

Počítání krevních buněk

Principy hematologických analyzátorů

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 prošlých buněčných elementů

Principy měření

- absorpční spektrofotometrie
- impedanční analýza
- optická analýza

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

Používaná diagnostika

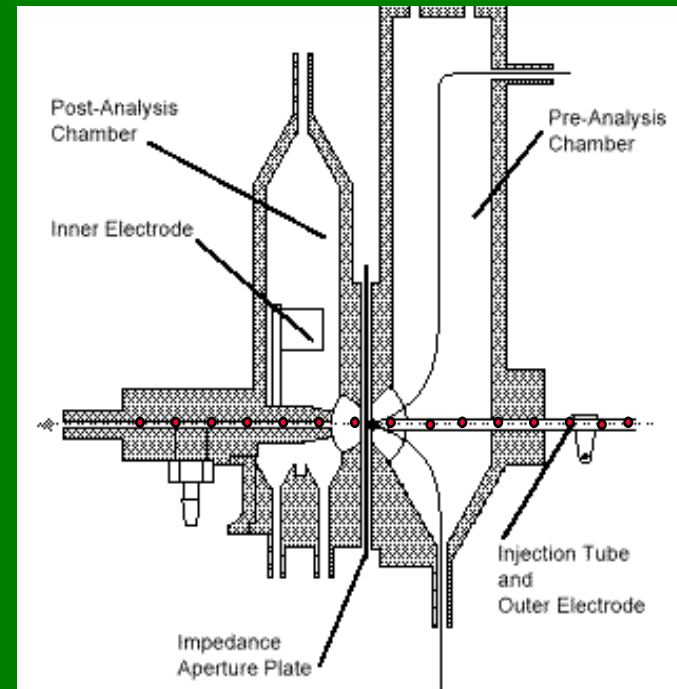
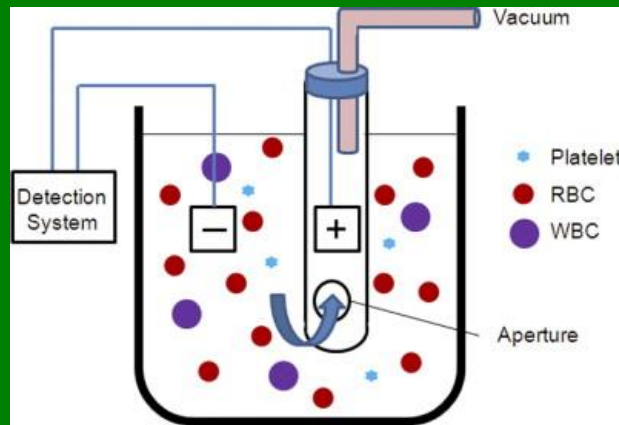
- analýza nesrážlivé periferní krve
 - odběr krve do solí EDTA (*K, Na*)
- ředící roztoky (*isotonické roztoky*)
 - impedanční analýza
vodivý roztok + nevodivá buňka
 - optická analýza
opticky inaktivní roztok + opticky aktivní buňka
- lyzační roztoky
hemolýza erytrocytů a dle typu analyzátoru může být i destrukce jiných krevních elementů
- barvicí roztoky
barvení obsahu buňky (granula/enzymy, DNA, RNA)
- čistící roztoky
čištění měřicího systému

Absorbční spektrofotometrie

- Metoda slouží ke stanovování množství hemoglobinu ve vzorku (*cca. $\lambda = 540 \text{ nm}$*)
(*bezkyanidové metody*)

Impedanční analýza - I

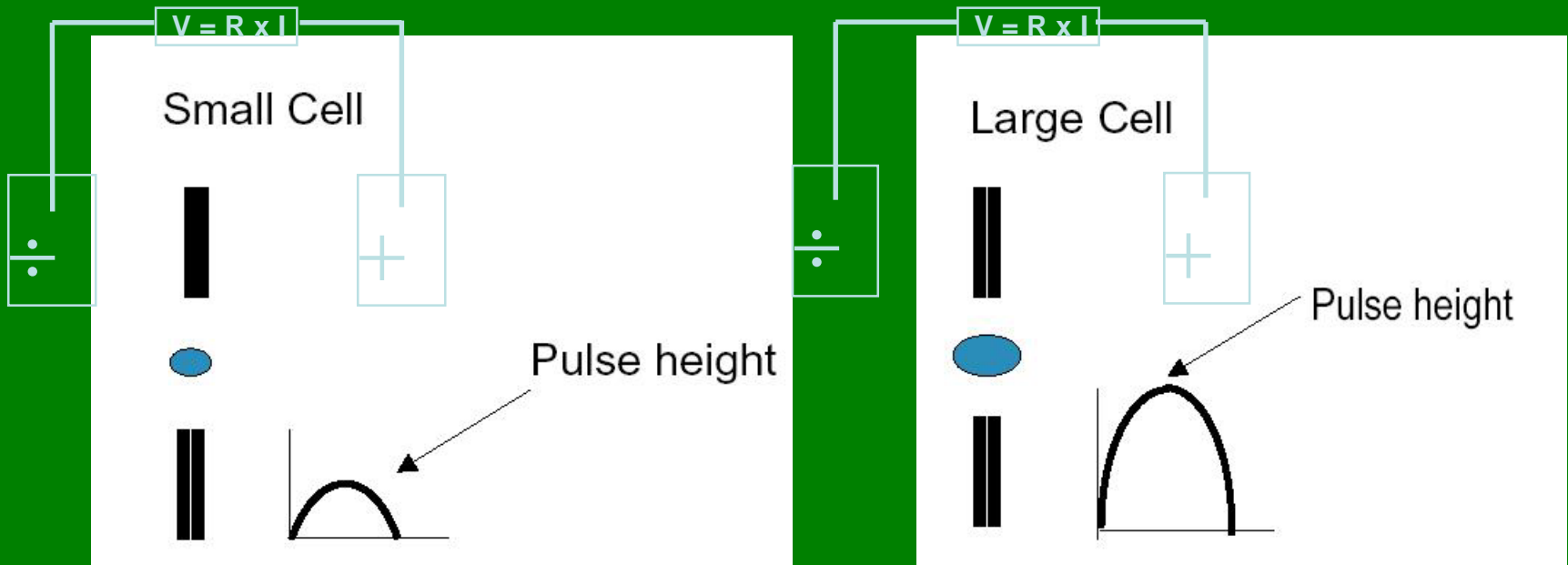
- mezi elektrodami je v apertuře standardní vodivost (vodivost zajišťuje diluent)
- buňky jsou v jedné kyvetě suspendovány diluentem (s katodou) → pomocí vakua jsou nasávány malým otvorem (aperturou) do druhé kyvetky s diluentem (s anodou)
- obě kyvety jsou přes aperturu propojeny vodivým diluentem
- při průchodu buňky aperturou se vodivost naruší/změní: vzniká impedanční impulz
- četnost impulzu → počet buněk
velikost impulzu → velikost buňky



Impedance technology

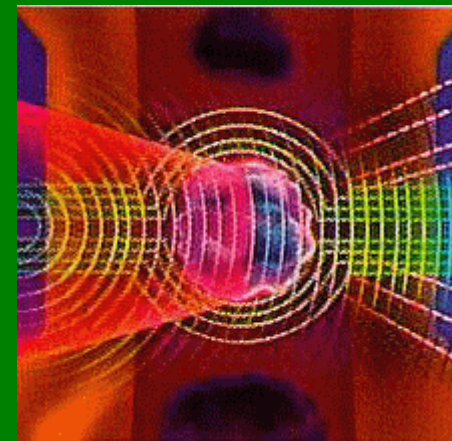
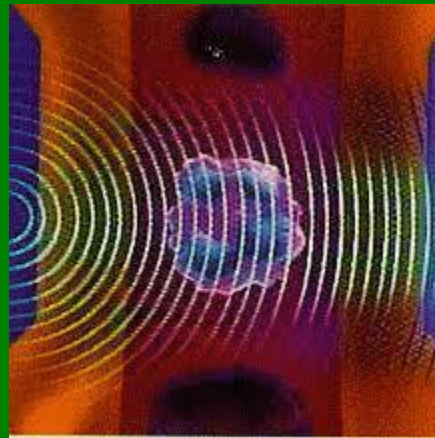
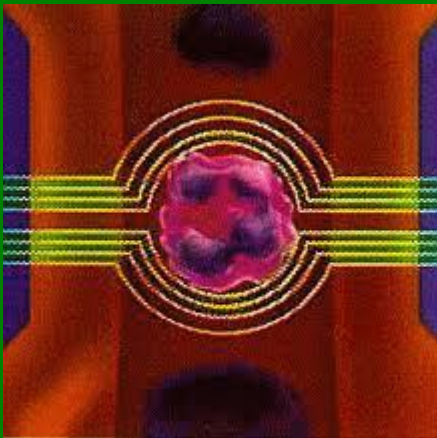
Ohm's Law: $V = R \times I$ (constant)

Voltage = Resistance (impedance) x Current



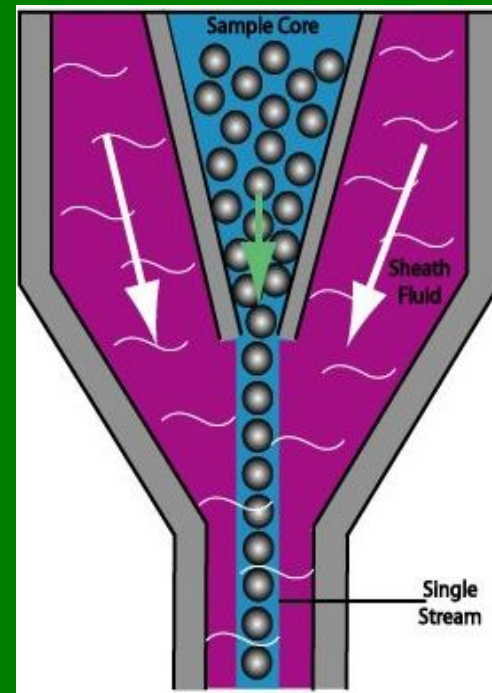
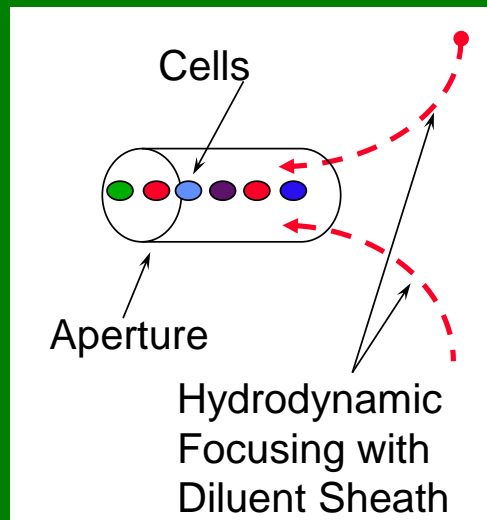
Impedanční analýza - II

- měření může být doplněno vysokofrekvenční analýzou:
 - na stejnosměrné elektrické pole
 - je superponováno vysokofrekvenční střídavé elektrické pole
 - to pronikne cytoplazmou
 - pak se změří vysokofrekvenční vodivost buňky
 - ta odpovídá její fyzikálněchemické struktuře
(kvalitativní analýza buňky)



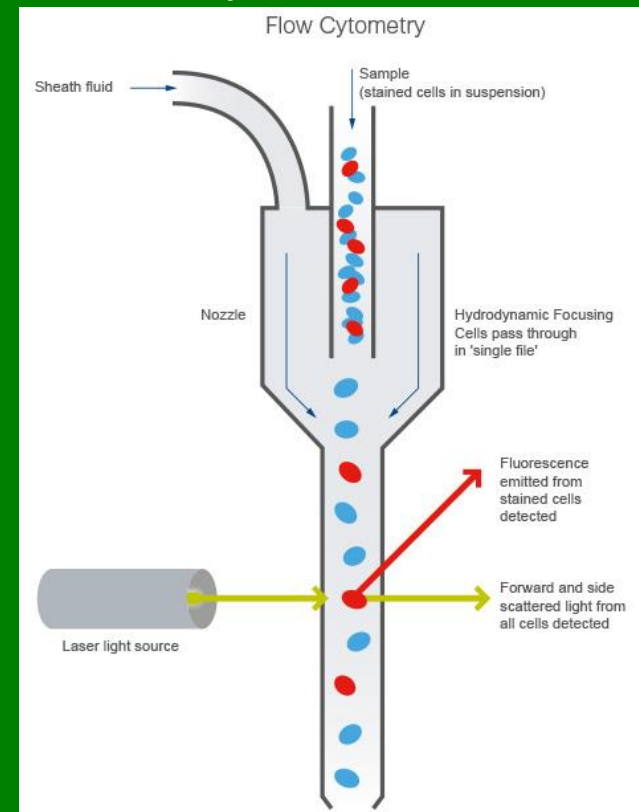
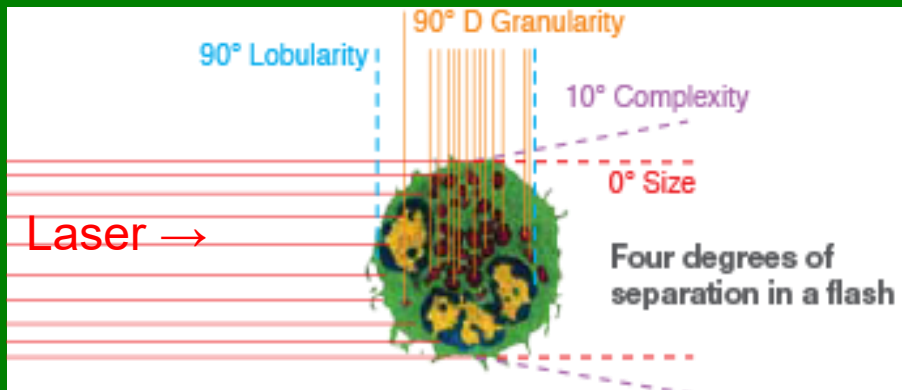
Hydrodynamická fokusace

- využívá unášení jednotlivých buněk proudem dilučního roztoku



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
 - odražené
 - depolarizované
 - fluorescence



Detekce optické analýzy

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.
 - Roztok se substrátem *(např. 4-chlor-1-naftol)* barví v leukocytech enzym peroxidázu.
 - *Reakcí enzymu se substrátem vznikají v buňce barevné intracelulární sraženiny, které ovlivňují úbytek světla a rozptyl paprsku.*
- 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).

