

**FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO**



Vyšetřování na rutinní morfologii

Úsek rutinní morfologie
Oddělení klinické hematologie
Fakultní nemocnice Brno

RNDr. Jana Klinerová

Vyšetření krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů

- jedno ze základních vyšetření pro diagnostiku a sledování léčby řady onemocnění
- krevní obraz je komplexní soubor výsledků, které spolu úzce souvisí
- analýza se provádí na hematologických analyzátorech
- vyšetření se provádí z nesrážlivé periferní krve, jako protisrážlivé činidlo se do odběrových zkumavek používá standardně K3EDTA, K2EDTA nebo NA2EDTA

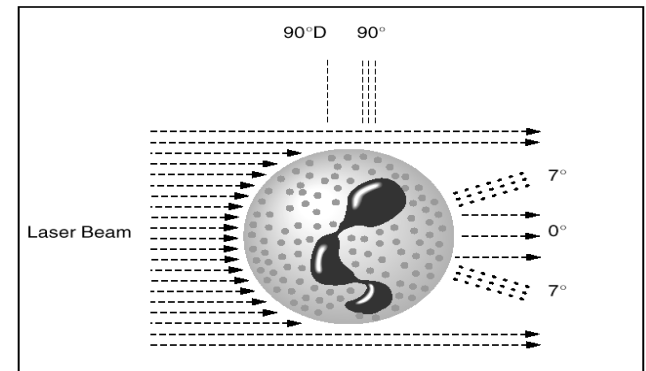
Hematologické analyzátory

- každý má svá jedinečná specifika
- základní principy měření:
 - Optická analýza (opticky inaktivní roztok + opticky aktivní buňka)
 - Impedanční analýza (vodivý roztok + nevodivá buňka)
 - Absorbční spektrofotometrie (stanovení množství hemoglobinu)
- 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 prošlých buněčných elementů

Impedanční analýza

- je založena na měření změny elektrického odporu (impedance) při průchodu jednotlivých buněk v průtokové měřicí kyvetě mezi dvěma elektrodami
- mezi elektrodami je standardní vodivost , při průchodu buňky aperturou se vodivost změní → impedanční impulz (odpor)
- četnost impulzu → počet buněk
velikost impulzu → velikost buňky
- 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*)

Optická analýza



- využívá se průtoková cytometrie:
(spolu s hydrodynamickou fokusací)
 - 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 (detekce paprsku ve směru 0° poskytuje informace o počtu a velikosti jednotlivých prošlých buněk)
 - odražené a depolarizované (detekce paprsku v různých úhlech slouží k detekci tvaru a velikosti buňky, jádra a granularity cytoplazmy)
 - fluorescence (barvení buňky speciálními barvami → ozáření buňky laserovým paprskem → detekce emitovaného světla), detekce DNA, RNA a CD znaků

Fyziologické hodnoty KO (referenční intervaly)

- **WBC** ($10^9/l$) 4,0 - 10,0
White Blood Cells, leukocyty
- **RBC** ($10^{12}/L$)
ženy 3,8 - 5,4
muži 4,0 - 5,9
Red Blood Cells, erytrocyty
- **HGB** (g/L)
ženy 120 - 160
muži 130 - 176
Hemoglobin
- **HCT** (l/l)
ženy 0,35 - 0,46
muži 0,39 - 0,51
Hematocrit
- **MCV** (fl) 84 - 96
Mean Cell Volume
- **PLT** ($10^9/l$) 150 - 400
Platelets, trombocyty
- **MCH** (pg) 28 - 34
Mean Corpuscular HGB
- **MCHC** (g/l) 320 - 370
Mean Corpuscular HGB Concentracion
- **RDW** (%CV) 10 - 15,2
RBC distribution width
- **MPV** (fl) 7,8 - 11,0
Mean PLT Volume
- **PDW** 15,5 - 17,1
PLT distribution width
- **RETI** (%) 0,5 - 2,5
Reticulocyte
RETI ($10^9/l$) 25 - 75
- **NRBC** ($10^9/l$, NRBC/100WBC), normoblasty

Diferenciální rozpočet leukocytů

neutrofilní segmenty	lymfocyty 20 - 45 (%)	eozinofily 0 - 8 (%)
	50 - 70 (%)	monocyty bazofily
neutrofilní tyče 0 - 5 (%)	2 - 12 (%)	0 - 1 (%)

Hodnocení KO

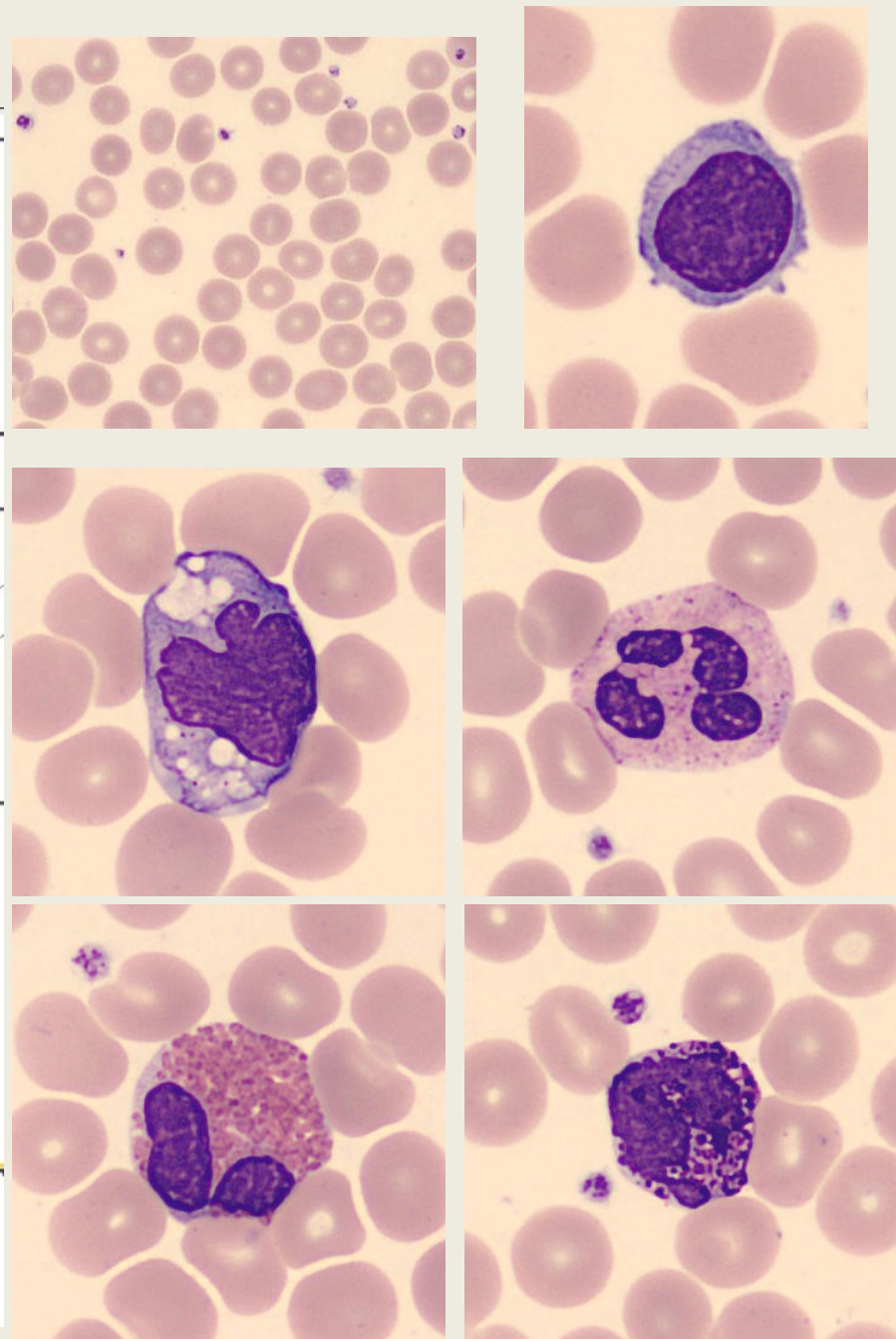
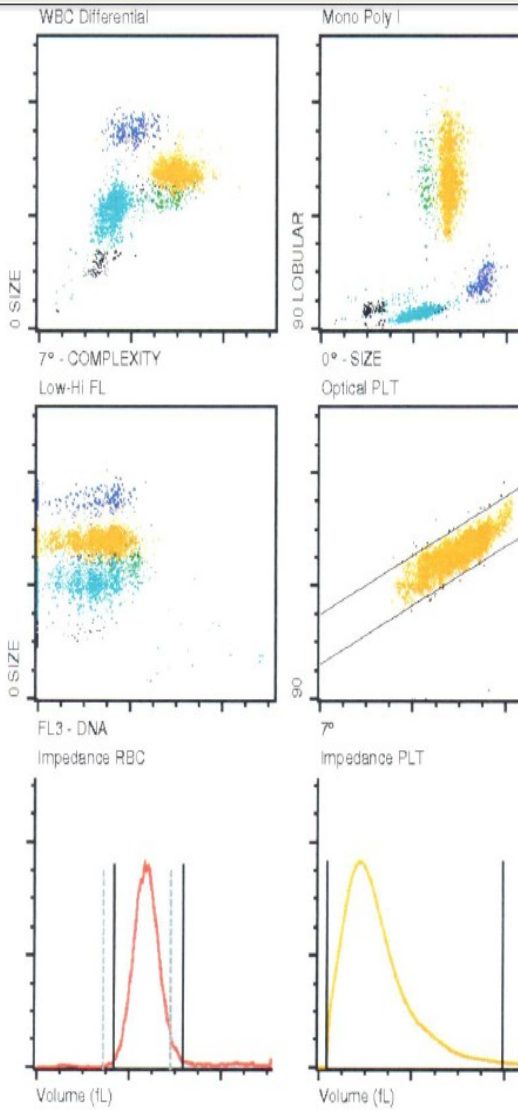
- **numerické výsledky**
- **grafické výsledky (scatergramy, histogramy)**
- **hlášení analyzátoru**
- případná kontrola mikroskopem
- vyšetření poprvé / opakovaně
- typ diagnózy
- pacient: ambulantní, lůžkové odd., JIP...
- vyšetření rutinní, statimové, speciální, vitální indikace
- výsledky jsou mimo referenční rozmezí
- náhlé změny v KO
- interference
- patologická hlášení
- správný odběr, typ vyšetřovaného materiálu

Fyziologický vzorek

Sex: F
 Doctor: 0717/27/06/2013
 User Defined A:
 User Defined B:
 User Defined C:
 User Defined D:

X-B In	WBC In	RBC In	PLT In	RETC In	WVF	%S	%BD	%IG	%BL	%Me	%E	%B	%Le	%VL	RBCo	%MIC	%MAC	%HPO	%HPR	NRW	PLTi	CD61	PLTs	PLTi
WBC	7.36	10e9/L			.991																			
SEG	3.97					54.0																		
BAND	0.00					0.00																		
IG	0.00					0.00																		
BLST	0.00					0.00																		
MONe	.450					6.11																		
EOS	.299					4.06																		
BASO	.023					.318																		
LYMe	2.61					35.5																		
VARL	0.00					0.00																		
RBC	4.13	10e12/L			4.22																			
HGB	138.	g/L			.661																			
HCT	.406	L/L			3.87																			
MCV	98.4	fL			---																			
MCH	33.5	pg			---																			
MCHC	341.	g/L			---																			
RDW	11.4	%CV			---																			
HDW	---	%			---																			
RETC	---	10e9/L			%R	---																		
IRF	---				---																			
NRBC	0.00	10e9/L			NRW	0.00																		
MCVr	---	fL																						
MCHr	---	pg																						
CHCr	---	g/L																						
PLTo	319.	10e9/L			PLTi	308.																		
MPV	8.03	fL			CD61	---																		
PDW	15.8	10(GSD)			PLTs	---																		
PCT	2.56	m/L			PLTi	---																		
%tP	---	%																						

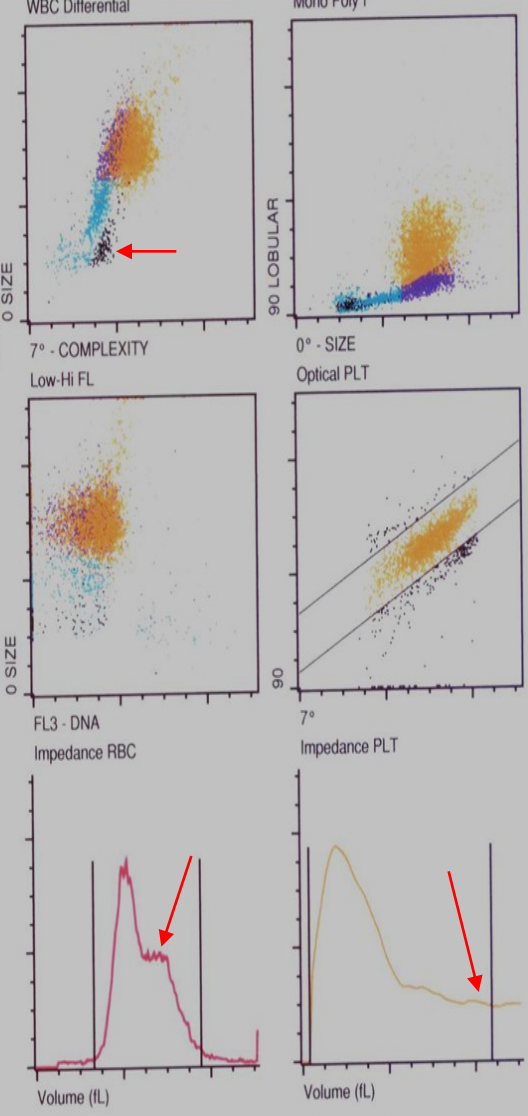
Manual Differential		RBC Morphology	
SEG	META	NORMAL	MICRO
BAND	MYELO	POLYCH	MACRO
LYMPH	PRO	HYPDCH	ANISO
MONO	BLAST	POIK	BASOSTIP
EOSIN	VAR LYM	TARGET	
BASO	TOXGRAN	SPHERO	NRBC
PLT EST		PLT MORPH	



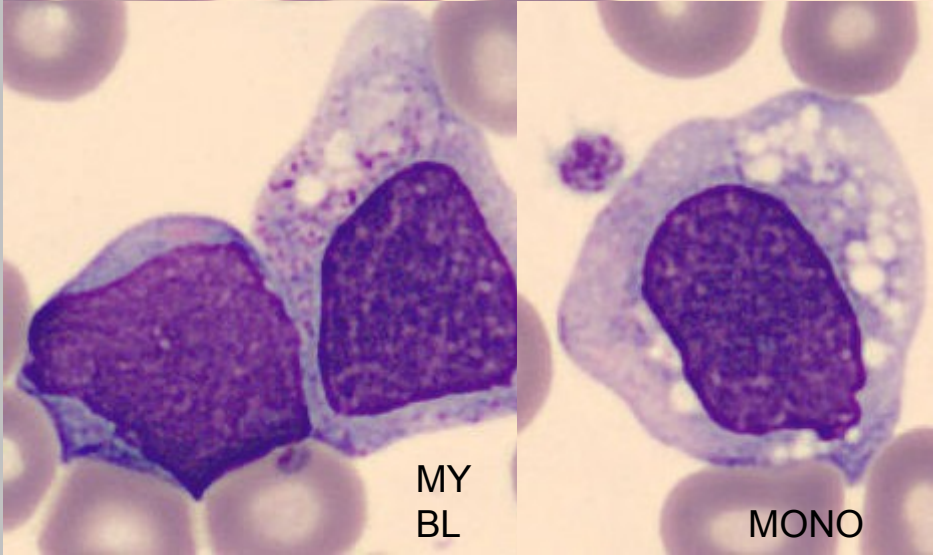
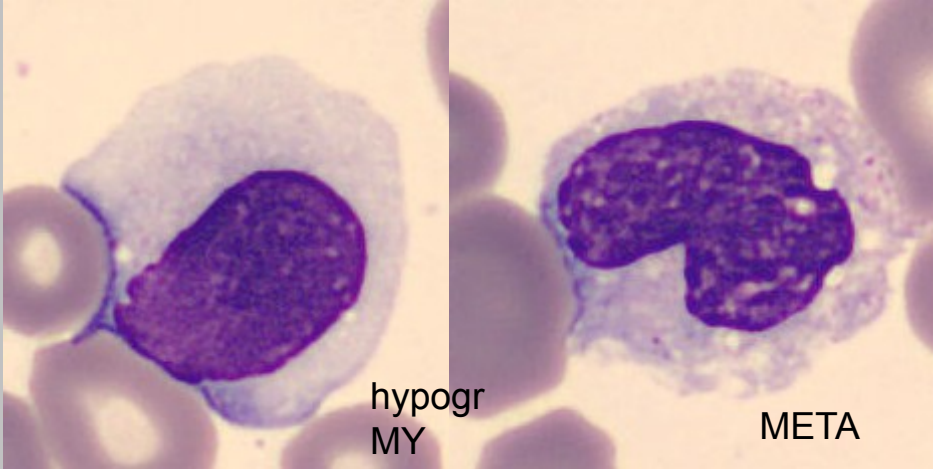
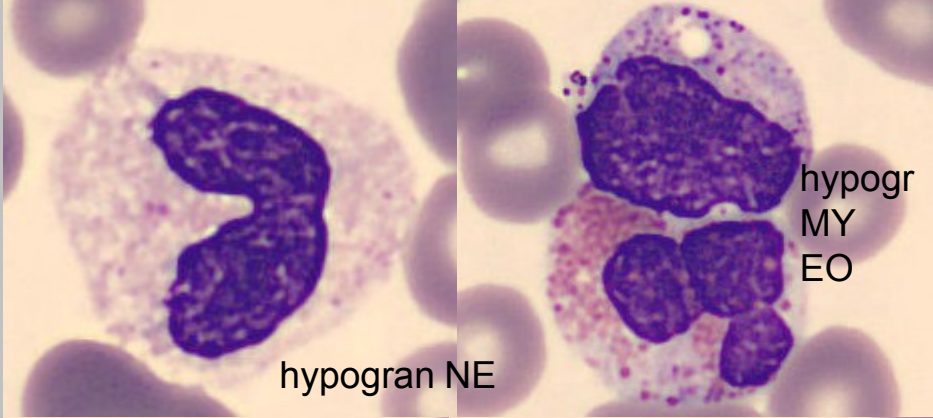
Sex: F
 Doctor: 0568/30/04/2010
 User Defined A:
 User Defined B:
 User Defined C:
 User Defined D:

X-B In	WBC In	RBC In	PLT In	RETC In	
16.5*	10e9/L				
8.53*					
2.99*					
1.47*					
1.59					
2.79					
.018*					
0.00					
1.80					
0.00					

RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	RETC	IRF	NRBC	PLT ₀	MPV	PDW	PCT
2.80s	97.3	271	96.8s	34.8s	360.s	21.4s	---	---	0.00s	48.3	12.8*	24.9*	621*
10e12/L	g/L	L/L	fL	pg	g/L	%CV	10e9/L	%R	10e9/L	10e9/L	fL	10(GSD)	mL/L



Unable to Find Clear Separation Between WBC Subpopulations
 Lower, Upper, or Lower and Upper Region Interference in PLTi Histogram
 PIC/POC Delta



Laboratorní informační systém

Pojišťovna...111	VZP	BM...
Oddělení.....33293	Zo..E
Lékař.....72100059	
Diagnoza.....D471		Výška [cm]
F1 Komentář.....		Váha [kg]
---Dat.nar.----- 5/ 9/1943-Ž- (M/Ž)			
F9 VYŠETŘENÍ.....		F3 Sign(+-) *	11636/21/02

KO = 0	MPV = 9.30	MONO= 1.08	Eos9= 2.00	NRBC= 9	LGLh= 4
WBC = 9.18	PCT = 2.80	EOS = 0.13	Bas9= 3.00	HodE=polychr	= 0.26
RBC = 3.85	PDW = 10.00	BASO= 0.31	META= 8.00	HodL=hypogra	AKRE=
HGB = 115.00	NEU%= 69.10	NRBC= 0.71	MYEL= 6.00	HodL=	AU =XE-5000
HCT = 0.33	LYM%= 14.30	NR/W= 7.70	PROM= 0.00	HodP=anizo P	KOME=Left Sh
MCV = 86.20	MON%= 11.80	Dif	MYBL= 0.00	Dif:=RNDr. L	= 0
PLT = 299.00	EOS%= 1.40	Neu9= 52.00	Prol= 0.00	Dif:=	K LA= 198
MCH = 29.90	BAS%= 3.40	Ban9= 13.00	Plb = 0.00	Dif:=	K S = 44
MCHC= 346.00	NEU = 6.35	Lym9= 12.00	NeBu= 0.00	H100= 100.00	SUIT= 12939
RDW = 17.80	LYM = 1.31	Mon9= 3.00	NeBl= 1.00	LGL = 0.367	UPO =Výsledk

==== 119==== 130==== 144==== 198==== 44====

onec=ESC F2=Tisk F4=Archiv F8=Do Pošty F9=Změny výsledků Listování=PgUp,PgD

Laboratorní informační systém – historie vyšetření

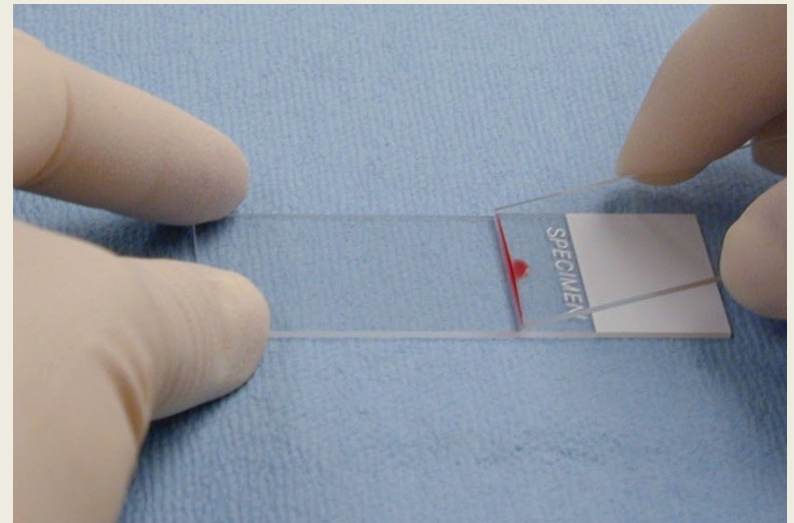
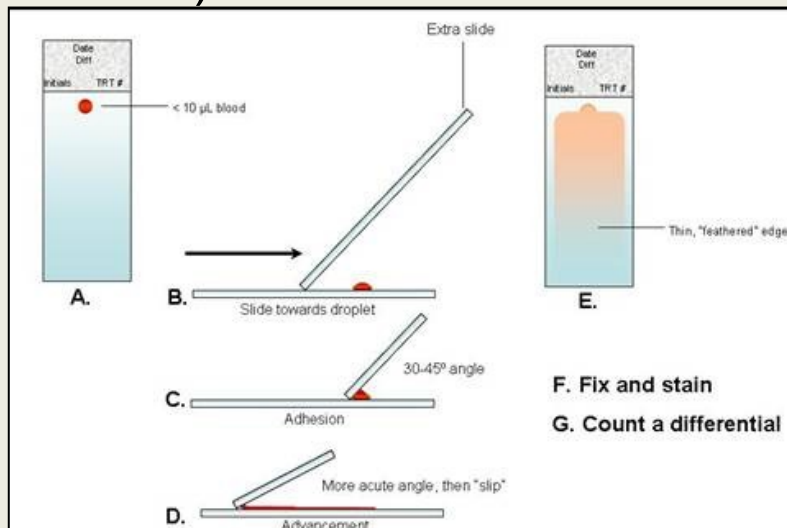
21/02/2014	10/01/2014	27/11/2013	27/11/2013	27/11/2013	25/10/2013
WBC = 9.18	WBC = 10.30		WBC = 11.30		WBC = 9.33
RBC = 3.85	RBC = 3.52		RBC = 3.68		RBC = 3.36
HGB = 115.00	HGB = 110.00		HGB = 108.00		HGB = 102.00
HCT = 0.33	HCT = 0.30		HCT = 0.31		HCT = 0.29
MCV = 86.20	MCV = 86.10		MCV = 84.50		MCV = 86.30
PLT = 299.00	PLT = 362.00		PLT = 423.00		PLT = 352.00
MCH = 29.90	MCH = 31.10		MCH = 29.30		MCH = 30.40
MCHC= 346.00	MCHC= 361.00		MCHC= 347.00		MCHC= 352.00
RDW = 17.80	RDW = 16.90		RDW = 17.00		RDW = 17.40
MPV = 9.30	MPV = 7.18		MPV = 6.95		MPV = 8.90
PCT = 2.80	PCT = 2.60		PCT = 2.94		PCT = 3.10
PDW = 10.00	PDW = 16.70		PDW = 17.00		PDW = 9.30
NEU = 6.35	NEU = 7.82		NEU = 7.35		NEU = 6.63
LYM = 1.31	LYM = 1.54		LYM = 2.66		LYM = 1.14
MONO= 1.08	MONO= 0.82		MONO= 1.10		MONO= 1.11
EOS = 0.13	EOS = 0.09		EOS = 0.11		EOS = 0.17
BASO= 0.31	BASO= 0.01		BASO= 0.04		BASO= 0.28
NEU%= 69.10	NEU%= 76.00		NEU%= 65.30		NEU%= 71.10
LYM%= 14.30	LYM%= 14.90		LYM%= 23.60		LYM%= 12.20
MON%= 11.80	MON%= 8.00		MON%= 9.81		MON%= 11.90
EOS%= 1.40	EOS%= 0.90		EOS%= 0.95		EOS%= 1.80
Komentář					
Konec=ESC F2=Tisk F5=Filtr metod <- ->					

Kontroly KO

- pravidelná kontrola KO i dif
- kontrola správnosti (firemní materiál)
- kontrola přesnosti (vitální krev)
- porovnatelnost (metodik, přístrojů, laboratoří.....)
- správná údržba přístroje (kontroly po údržbě)
- specifická pravidla pro daný analyzátor:
 - princip měření
 - rozsah hodnot měřených parametrů (linearita)
 - hlášení přístroje
 - měřený / počítaný parametr, grafy

Zhotovení nátěru krve

- řídí se hodnotou hematokritu (větší úhel = silnější nátěr)
- potřeby: podložní sklíčko, roztírací sklíčko
- roztírací sklíčko položit před kapku krve na podložním skle pod úhlem cca $30^\circ - 40^\circ$ (*nikdy ne do kapky krve*); po doteku krve a roztíracího skla se krev rozlije podél hrany skla; poté 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“ (alespoň 1 – 2 cm)

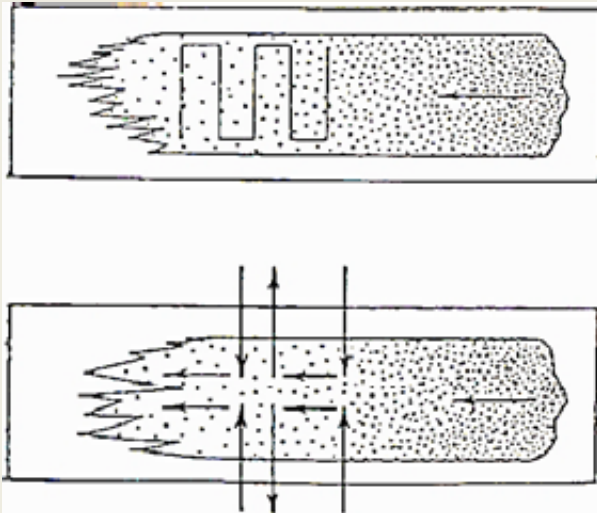


Barvení

- správné provedení nátěru, zaschnutí, fixování (metanol + barviva), barvení nátěrů (metanol + glycerin + fosfátové pufrů + barviva), pH 6,8 - 7,0
- Nejběžnější metoda barvení je Pappenheimova:
May-Grünwald / Giemsa-Romanowski

nejpoužívanější metoda, ve všech směrech zcela uspokojující

- preparáty lze také připravovat na nátěrových a barvicích automatech



- Kationtové (zásadité) barvy, jako je např. azur B, se váží na aniontovou složku a dávají modrošedá zbarvení nukleových kyselin (DNA nebo RNA), nukleoproteinů, granulí bazofilů a slabě barví granula neutrofilů.

- Aniontové (kyselé) barvy, jako je např. eosin Y, se váží na kationtovou složku proteinů a dávají oranžovočervená zbarvení hemoglobinu a eozinofilním granulím

Hodnocení PLT

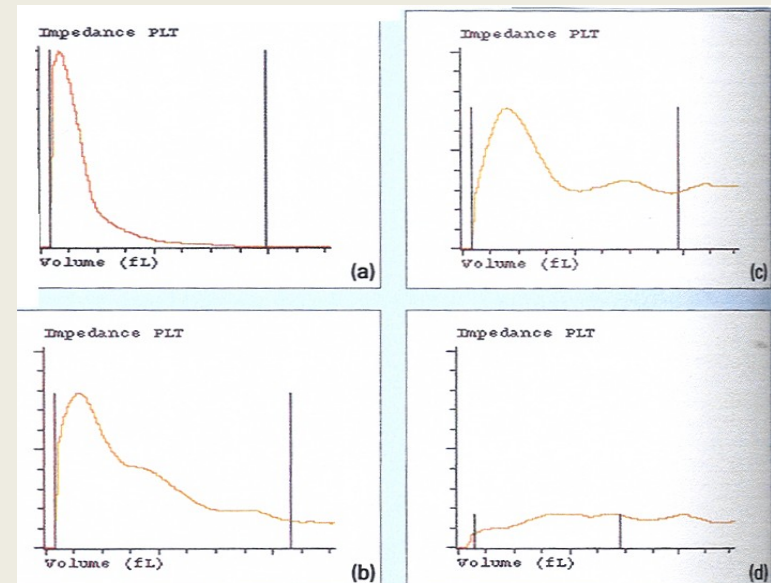
- velikost (MPV, PDW, distribuční křivka)
- kontrola mikroskopicky při početních a morfologických anomáliích
- hodnocení granulace, shluků (satelitózy), přítomnost MGK, holá jádra MGK
- speciální odběr (falešné trombocytopenie – vliv EDTA, satelitóza PLT) - odběr do hořčíku Mg^{2+} Tromboexact (nebo citrátu)
- opticky (vyloučí netrombocytární elementy)
- Imunologické vyšetření (CD61)
- Interference PLT: mikro RBC, makro PLT (sraženiny), buněčné/nebuněčné fragmenty



makro PLT

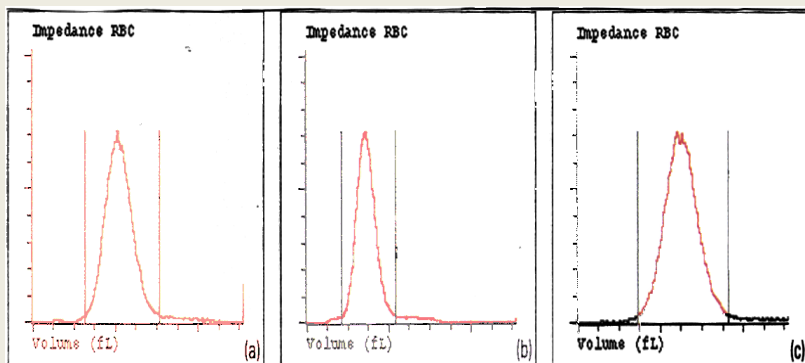


satelitóza PLT



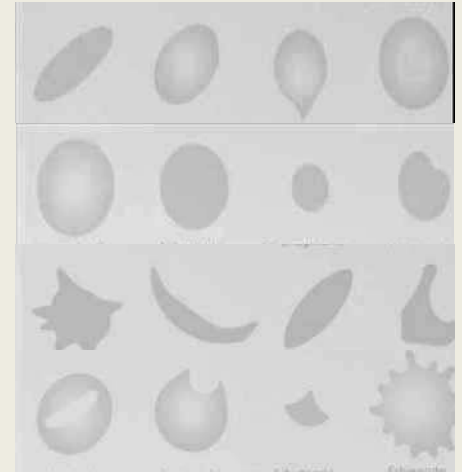
Hodnocení RBC

- měřené parametry: RBC, HGB, MCV (HCT)
- počítané parametry: HCT (MCV), MCH, MCHC, RDW + distribuční křivka (šířka, vrcholy)
- z měřených parametrů nelze jasně sledovat morfologii
- v vypočítaných parametřích a distribučních křivkách lze sledovat
 - MCV: normocyty, mikrococyty, makrococyty (izocytóza, anizocytóza)
 - MCH, MCHC: normochromie, hypochromie, hyperchromie
 - RDW+křivka: homogenita, heterogenita populace
- interference RBC: sraženiny/mikrosraženiny PLT, aglutinace
- mikroskopické hodnocení RBC: tvarové odchylky, buněčné inkluze, shluky, rozložení, jaderné elementy (NRBC)



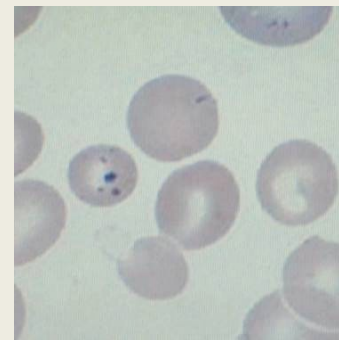
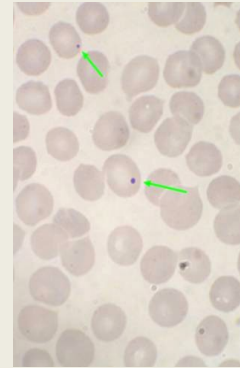
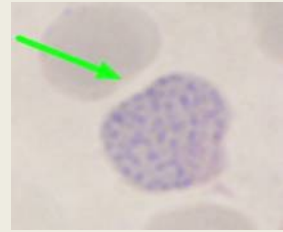
Poikilocyty – tvarové odchylky erytrocytů

- akantocyty
- eliptocyty
- echinocyty
- slzičkovité
- terčovitě
- schistocyty - fragmenty erytrocytů
- knizocyty
- keratocyty
- stomatocyty
- srpkovitě
- sférocyty



Inkluze v erythrocytech

- Bazofilní tečkování (degradované zbytky RNA v organelách)
- Howell-Jollyho tělíčka (jaderné fragmenty obsahují DNA)
- Cabotovy prstence (mikrotubuly z mitotického vřeténka nebo zbytky jaderné membrány)
- Pappenheimerova tělíčka (granula obsahují zásobní železo, agregují s mitochondriemi a ribozomy)

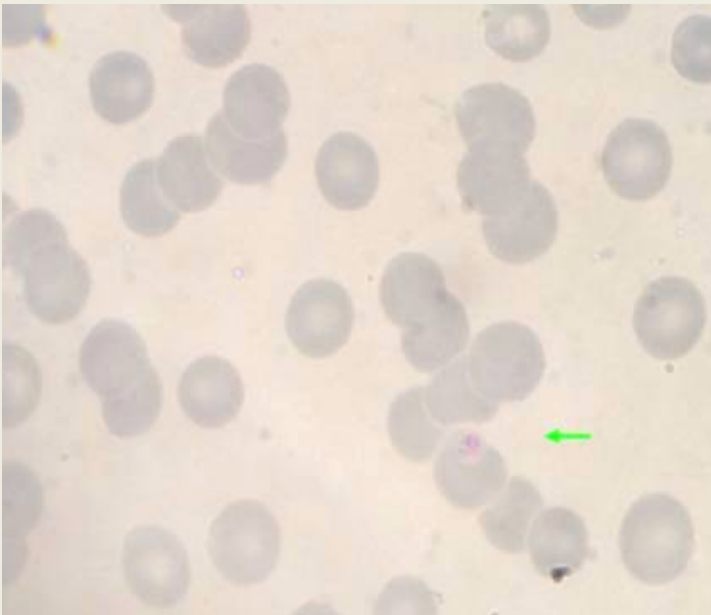


Penízkovatění (rouleax)

- erythrocyty tvoří „řetízky“
(tři a více buněk)

Příčina

zvýšené množství
plazmatických proteinů
navázaných na povrchu
erythrocytů

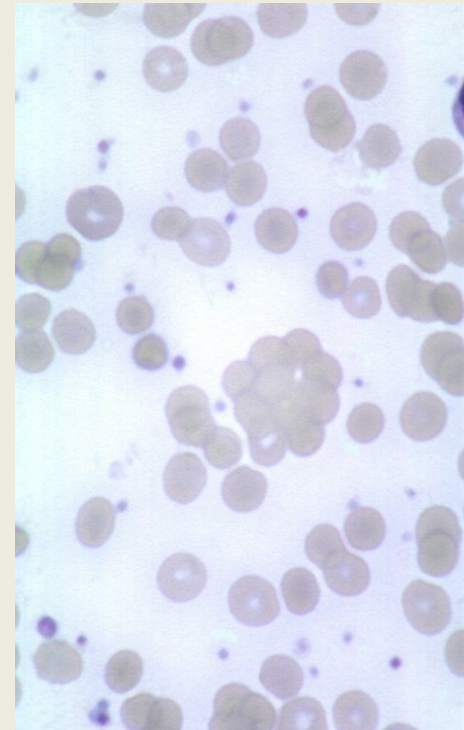


Aglutinace

seskupené erythrocyty do
větších, či menších shluků

Příčina

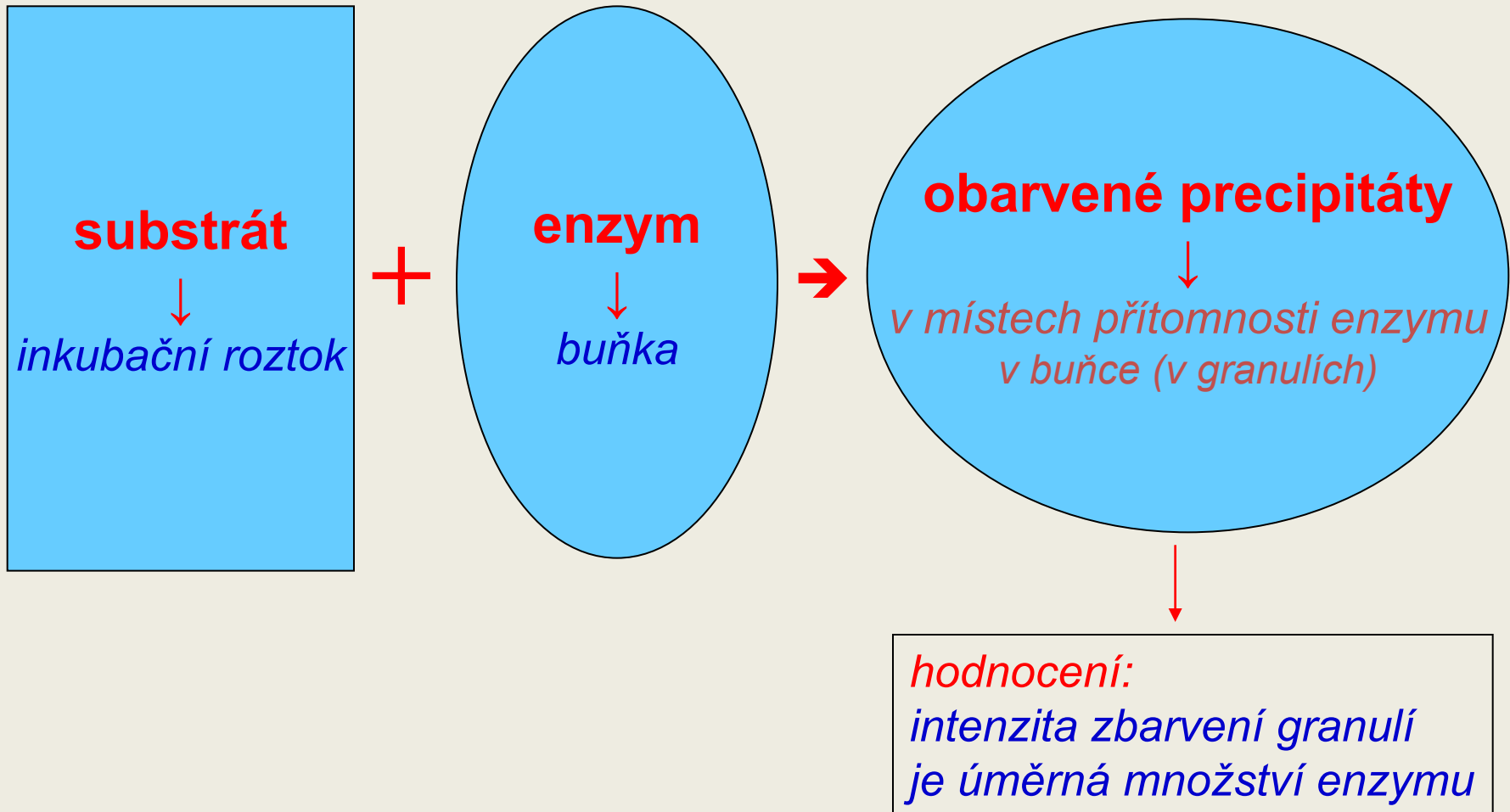
přítomnost protilátek
(nejčastěji chladové)



Hodnocení leukocytů

- Velikost buněk: malé, střední, velké
- Charakteristika jádra: jaderné stíny, holá jádra, poměr jádra k cytoplazmě, jaderný chromatin, jadérka (přítomnost, nepřítomnost, počet, velikost), členitost a tvar jádra (variantní lymfocyty, reaktivní lymfocyty), velikost jádra (tyče, metamyelocyty), hypo-,hyper segmentace NE
- Charakteristika cytoplazmy: granulace, bez granulace, specifická, nespecifická, toxická granulace, barevný odstín cytoplazmy (zralost buňky, reaktivní lymfocyty), vakuolizace, barevné inkluze, Auerovy tyče, okraje cytoplazmy (členité, hladké, vlasaté)
Velké granulované lymfocyty – LGL (large granular lymphocytes)

Cytochemická reakce



Cytochemie

- Myeloperoxidáza – myeloidní buňky, Auerovy tyče
- Nespecifická esteráza – zeslabení positivity po přidání NaF u monocytárních buněk
- PAS – průkaz sacharidů, vzhled positivity

Cytochemická vyšetření hodnotit v souvislosti s:

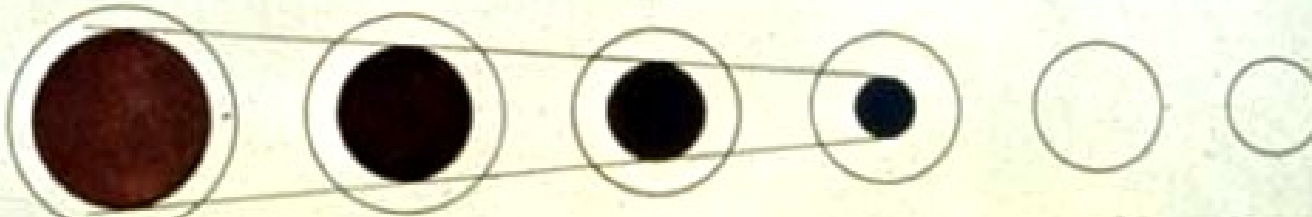
- ostatním cytochemickým vyšetřením
- morfologickým hodnocením a rozpočtem kostní dřeně
- stádiem vyzrávání buněk

Sledování buněčných morfologických změn



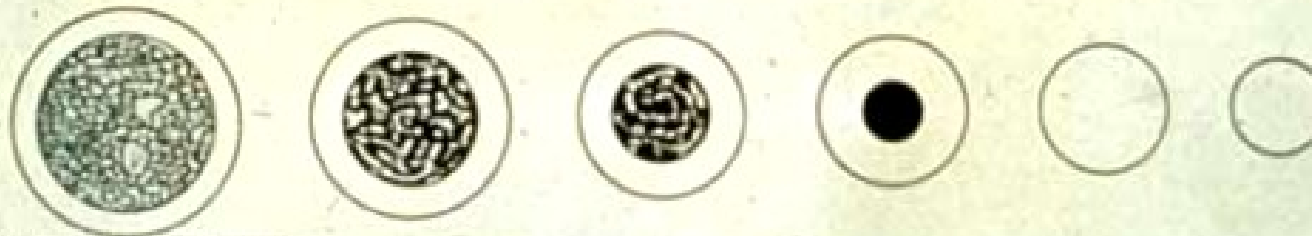
A Cell size and cytoplasm color

zbarvení, obsah
cytoplazmy



B Nuclear size and color

velikost, tvar
jádra



C Nuclear chromatin structure

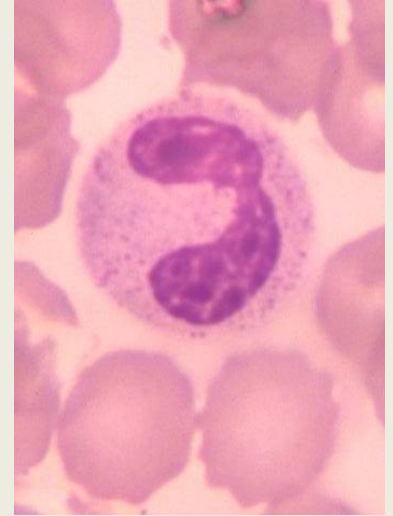
struktura chromatinu,
jadérka



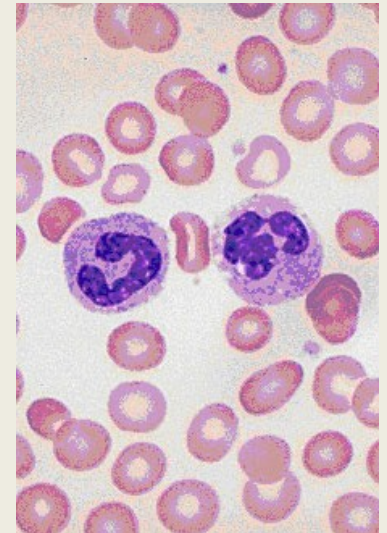
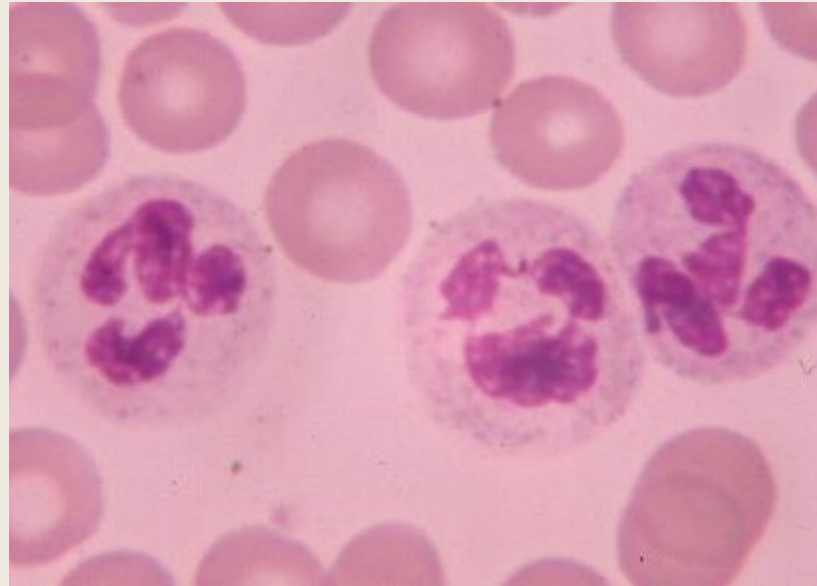
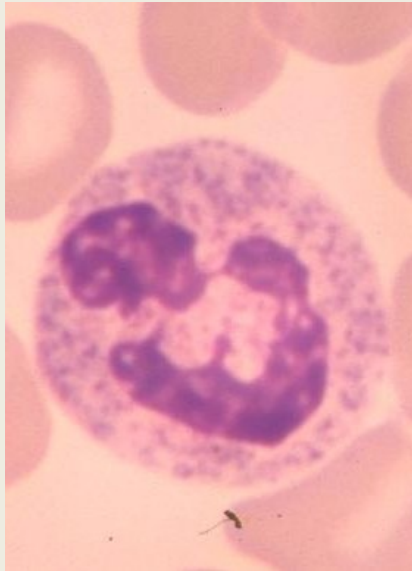
D Composite (Left to right): Rubriblast, Pro-rubricyte, Rubricyte, Metarubricyte, Diffusely basophilic erythrocyte, Erythrocyte

komplexní hodnocení

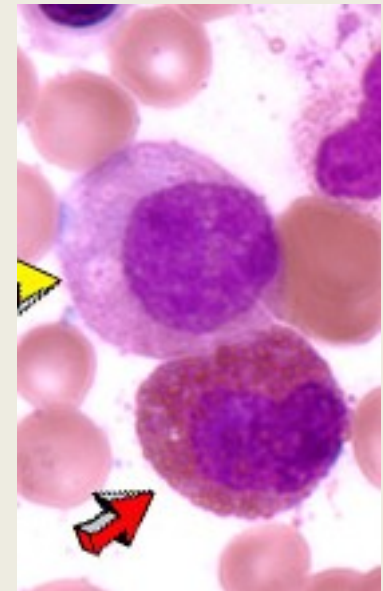
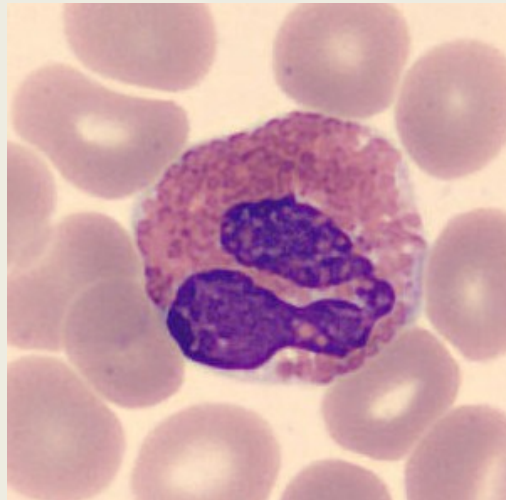
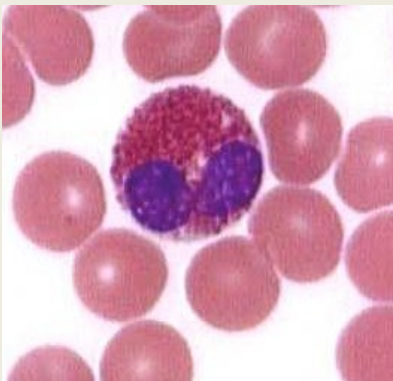
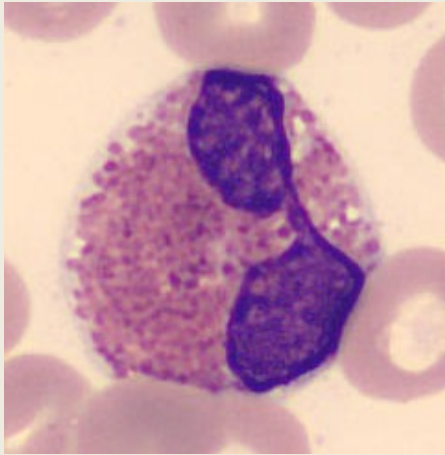
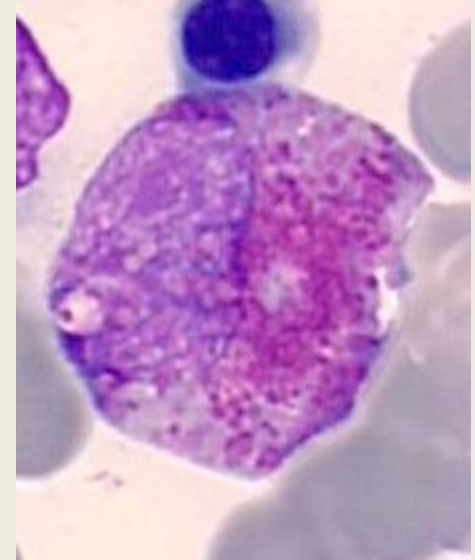
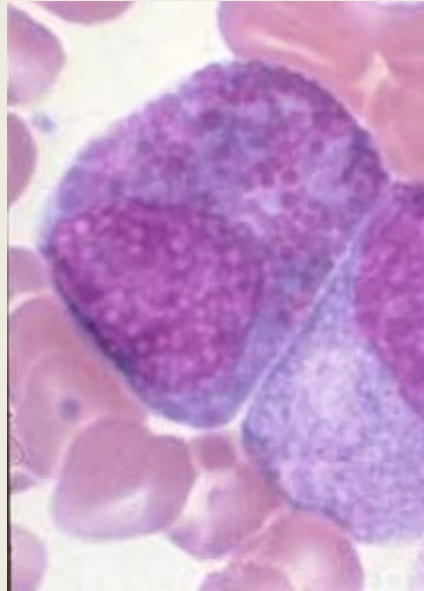
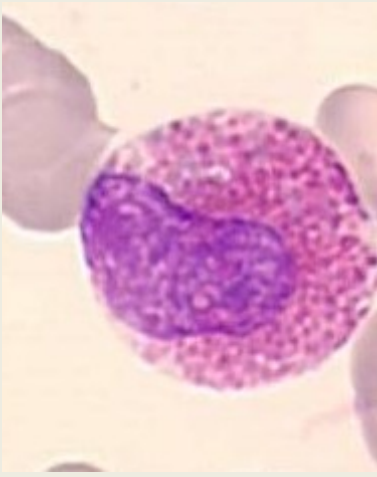
Neutrofilní tyč (rozdíl mezi nejširším a nejužším tvarem jádra je $\frac{1}{3}$ až $\frac{1}{2}$)



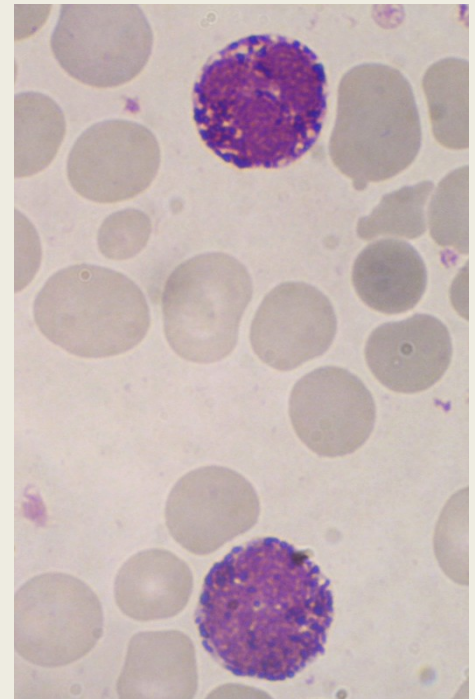
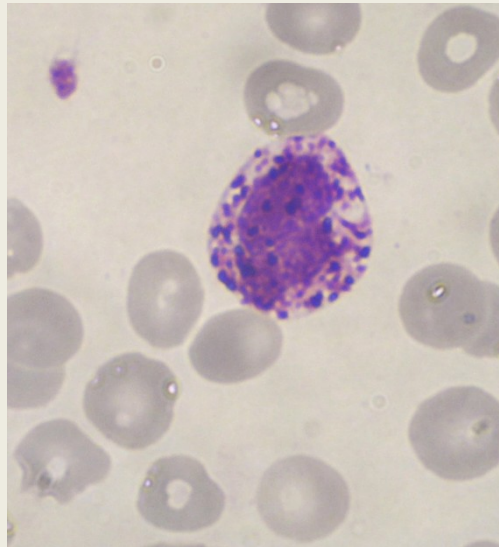
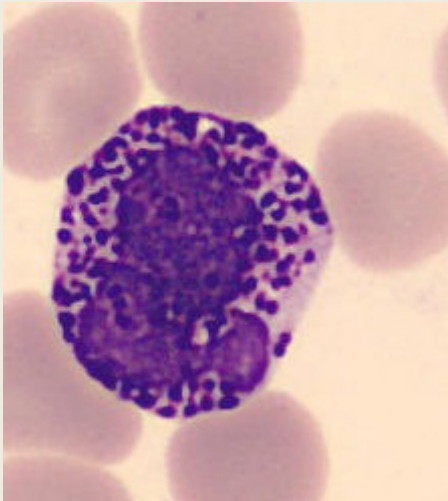
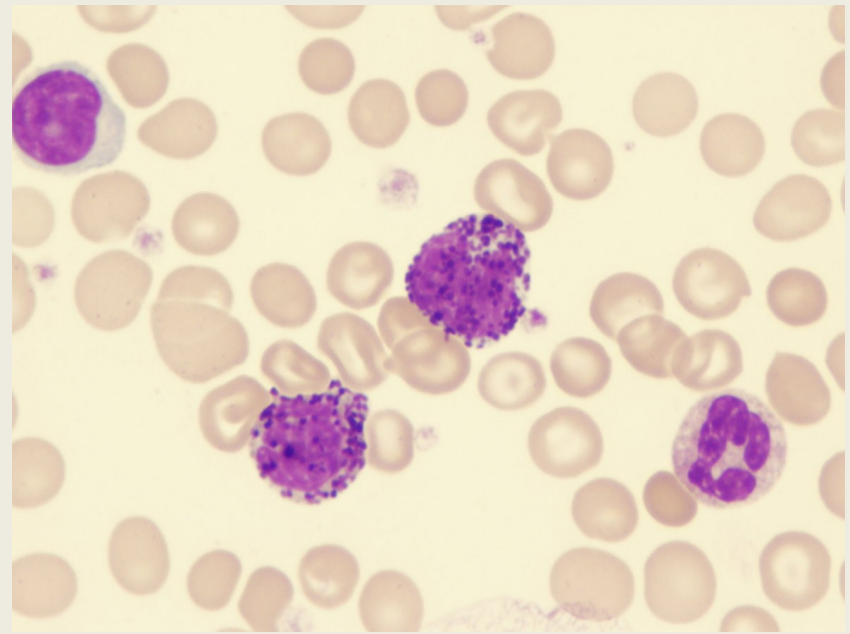
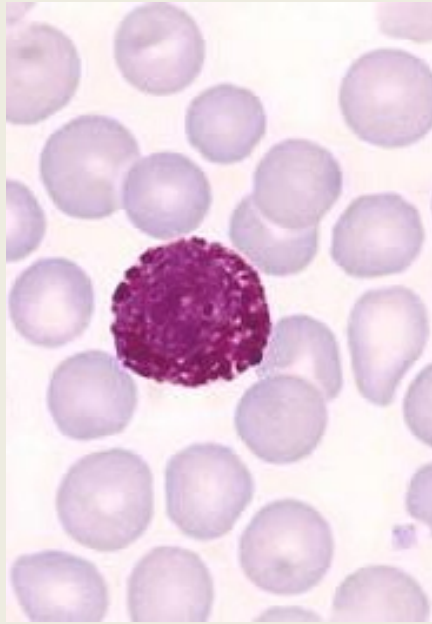
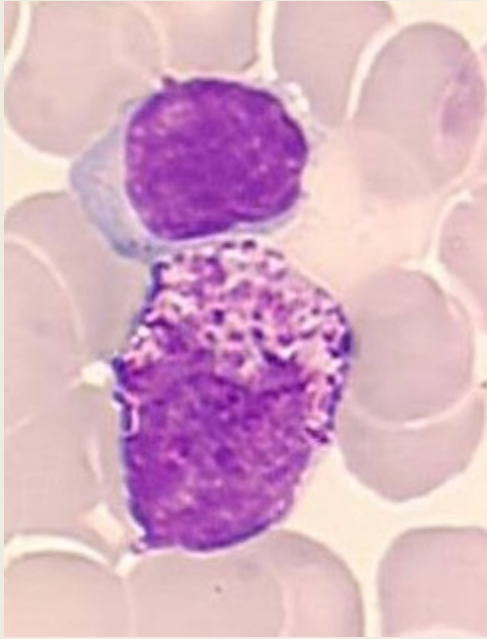
Neutrofilní segment



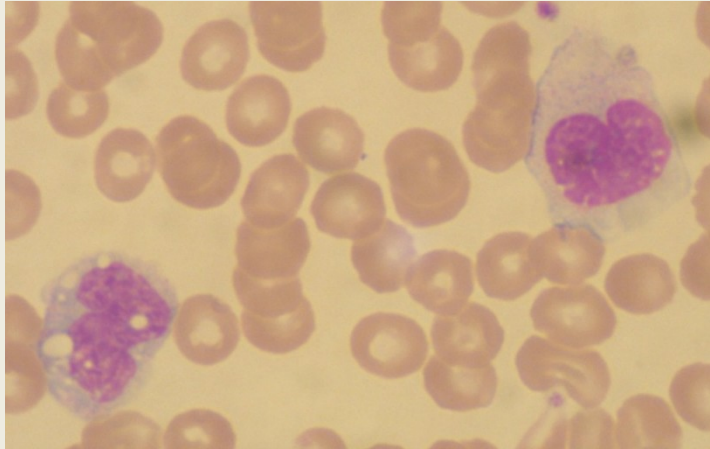
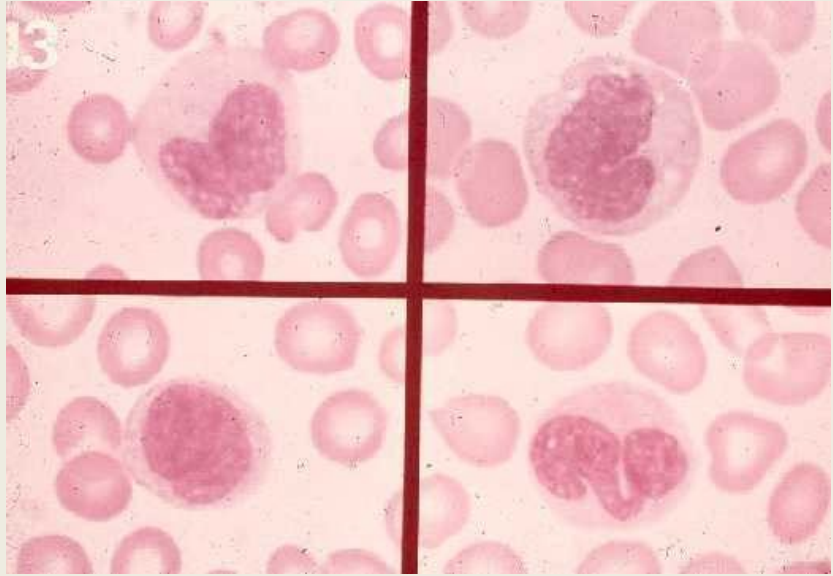
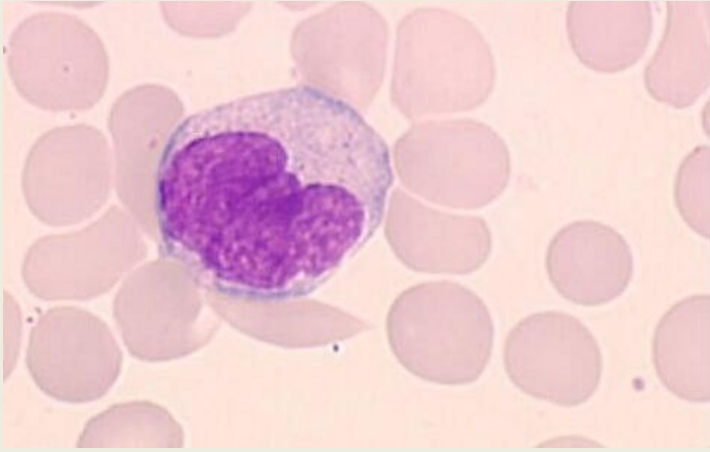
Eozinofily



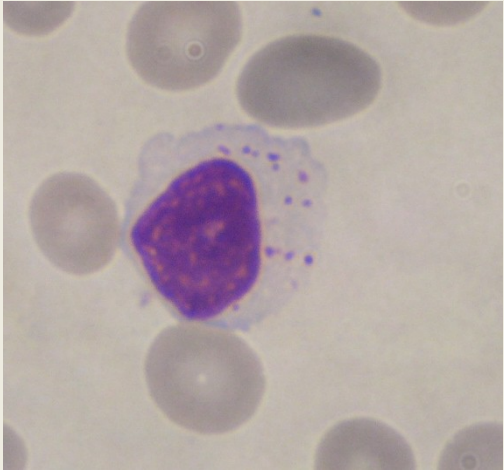
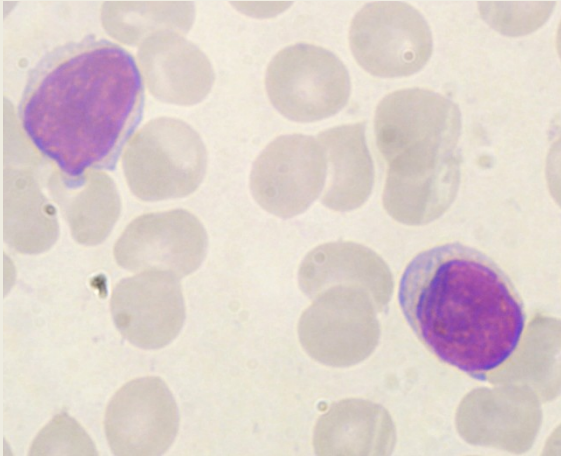
Bazofily

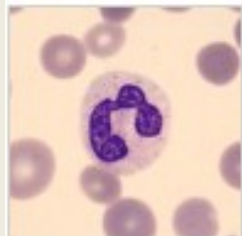


Monocyty

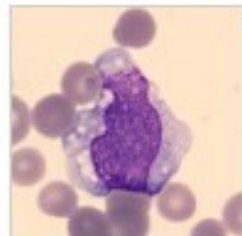


Lymfocyty

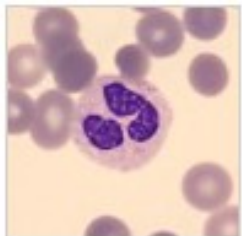




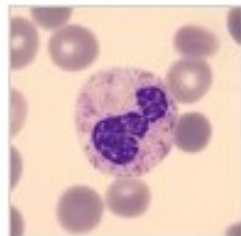
A00776V5AB_031



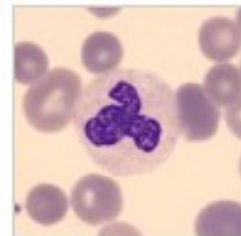
A00776V5AB_032



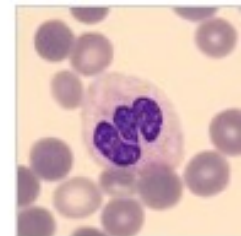
A00776V5AB_033



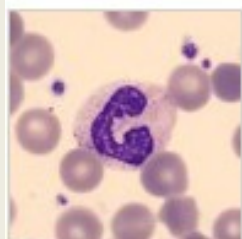
A00776V5AB_034



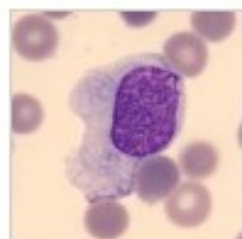
A00776V5AB_035



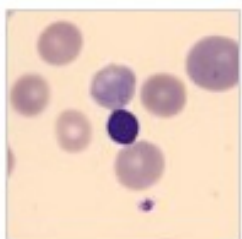
A00776V5AB_036



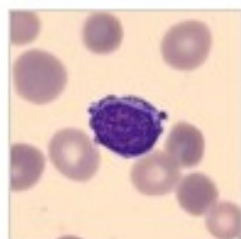
A00776V5AB_037



A00776V5AB_038



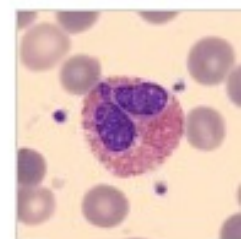
A00776V5AB_039



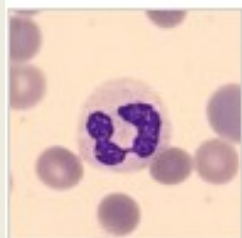
A00776V5AB_040



A00776V5AB_041



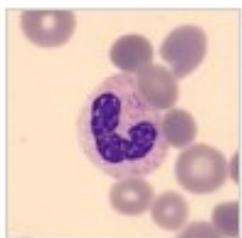
A00776V5AB_042



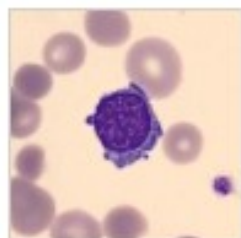
A00776V5AB_043



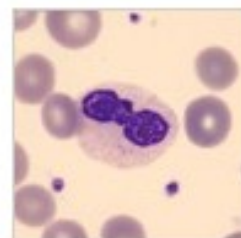
A00776V5AB_044



A00776V5AB_045



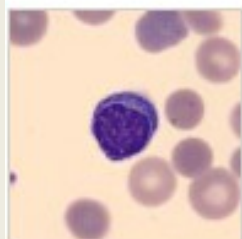
A00776V5AB_046



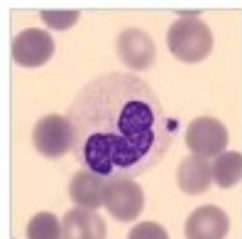
A00776V5AB_047



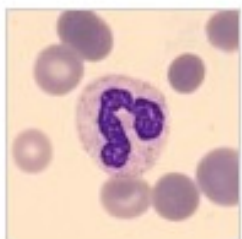
A00776V5AB_048



A00776V5AB_049



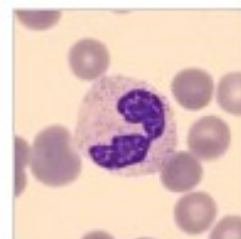
A00776V5AB_050



A00776V5AB_051



A00776V5AB_052



A00776V5AB_053



A00776V5AB_054