

Počítání krevních buňek

Bourková L., OKH FN Brno

Hematologické analyzátory

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

Principy měření

- absorbní spektrofotometrie
- impedanční analýza
 - možné doplnění vysokofrekvenční analýzou
- optická analýza
 - prošlého světla
 - odraženého světla
 - depolarizovaného světla
 - fluorescence
 - *cytochemická*

Poznámka: dle typu analyzátoru lze počítat i více jak 10.000 buněk a více jak 40.000 informací

Používaná diagnostika

- analýza nesrážlivé periferní krve
 - odběr do solí EDTA (K^{2+} , K^{3+} , Na^{2+})
- ředící roztoky
 - *impedanční analýza*
vodivý roztok + nevodivá buňka
 - *optická analýza*
opticky inaktivní roztok + opticky aktivní buňka
- lyzační roztoky
hemolýza erytrocytů a dle typu analyzátoru může být i destrukce jiných krevních elementů
- barvicí roztoky
barvení obsahu buňky (granula/enzymy, 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.

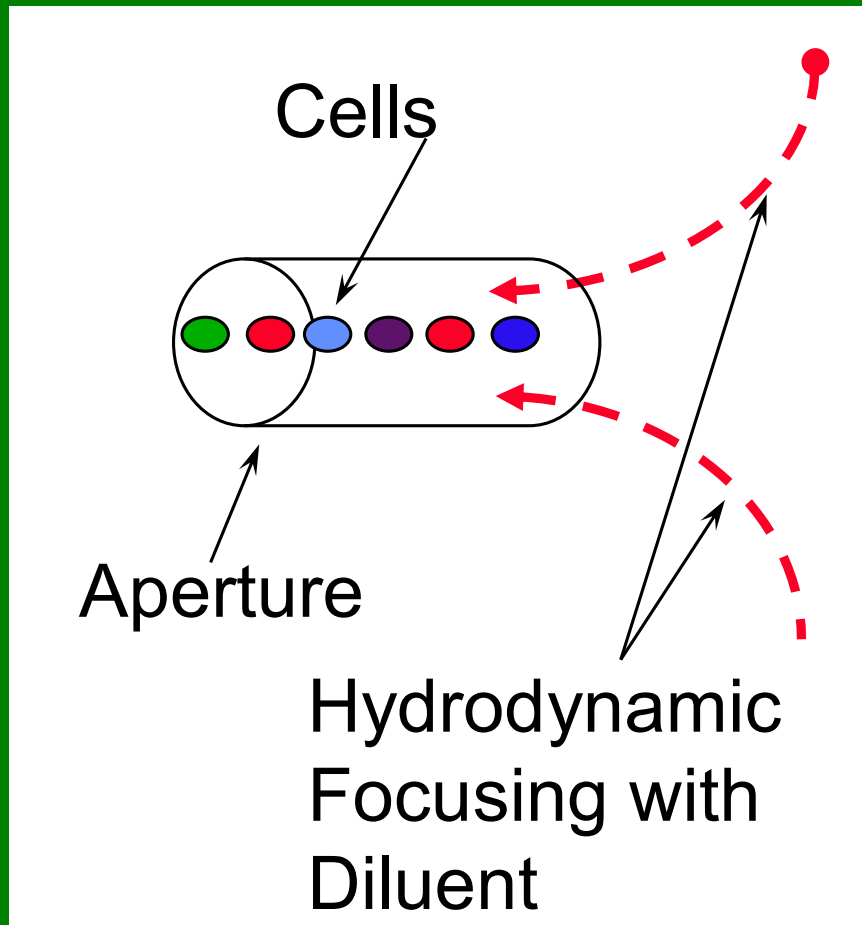
Impedanční analýza - I

- mezi elektrodami je v apertuře standardní vodivost (standardní vodivost diluentu)
- při průchodu buňky aperturou se vodivost naruší/změní \rightarrow impedanční impulz (odpor)
- četnost impulzu \rightarrow počet buněk
velikost impulzu \rightarrow velikost buňky

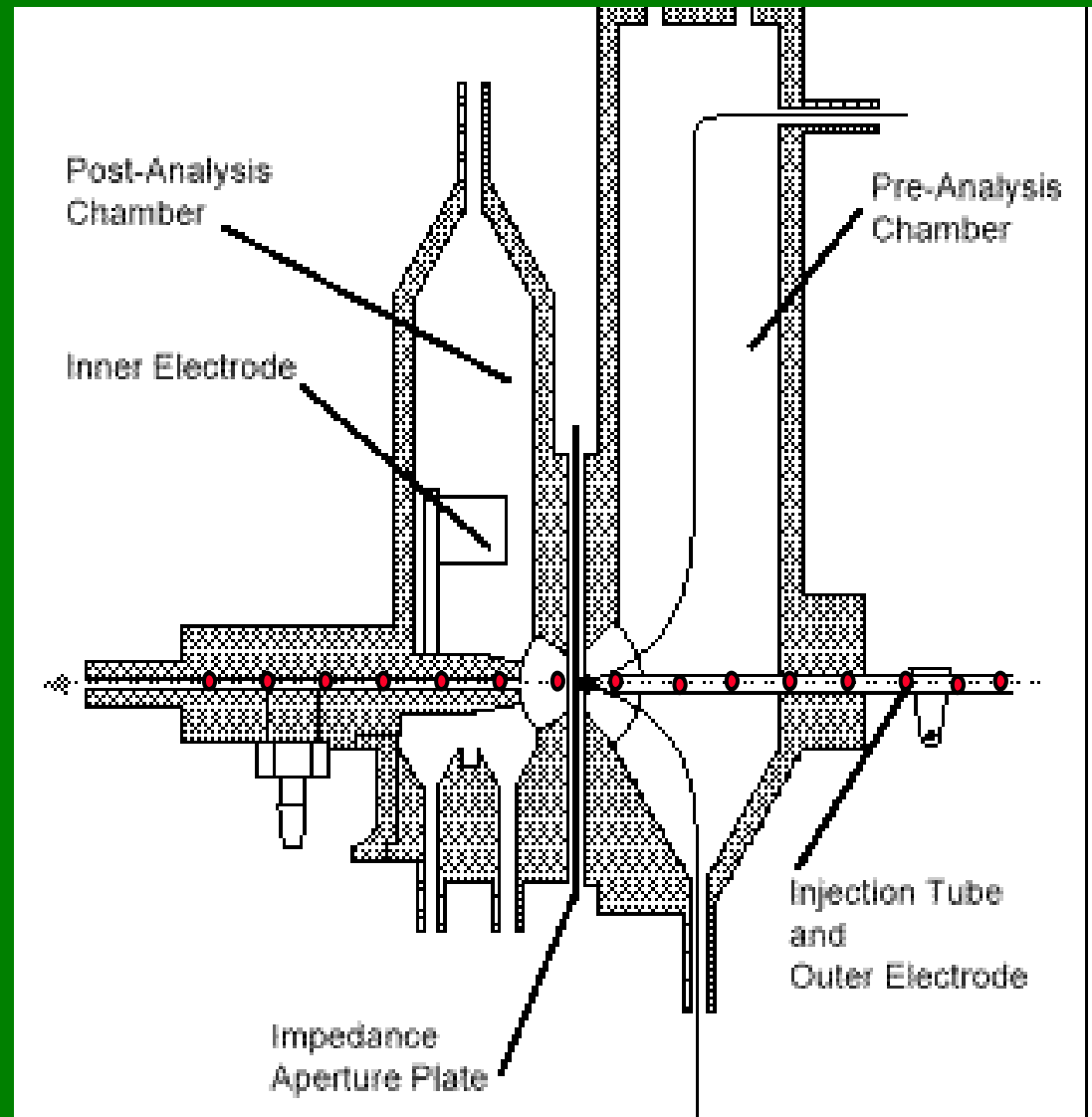
Impedanční analýza - II

- využívá se hydrodynamická fokusace: unášení jednotlivých buněk proudem kapaliny
- měření může být doplněno například vysokofrekvenční analýzou:
na stejnosměrné elektrické pole → superponováno vysokofrekvenční elektrické pole → pronikne cytoplazmou → pak se změří vysokofrekvenční vodivost buňky → ta odpovídá její fyzikálněchemické struktuře
(kvalitativní analýza buňky)

Hydrodynamická fokusace



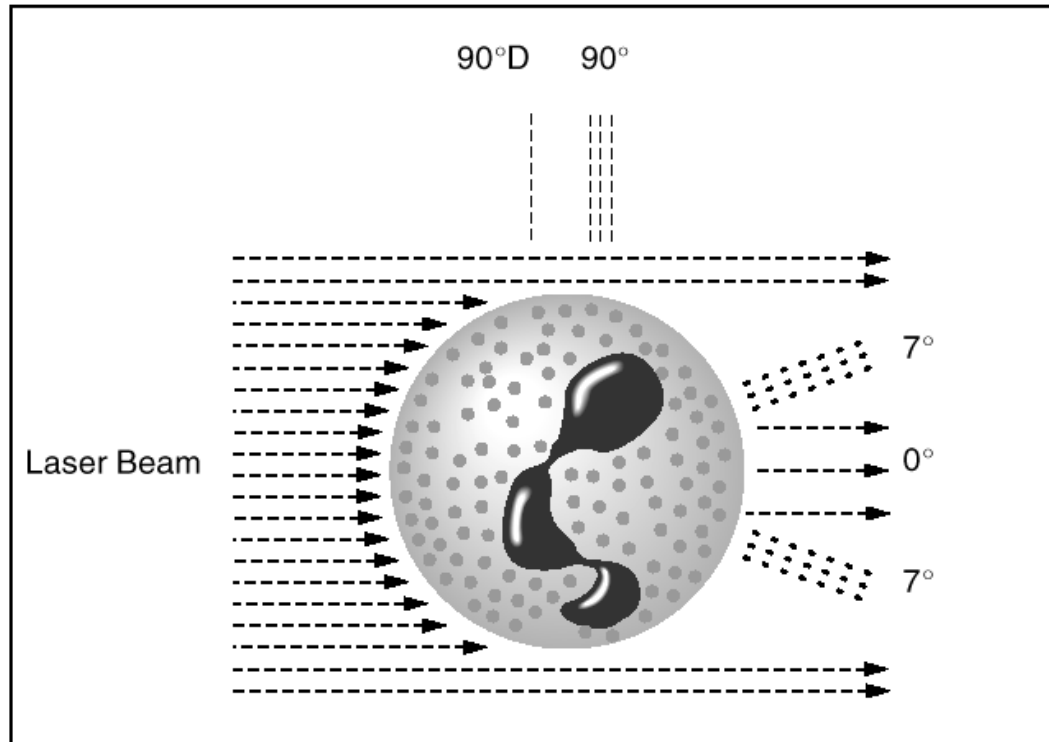
Impedanční analýza



Optická analýza

- využívá se hydrodynamické fokusace
- využívá se průtoková cytometrie:
 - každá buňka je ozářena monochromatickým laserovým paprskem
 - po interakci buňky s paprskem se provádí analýza
 - analyzuje se samostatně každá buňka v suspenzi
- detekuje se světlo:
 - prošlé
 - odražené
 - depolarizované
 - fluorescence

Optická analýza



Analýza prošlého světla

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

Analýza odraženého a depolarizovaného světla

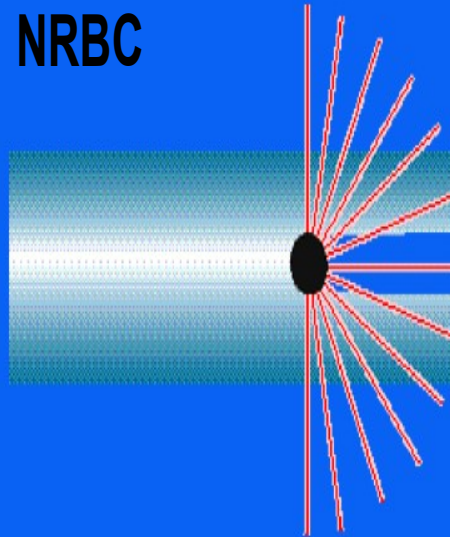
- Detekce paprsků v různých úhlech (*dle typu analyzátoru*).
- Analýza může být doplněna cytochemickým barvením buněk.
- Měření slouží k detekci tvaru a velikosti buňky, jádra a granularity cytoplazmy

Analýza fluorescence

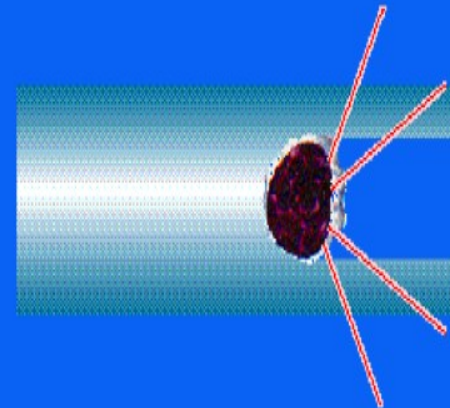
- Obarvení buňky speciálními barvami → ozáření buňky laserovým paprskem.
- Absorbce světla buňkou → emise světla o vyšší vlnové délce → detekce emitovaného světla
- Detekce: DNA, RNA nebo povrchové antigeny (CD znaky).

Analýza fluorescence

NRBC



WBC



Cytochemická analýza

- v buňkách (WBC) je barvena peroxidáza např. Sudanovou černí
- cytochemická analýza je vždy kombinovaná současně s jinou analytickou metodou (optickou)