

**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

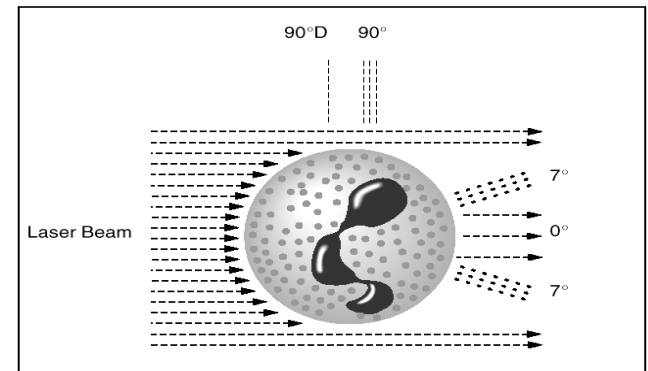
Hematologické analyzátory

- 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 měřící 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

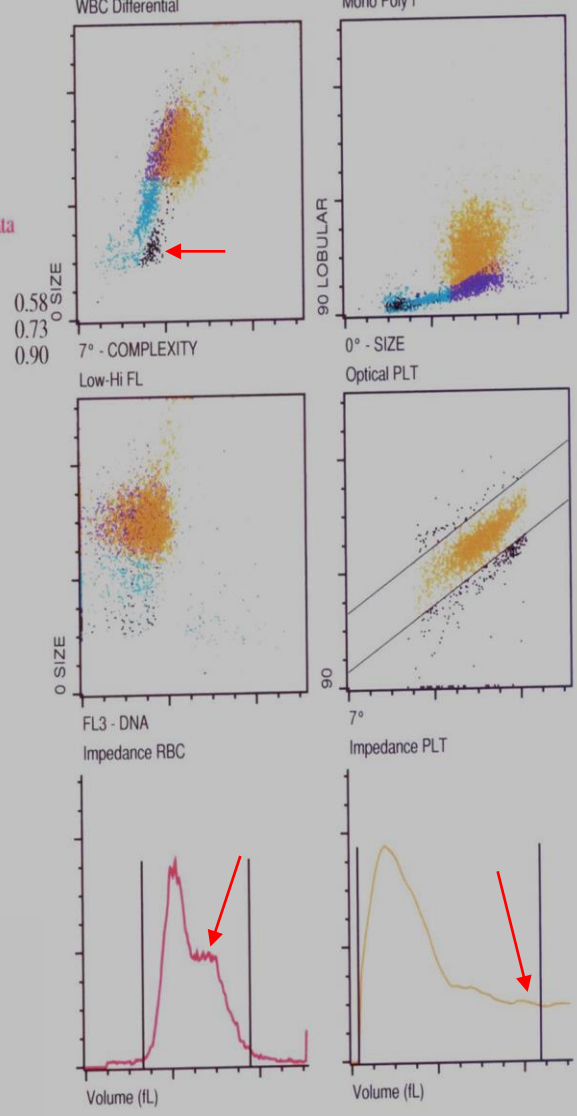
Sex: F
 Doctor: 0568/30/04/2010
 User Defined A:
 User Defined B:
 User Defined C:
 User Defined D:

X-B In	WBC In	RBC In	PLT In	RETC In	
WBC	16.51*	10e9/L	WVF	.982	
SEG	8.53*		%S	51.7*	
BAND	.299*		%BD	1.81*	
IG	1.47*		%IG	8.94*	
BLST	1.59		%BL	9.67	
MONe	2.79		%Me	16.9	
EOS	.018*		%E	.112*	
BASO	0.00		%B	0.00	
LYMe	1.80		%Le	10.9	FP?
VARL	0.00		%VL	0.00	

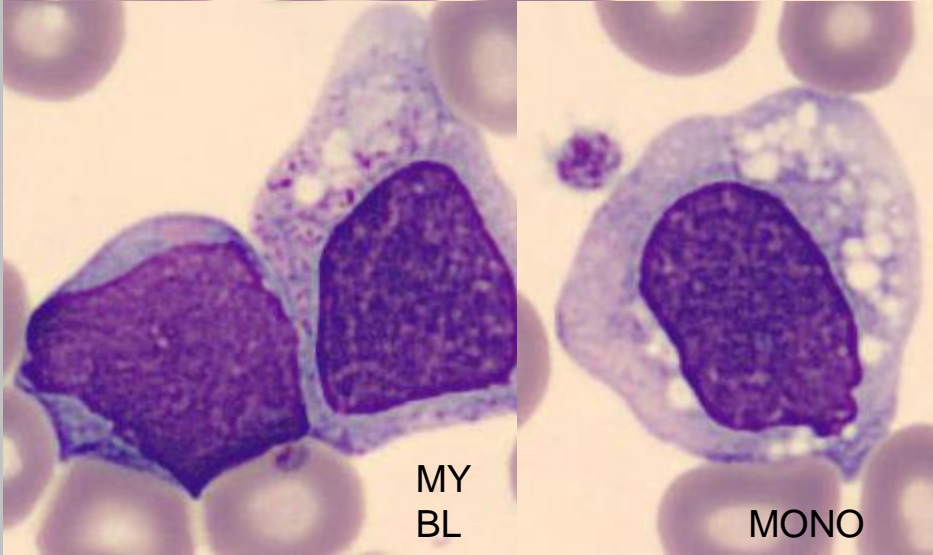
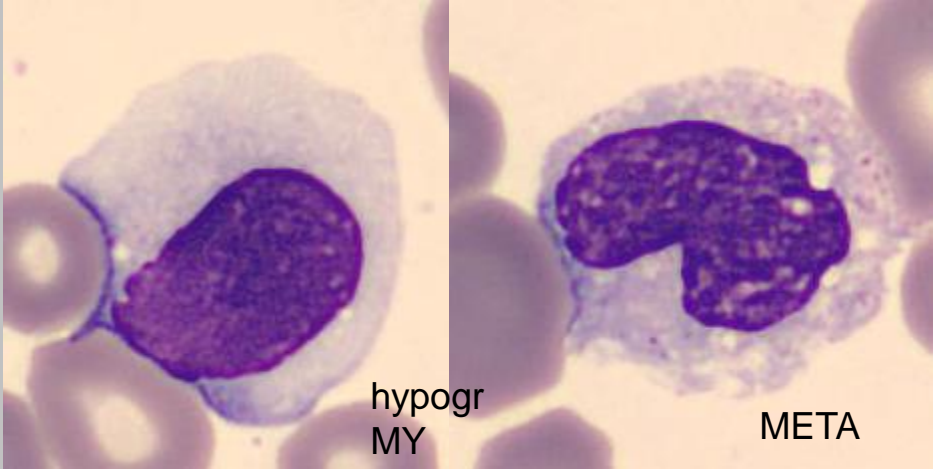
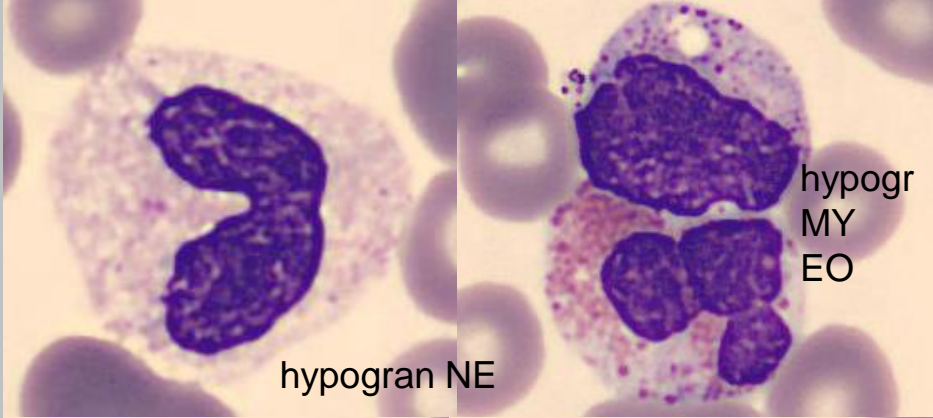
*InvalidData
 BAND
 IG
 BLAST

RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	RETC	IRF	NRBC	PLTc	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
RBCc									NRW	82.1*	---	---	---
2.73									0.00s				

ASYM



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	
Diagnóza.....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

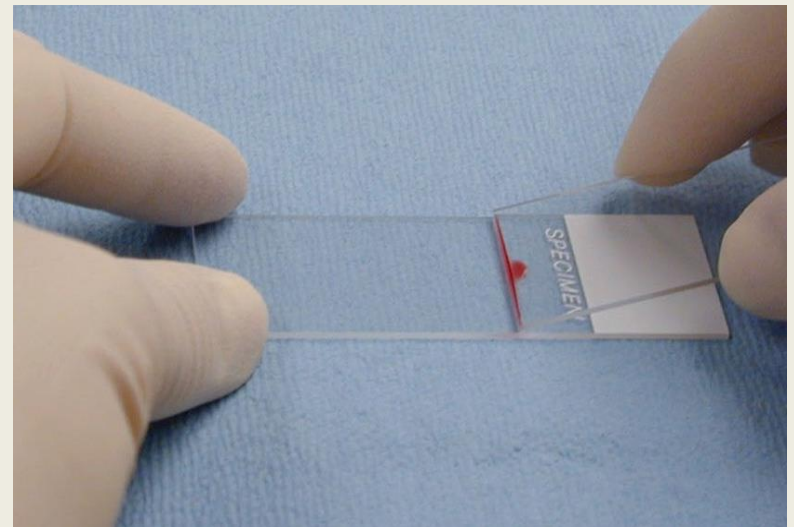
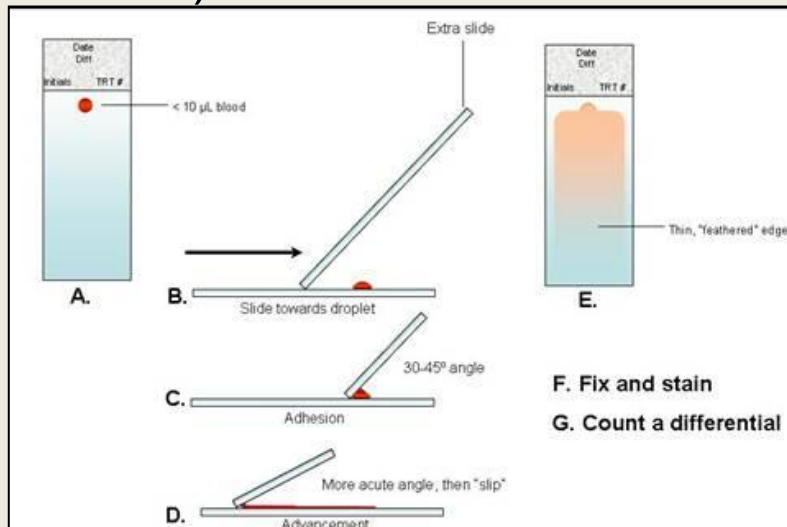
21/02/2014	10/01/2014	27/11/2013	27/11/2013	27/11/2013	25/10/2013
WBC = 9.18	WBC = 10.30		WBC = 11.30		WBC = 9.33
RBC = 3.85	RBC = 3.52		RBC = 3.68		RBC = 3.36
HGB = 115.00	HGB = 110.00		HGB = 108.00		HGB = 102.00
HCT = 0.33	HCT = 0.30		HCT = 0.31		HCT = 0.29
MCV = 86.20	MCV = 86.10		MCV = 84.50		MCV = 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)

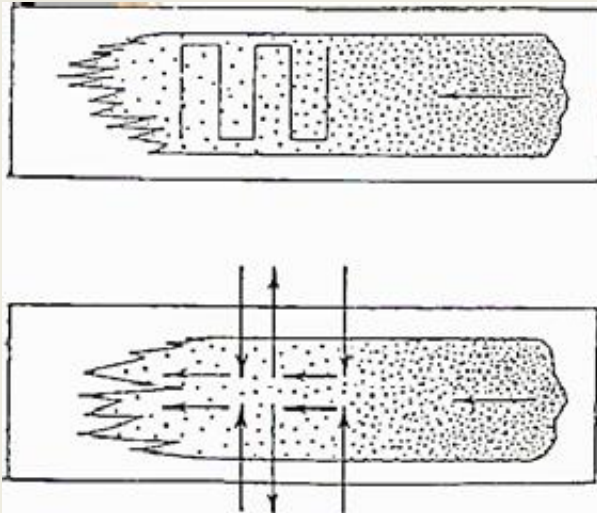


Barvení

- 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

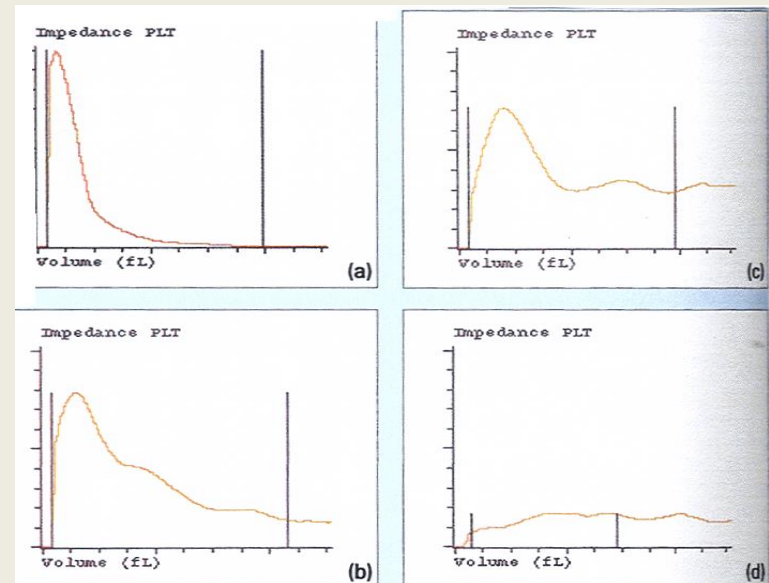
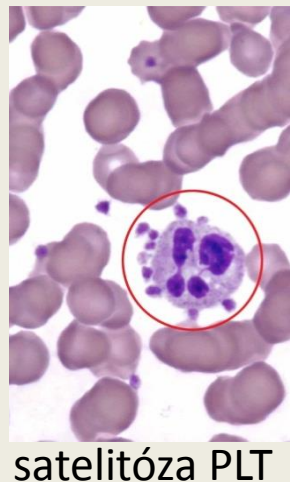
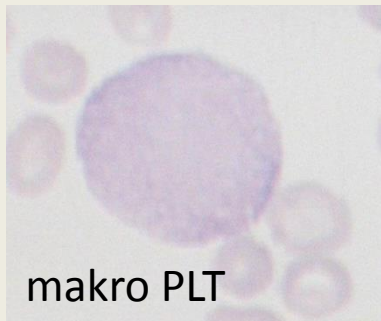


- Kationtové (zásadité) barvy, jako je např. azur B, se váží na aniontovou složku a dávají modrošedá zbarvení nukleových kyselin (DNA nebo RNA), nukleoproteinů, granulí bazofilů a slabě barví granula neutrofilů.

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

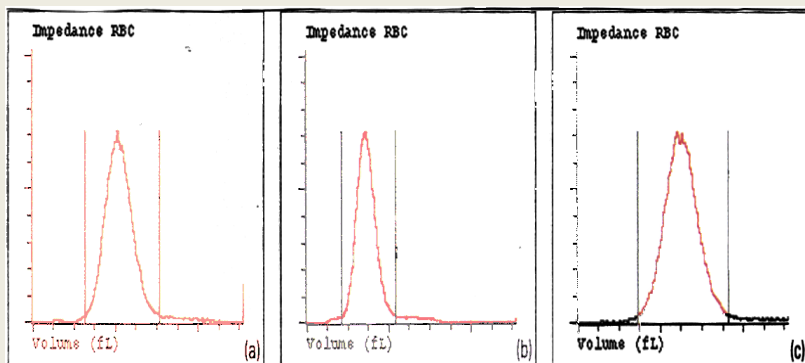
Hodnocení PLT

- 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



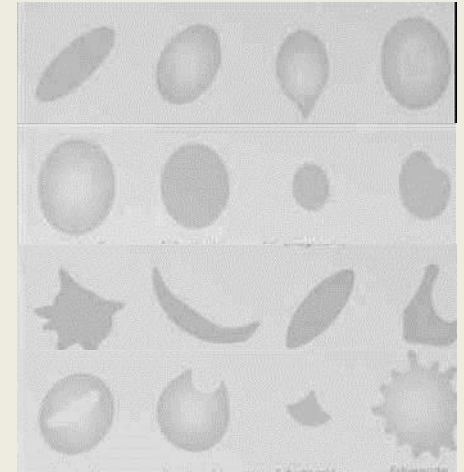
Hodnocení RBC

- 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)



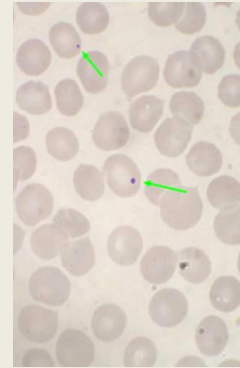
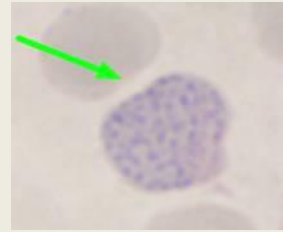
Poikilocyty – tvarové odchylky erytrocytů

- 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)

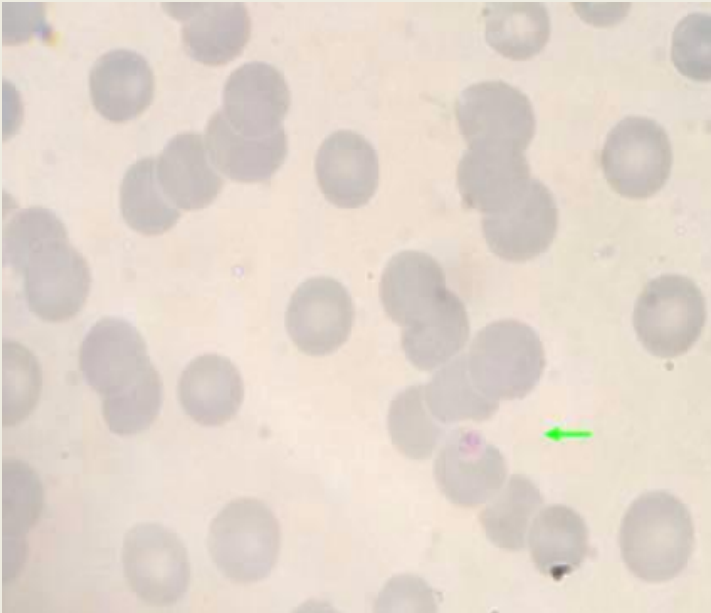


Penízkovatění (rouleax)

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

Příčina

zvýšené množství
plazmatických proteinů
navázaných na povrchu
erythrocytů

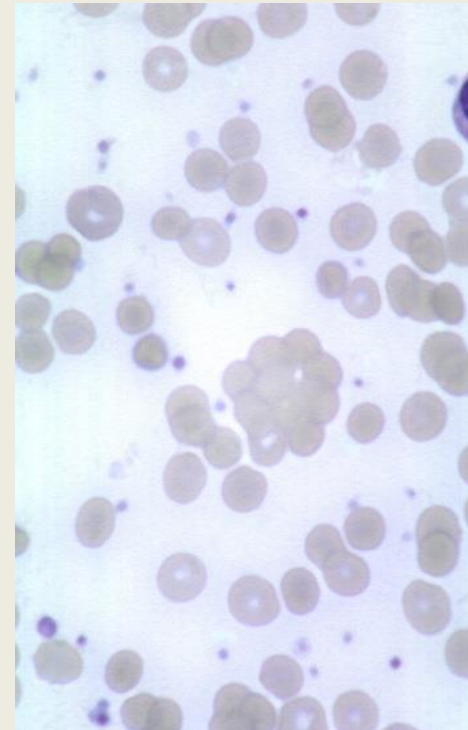


Aglutinace

seskupené erythrocyty do
větších, či menších shluků

Příčina

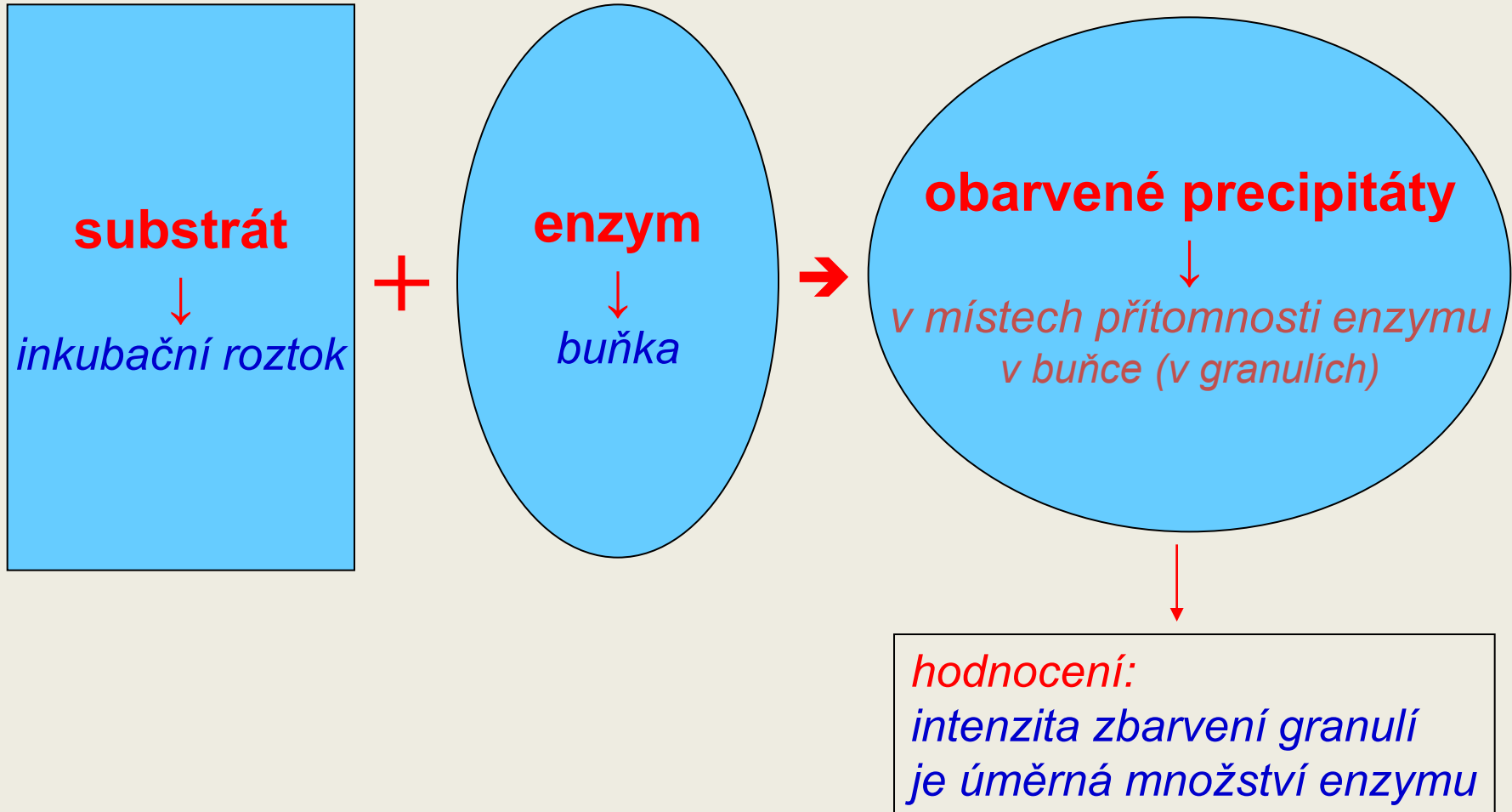
přítomnost protilátek
(nejčastěji chladové)



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:

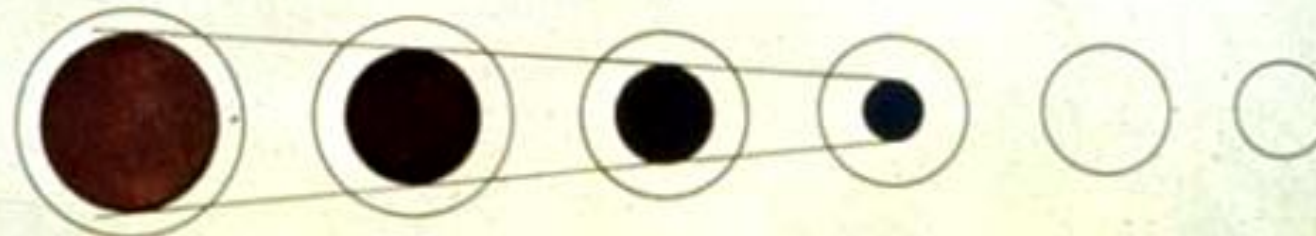
- ostatním cytochemickým vyšetřením
- morfologickým hodnocením a rozpočtem kostní dřeně
- stádiem vyzrávání buněk

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

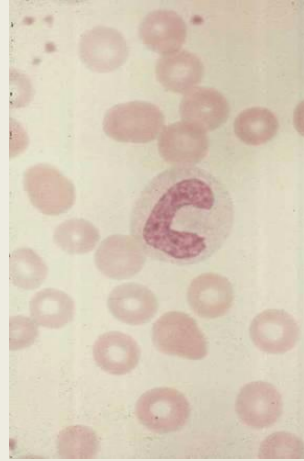
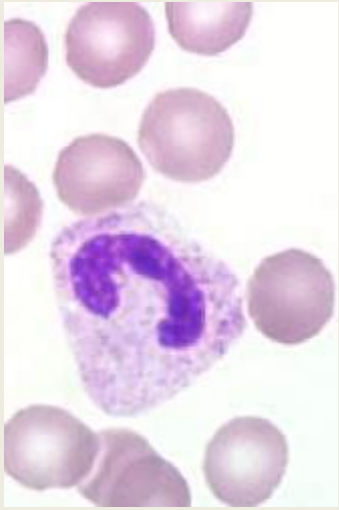
struktura chromatinu,
jadérka



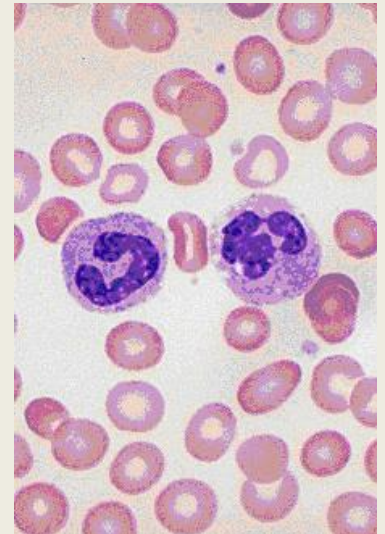
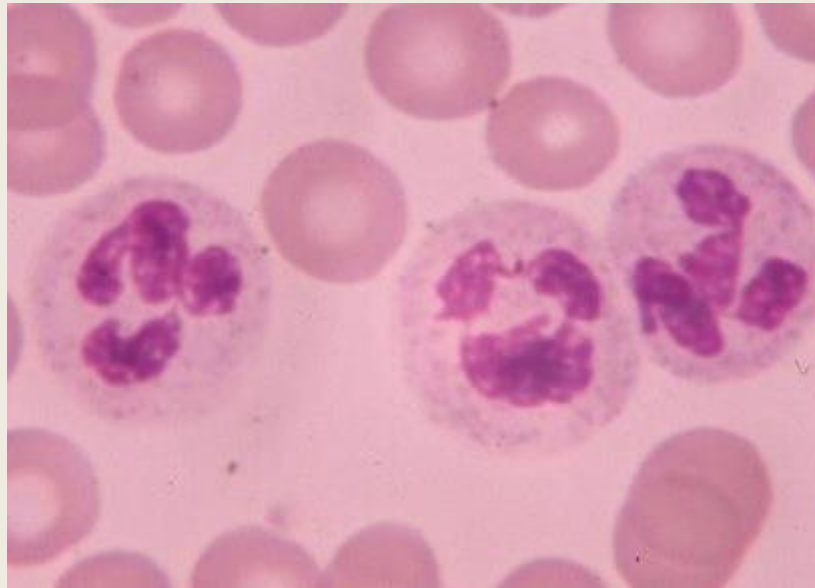
D Composite (Left to right: Rubriblast, Pro-rubricyte, Rubricyte, Metarubricyte, Diffusely basophilic erythrocyte, Erythrocyte)

komplexní hodnocení

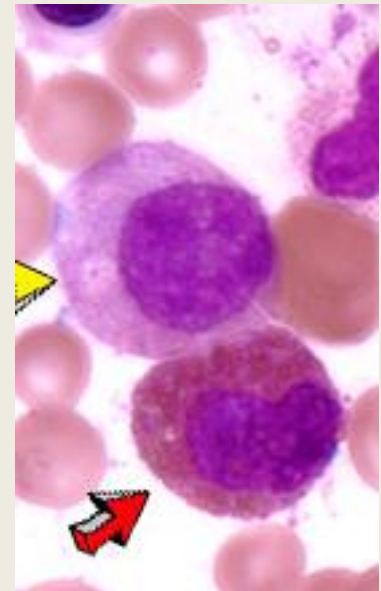
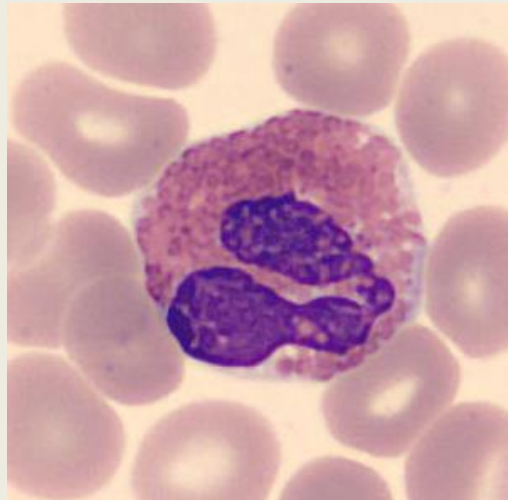
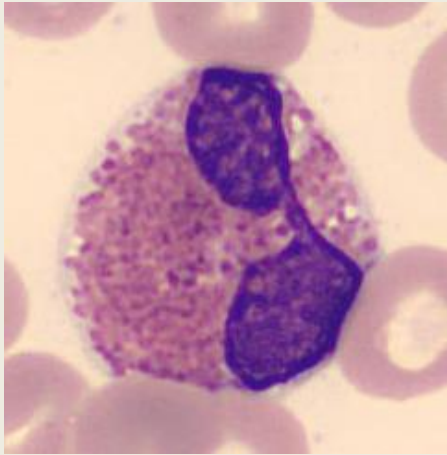
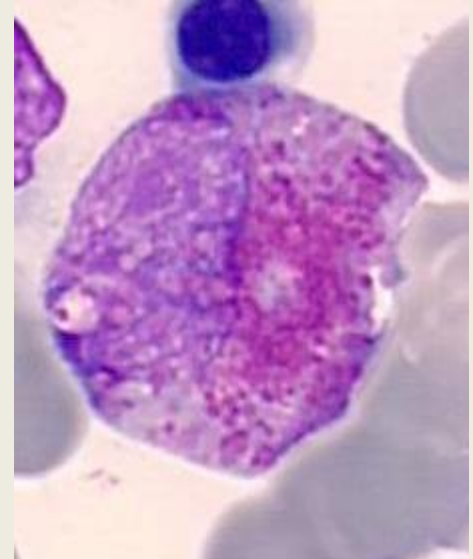
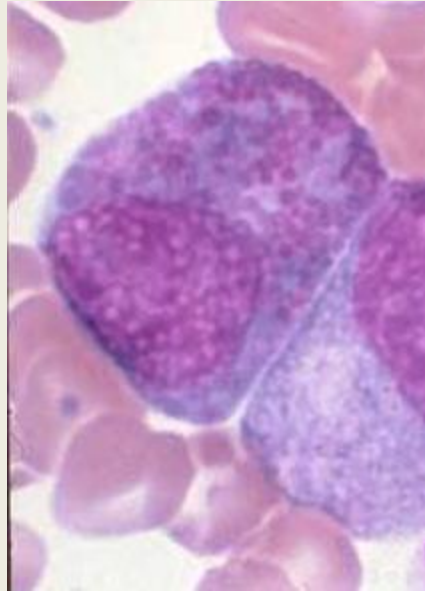
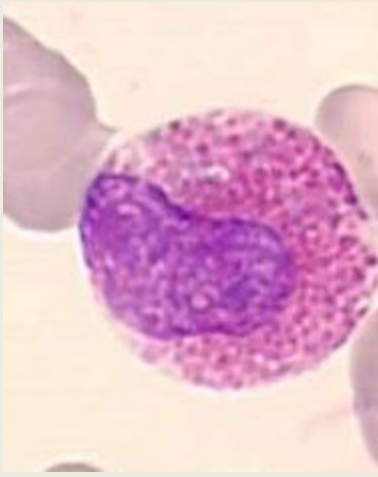
Neutrofilní tyč (rozdíl mezi nejširším a nejužším tvarem jádra je $\frac{1}{3}$ až $\frac{1}{2}$)



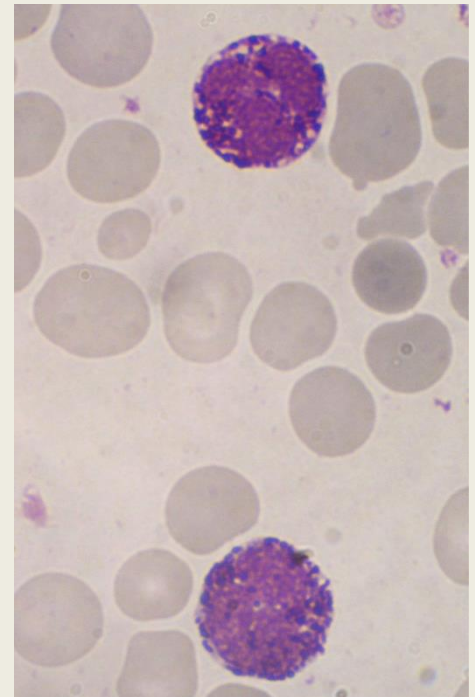
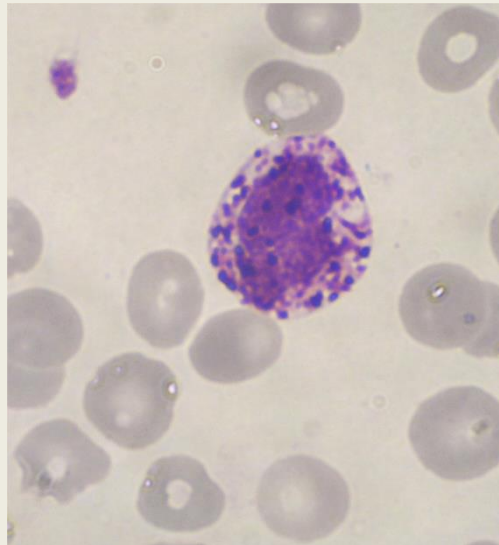
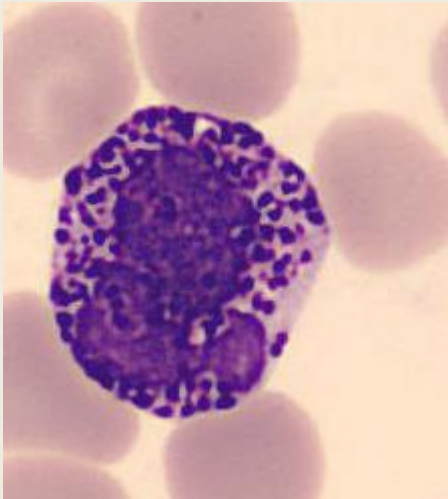
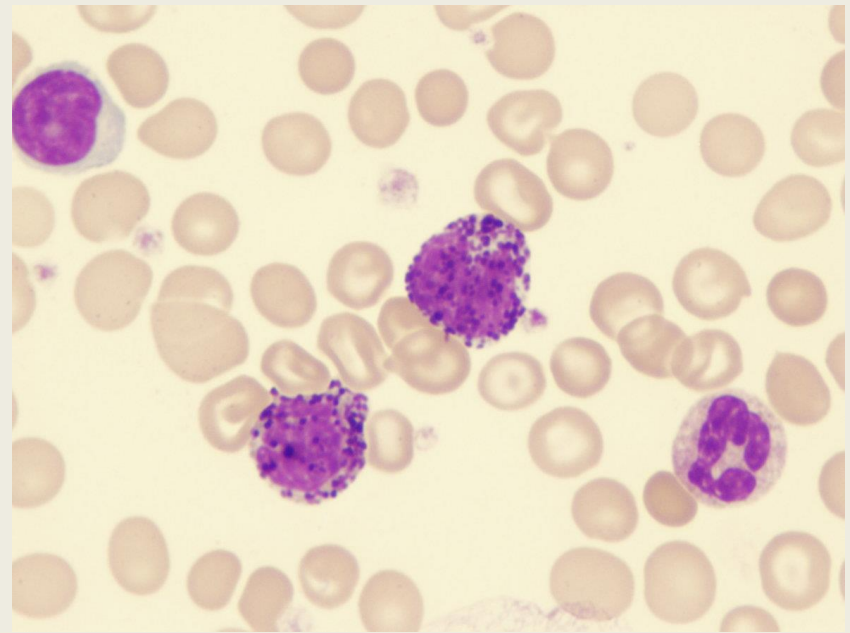
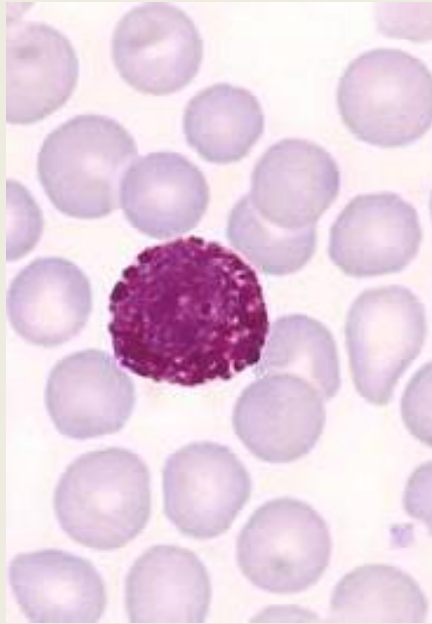
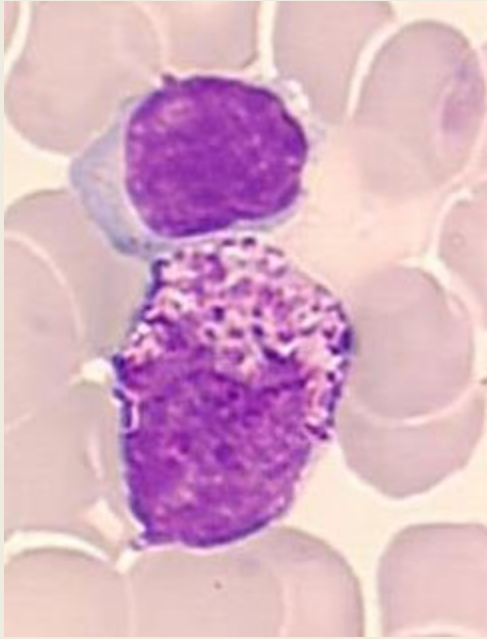
Neutrofilní segment



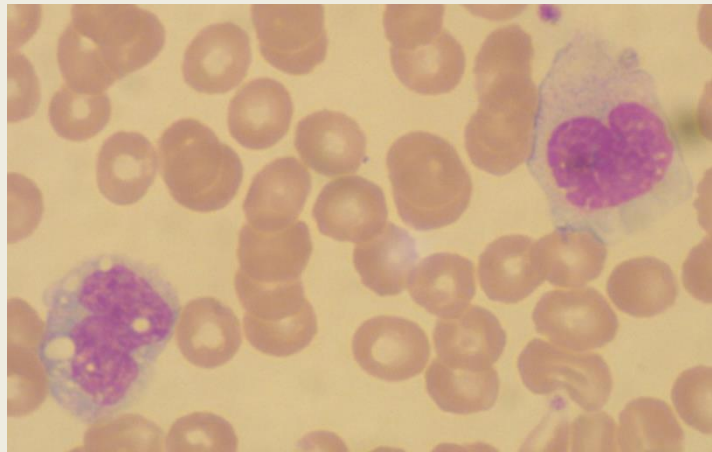
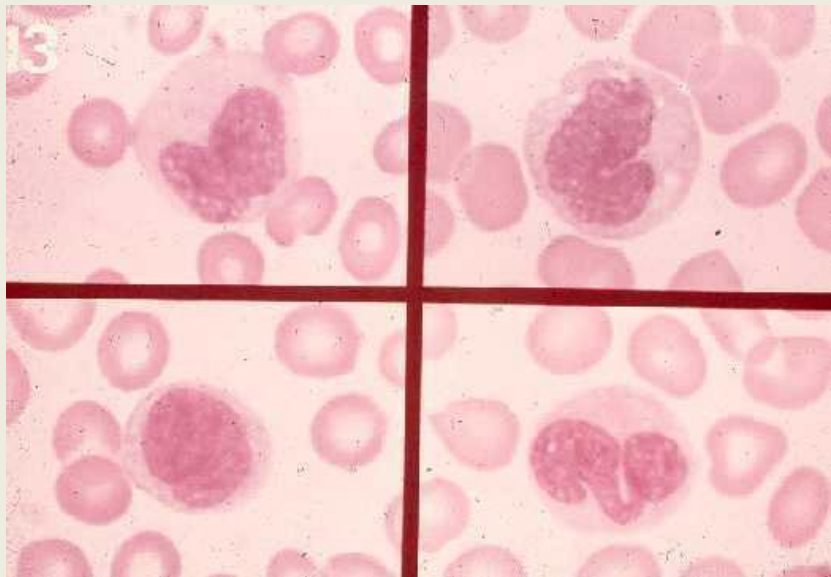
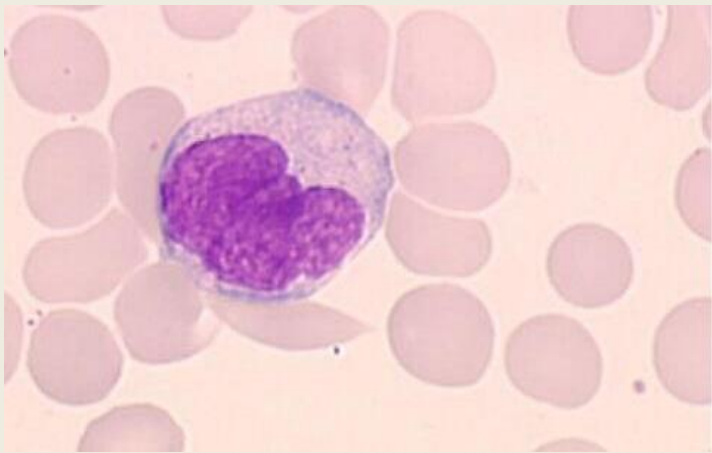
Eozinofily



Bazofily



Monocyty



Lymfocyty

