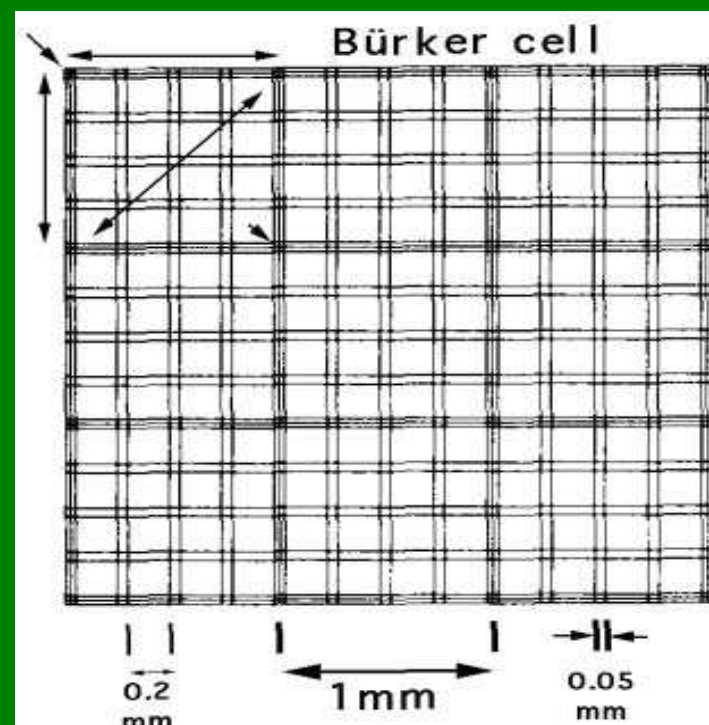
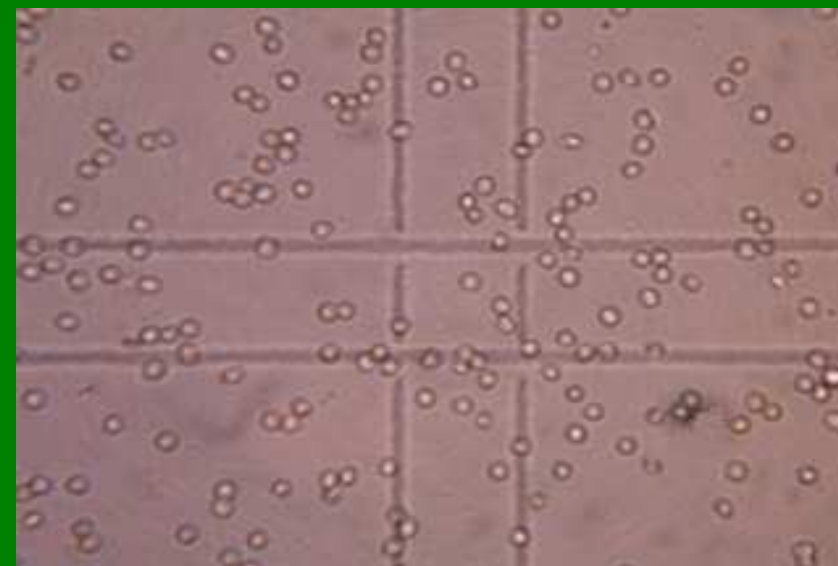


Počítání krevních buňek

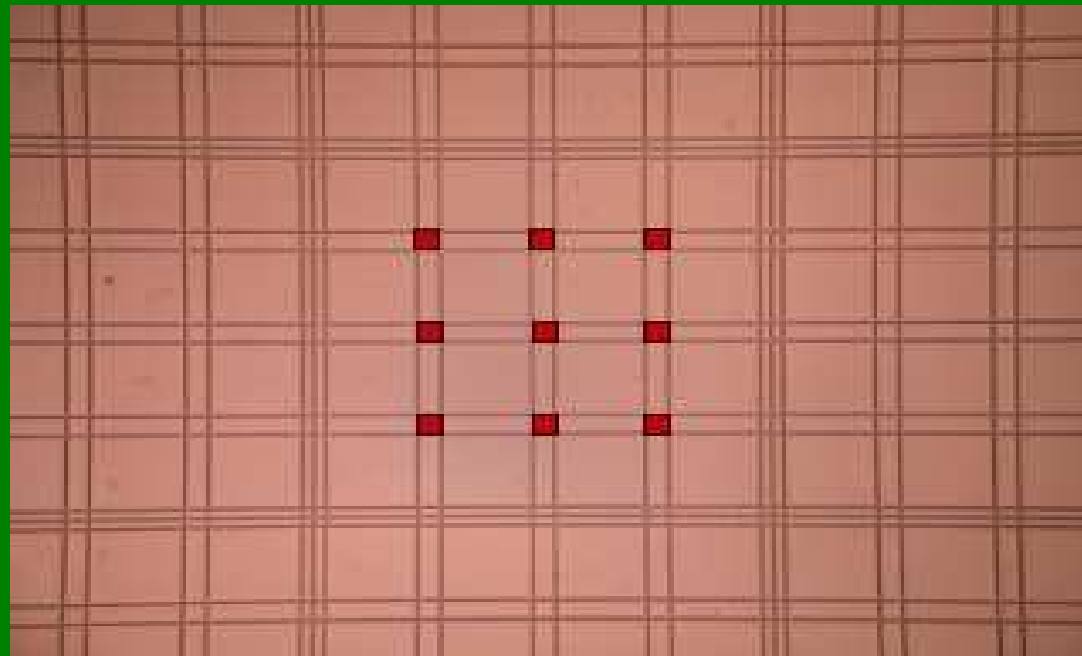
Bourková L., OKH FN Brno

Bürkerova komůrka



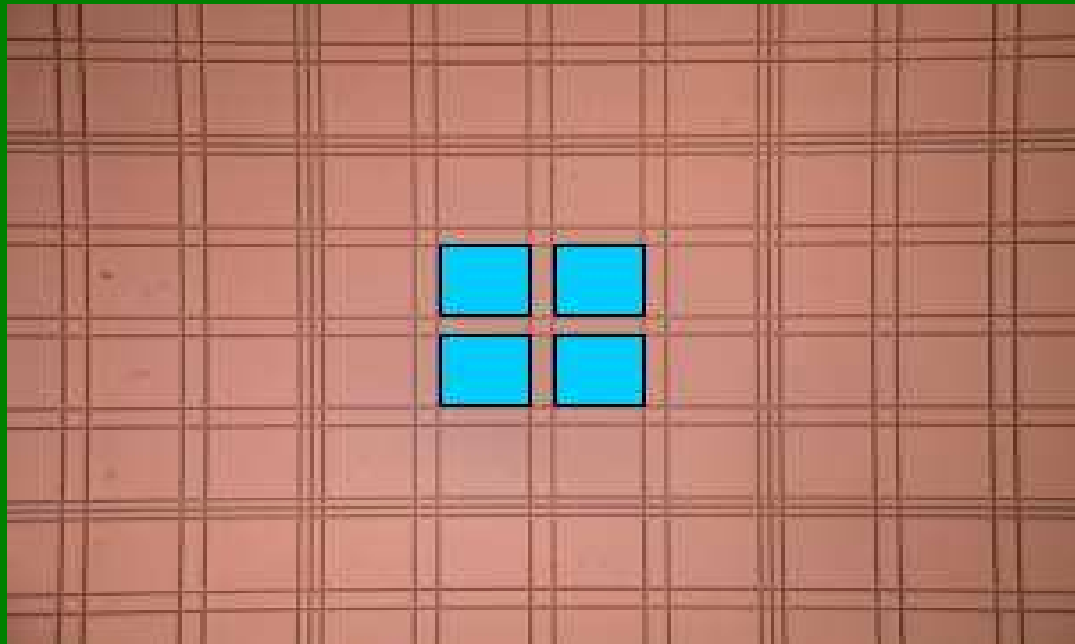
Bürkerova komůrka – počítání RBC

Červené krvinky (RBC) se počítají v 80 malých čtvercích. Získaný počet RBC se vynásobí koeficientem 10^{10} (koeficient zahrnuje ředění krvinek – 200x a objem kvádrů pod sklíčkem, ve kterých jsou buňky počítány). Tím se získá počet erytrocytů v litru krve tedy (RBC x $10^{12}/l$).



Bürkerova komůrka – počítání WBC

Bílé krvinky (WBC) se počítají v 50 větších čtvercích. Zjištěný počet WBC se vynásobí koeficientem 10^8 (koeficient zahrnuje ředění krvinek – 20x a objem kvádrů pod sklíčkem, ve kterém jsou buňky počítány). Tím se získá počet leukocytů v litru krve tedy $(WBC \times 10^9/l)$.



Hematologické analyzátořy

- každý má svá jedinečná specifika
- dva základní principy měření:
 - optický
 - impedanční
- z měření získáváme informace o:
 - počtu buněk
 - velikosti, tvaru a složení buňky
- principy měření mohou být na jednotlivých analyzátořech různě kombinovány
- různé kombinace pak umožňují velmi přesnou kvantitativní i kvalitativní analýzu všech prošlých buněčných elementů

Principy měření

- absorpční spektrofotometrie
- mikrohematokritová metoda
- impedanční analýza
 - možné doplnění vysokofrekvenční analýzou
- optická analýza
 - prošlého světla
 - rozptýleného světla
 - fluorescence

Používaná diagnostika

- ředící roztoky
 - *impedanční analýza*
vodivý roztok + nevodivá buňka
 - *optická analýza*
opticky inaktivní roztok + opticky aktivní buňka
- lyzační roztoky
hemolýza erytrocytů
- barvicí roztoky
barvení obsahu buňky (granula, DNA, RNA)
- čistící roztoky
čištění měřícího systému

Absorbční spektrofotometrie

- Metoda slouží ke stanovování množství hemoglobinu ve vzorku. V dnešní době se již jedná většinou o bezkyanidové metody.

Mikrohematokritová metoda

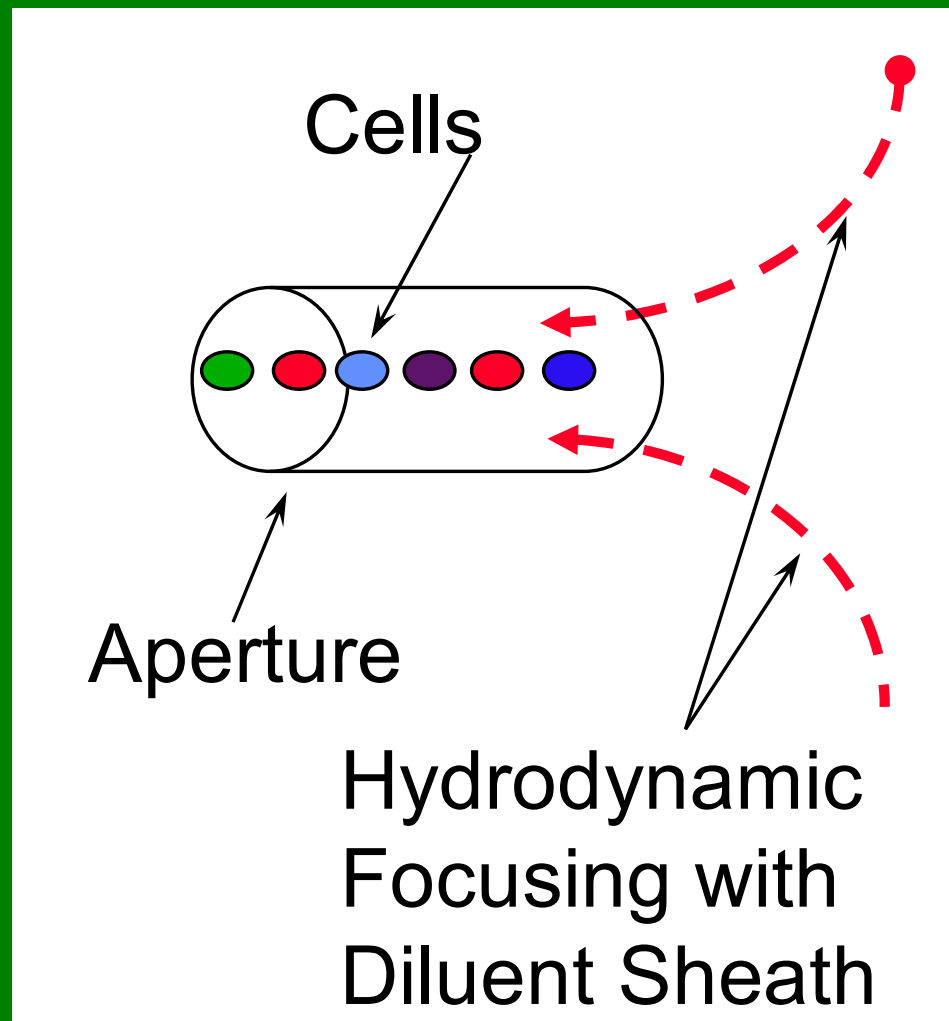
- Centrifugační metoda
v mikrohematokritových kapilárách pro
stanovení PCV – (*Packet Cell Volume*),
metoda je méně častá
 - většinou se vydává počítaný parametr
 $HCT = MCV \times RBC$

Poznámka: hodnoty PCT bývají obecně lehce nižší než HCT

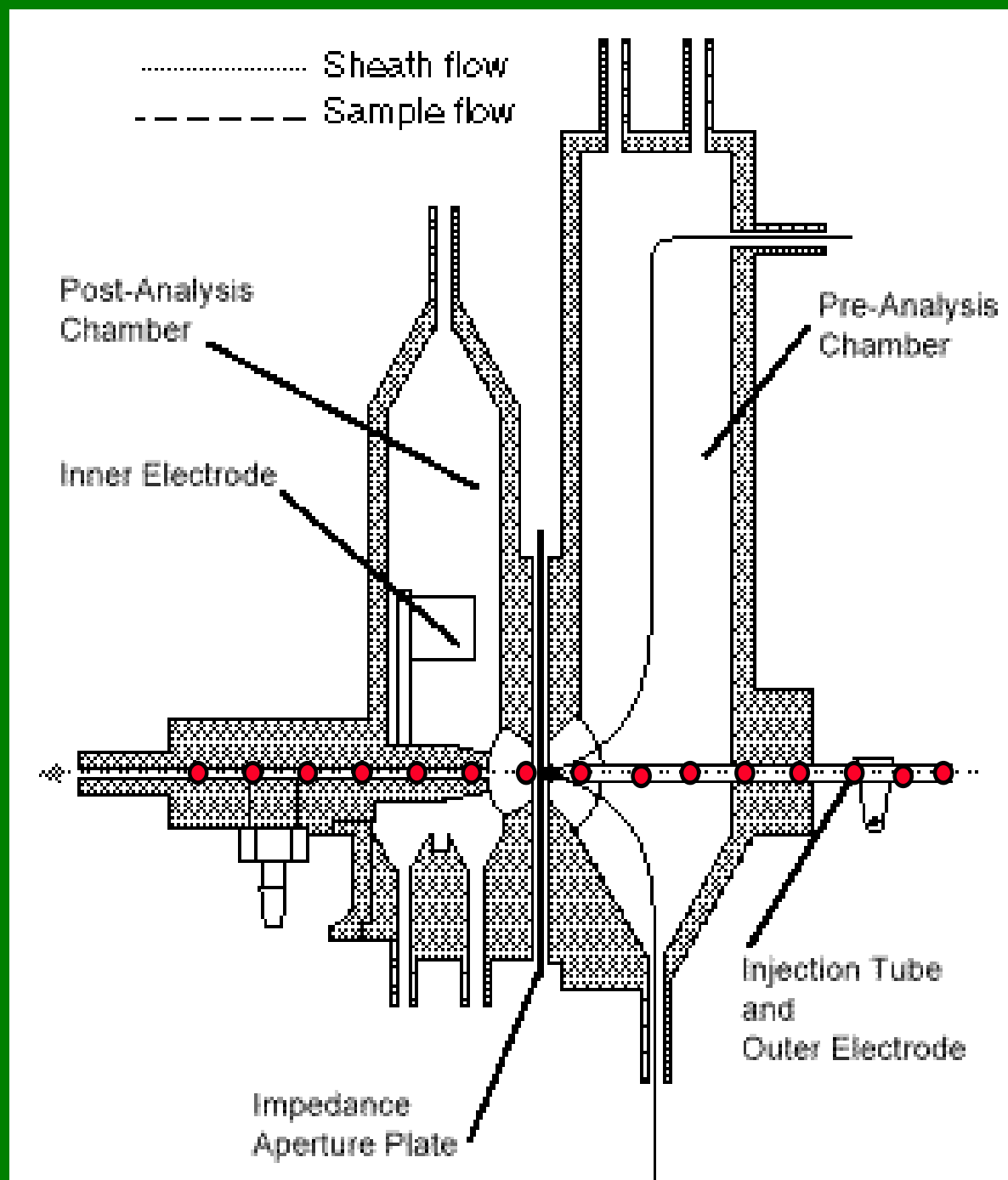
Impedanční analýza

- Počty a velikosti krevních elementů jsou dány měřením změny elektrického odporu - impedance při průchodu jednotlivých buněk v průtokové měřící kyvetě mezi dvěma elektrodami. Používá se metoda hydrodynamické fokusace (unášení jednotlivých buněk proudem kapaliny) ve vodivém roztoku. Při průchodu částice mezi elektrodami vzniká impedanční impuls, po jehož analýze přístroj vydává kvantitativní (počet impulsů) a kvalitativní (velikost impulsů) informace o jednotlivých buňkách.
- Měření může být doplněno například vysokofrekvenční analýzou, při které je na stejnosměrné elektrické pole superponováno vysokofrekvenční elektrické pole, které pronikne cytoplazmou a změří vysokofrekvenční vodivost buňky, nebo-li její fyzikálněchemickou strukturu.

Hydrodynamická fokusace



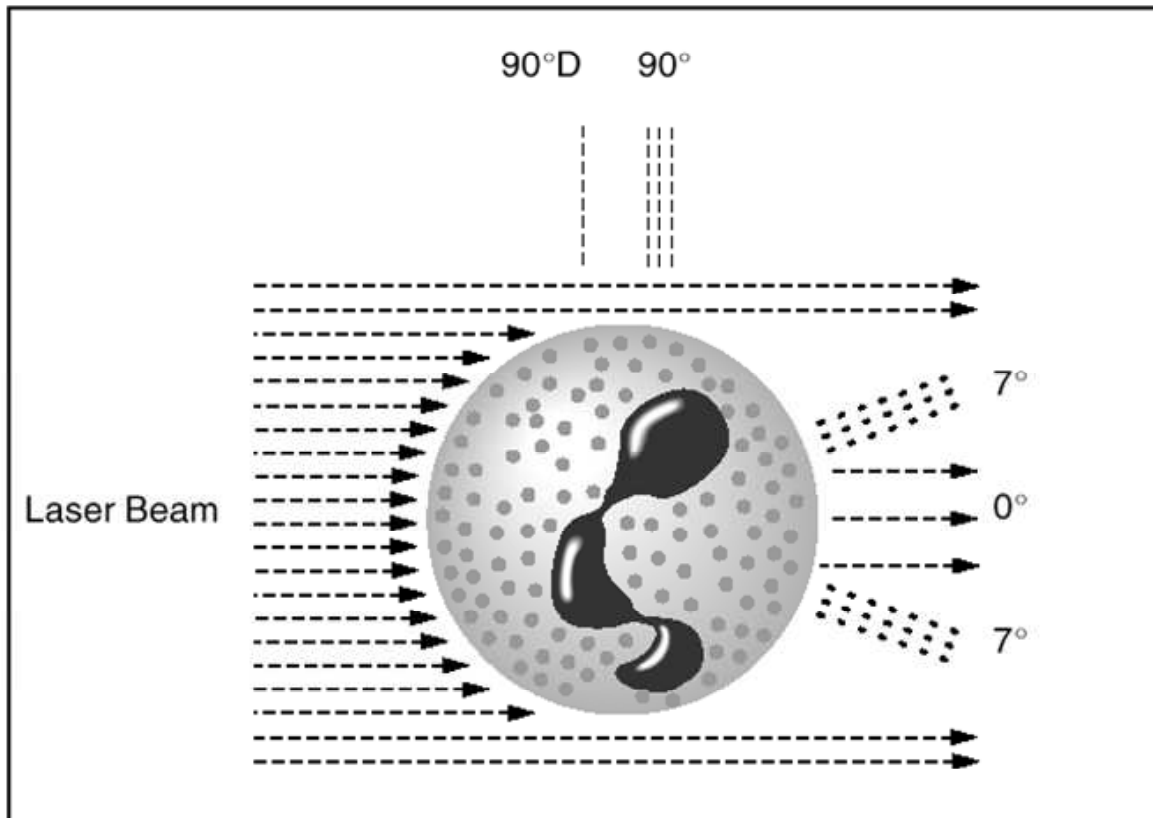
Impedanční analýza



Optická analýza

- Analýza je založena na principu průtokové cytometrie, při které se po interakci buňky s laserovým paprskem detekuje rozptýlené světlo nebo fluorescence. Průtoková cytometrie slouží jako metoda pro analýzu jednotlivých buněk v buněčné suspenzi. Buňky prochází jedna za druhou průtokovou kyvetou pomocí hydrodynamické fokusace a při tom každou jednotlivou buňkou projde laserový paprsek, který je po průchodu podroben analýze.
 - prošlé světlo
 - rozptýlené světlo
 - fluorescence

Optická analýza



Analýza prošlého světla

- Detekce paprsku ve směru 0° udává hodnoty:
 - počet prošlých buněk
 - velikosti jednotlivých buněk

Analýza rozptýleného světla

- Každá buňka je ozářena proudem polarizovaného světla (laserový paprsek) a po projití paprsku buňkou je provedena analýza depolarizovaného (rozptýleného) paprsku v různých detekčních úhlech.
- Analýza může být u některých přístrojů doplněna cytochemickým barvením buněk. Jednotlivé buňky jsou po nabarvení také ozářeny laserem a opět se vyhodnocuje výsledné depolarizované světlo.
- Měření slouží nejen k početní analýze, ale i k detekci tvaru a velikosti buňky, jádra a granularity cytoplazmy

Analýza fluorescence

- Buňky jsou nejprve obarveny speciálními barvami a potom ozařovány polarizovaným paprskem světla (laserovým paprskem).
- Každá buňka nejprve světlo absorbuje a potom světlo emituje o vyšší vlnové délce, které je detekováno a analyzováno.
- Měření složí k detekci DNA a RNA v buňkách nebo ke specifikaci buněk na základě přítomných povrchových antigenů (CD znaky).

Analýza fluorescence

