

**Krevní buňky a principy jejich  
vyšetřování  
na hematologických  
analyzátorech a mikroskopicky**

Bourková L., OKH FN Brno

# Příklady webových stránek

- **hematologický atlas**

- <http://www.hematocytologie.eu/>
- <http://www.hematologyatlas.com/>
- <http://www.grsmu.by/files/file/university/cafedry/klinicheskaya-immynologiya/files/fiu/atlas.pdf>
- <http://www.cellavision.com/en/cellavision-cellatlas>

- **RBC**

- [https://www.google.cz/search?hl=cs&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1280&bih=908&q=erythroblasts&oq=erythroblast&gs\\_l=img.1.3.0i19110.6606.9583.0.12410.8.8.0.0.0.0.68.208.8.8.0....0...1ac.1.64.img..0.8.201.NRloSelUgdk](https://www.google.cz/search?hl=cs&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1280&bih=908&q=erythroblasts&oq=erythroblast&gs_l=img.1.3.0i19110.6606.9583.0.12410.8.8.0.0.0.0.68.208.8.8.0....0...1ac.1.64.img..0.8.201.NRloSelUgdk)
- [http://www.sekk.cz/infoservis/2006\\_Morfologie\\_erytrocytu.pdf](http://www.sekk.cz/infoservis/2006_Morfologie_erytrocytu.pdf)

- **WBC**

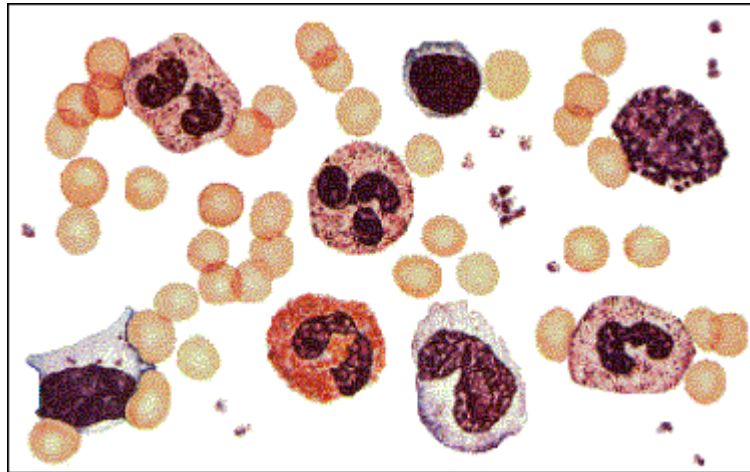
[https://www.google.cz/search?hl=cs&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1280&bih=908&q=leukocytes&oq=leukocyte&gs\\_l=img.1.2.0i3j0i30i7.1937.12377.0.15795.7.6.0.1.1.0.244.565.5j0j1.6.0....0...1ac.1.64.img..0.7.577.pvdZx9LICHk](https://www.google.cz/search?hl=cs&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1280&bih=908&q=leukocytes&oq=leukocyte&gs_l=img.1.2.0i3j0i30i7.1937.12377.0.15795.7.6.0.1.1.0.244.565.5j0j1.6.0....0...1ac.1.64.img..0.7.577.pvdZx9LICHk)

- **PLT**

[https://www.google.cz/search?hl=cs&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1280&bih=908&q=platelets&oq=platelets&gs\\_l=img.1.0.0i19110.1770.5225.0.7869.9.7.0.2.2.0.207.325.6j0j1.7.0....0...1ac.1.64.img..0.9.349.CiouVP0aXo0](https://www.google.cz/search?hl=cs&site=img&tbm=isch&source=hp&biw=1280&bih=908&q=platelets&oq=platelets&gs_l=img.1.0.0i19110.1770.5225.0.7869.9.7.0.2.2.0.207.325.6j0j1.7.0....0...1ac.1.64.img..0.9.349.CiouVP0aXo0)

# Vyšetřování krevních buněk v periferní krvi

- nesrážlivá periferní krev
- antikoagulační činidlo: K3EDTA, K2EDTA nebo Na2EDTA
- vyšetření:
  - ✓ hematologické analyzátory
  - ✓ mikroskop



**KOSTNÍ DŘEŇ**

myeloblast

proerytroblast

promyelocyt

časný erytroblast  
(bazofilní normoblast)

monoblast

megakaryoblast

lymfoblast

neutrofilní myelocyt

eozinofilní myelocyt

bazofilní myelocyt

středně zralý erytroblast  
(polychromní normoblast)

promonocyt

promegakaryocyt

prolymfocyt

neutrofilní metamy

eozinofilní metamy

bazofilní metamy

pozdní erytroblast  
(ortochromní/oxyfilní normoblast)

makrofág

megakaryocyt

plazmat. b.

**PERIFERNÍ KREV**

neutrofilní tyč

eozinofilní tyč

bazofilní tyčí

retikulocyt

monocyt

trombocyty

lymfocyt

neutrofilní segment

eozinofilní segment

bazofilní segment

erytrocyt

# Leukocyty

blast

promyelocyt

myelocyt

metamyelocyt

neutofilní tyč

neutofilní segment

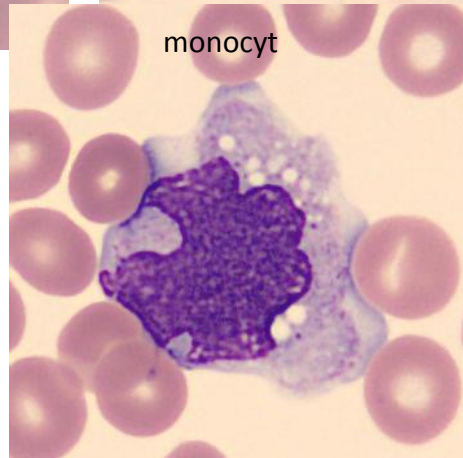
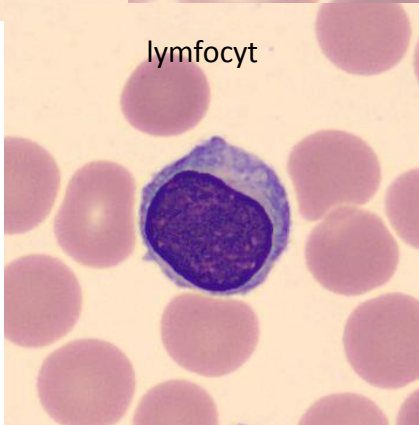
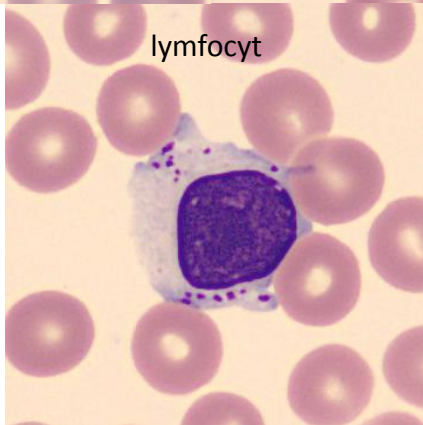
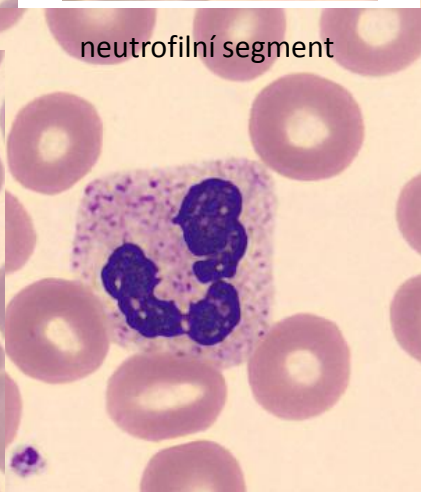
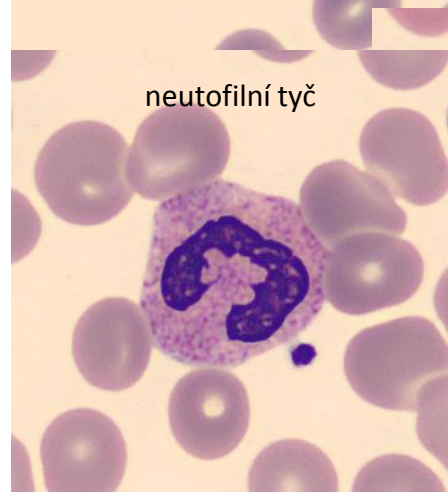
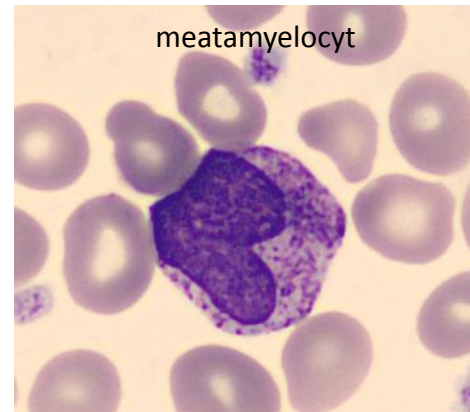
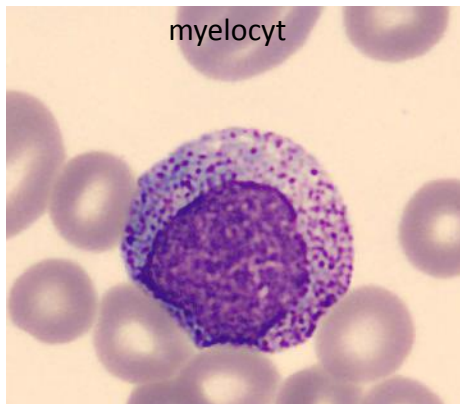
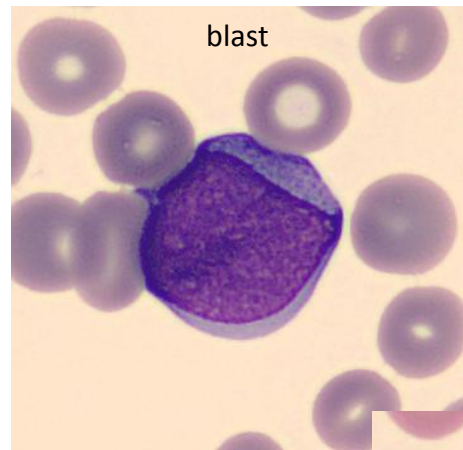
eozinofilní segment

bazofilní segment

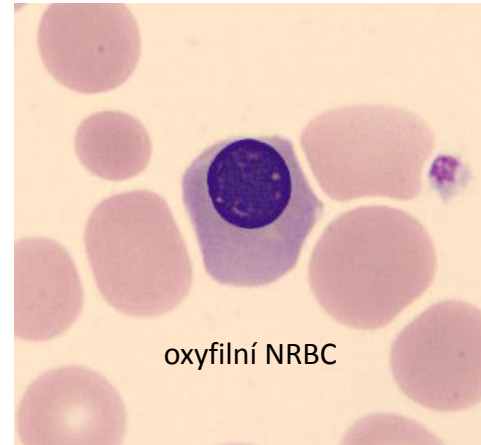
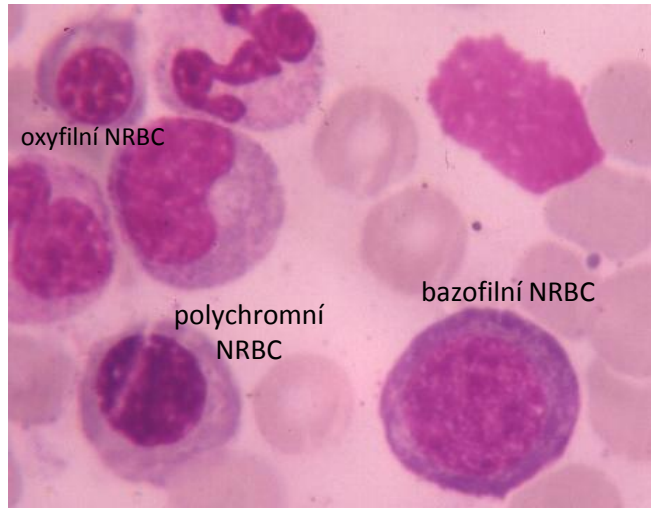
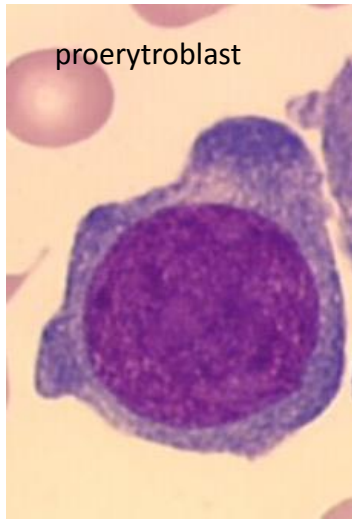
lymfocyt

lymfocyt

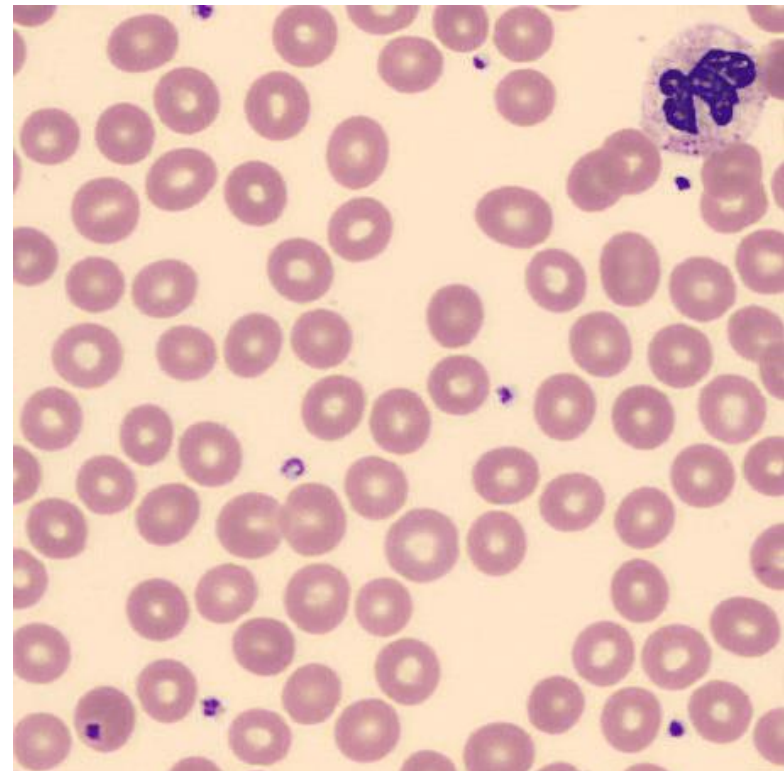
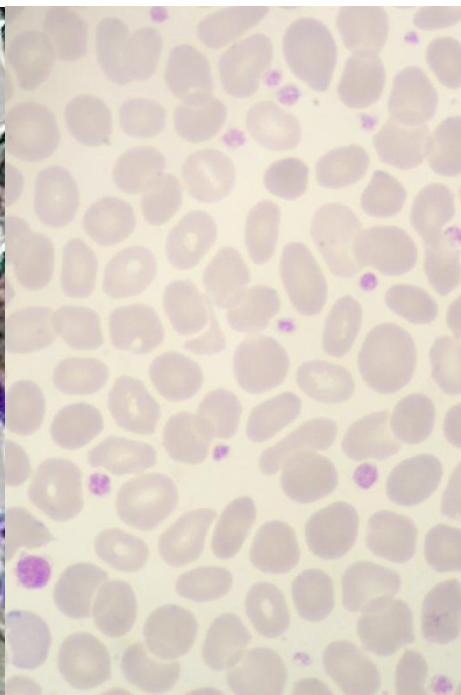
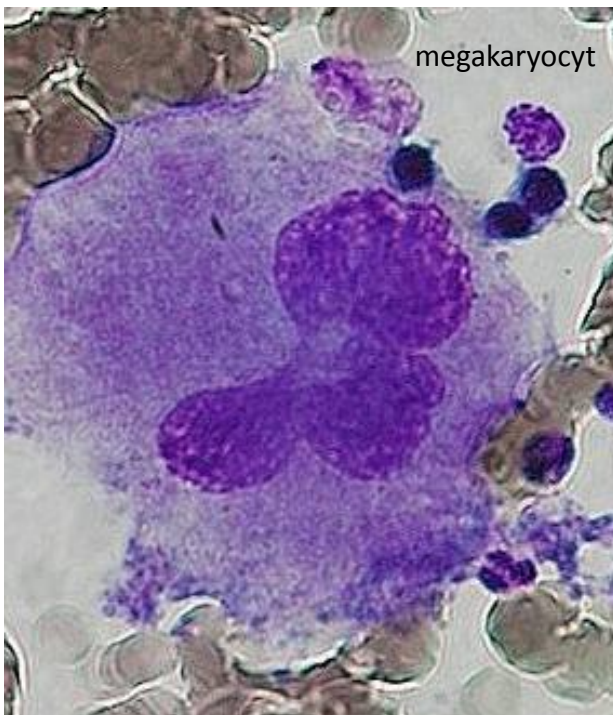
monocyt



## Erythrocyty



## Trombocyty



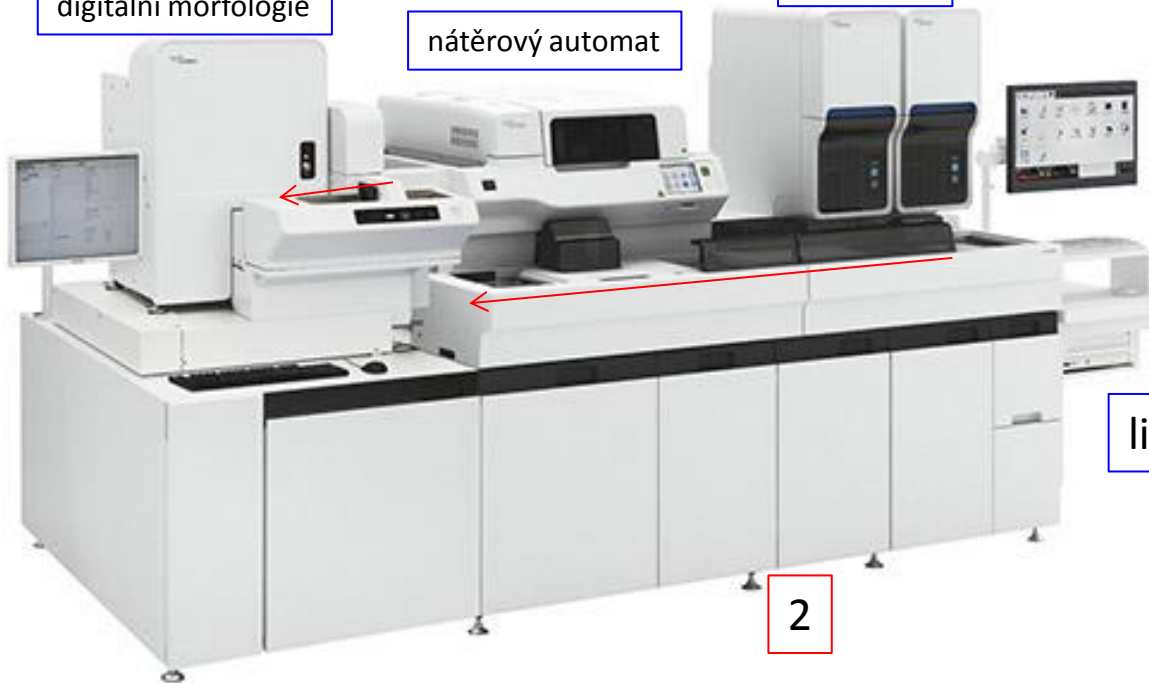
# Hematologické analyzátořy



digitální morfologie

nátereový automat

analyzátoř



linka



1

2

3

# Principy měření hematologických analyzátorů

- principy měření:
  - ✓ impedanční analýza
  - ✓ optická analýza
    - hydrodynamická fokusace
  - *kombinace různých principů analýzy*
- spektrofotometrická analýza hemoglobinu

## Principy měření umožňují vyšetření:

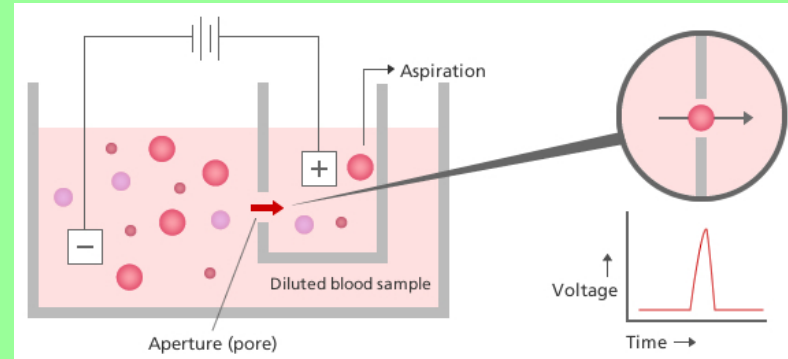
- kvantitativní – počet buněk
- kvalitativní – morfologie buněk
  - ✓ tvar buňky
  - ✓ tvar a velikost jádra
  - ✓ obsah cytoplazmy



# Impedanční analýza

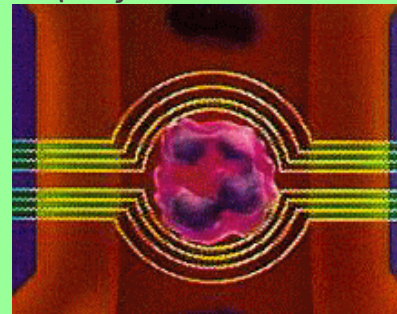
## ➤ ředění buněčné suspenze

- ✓ diluent - vodivý
- ✓ krevní buňka – nevodivá



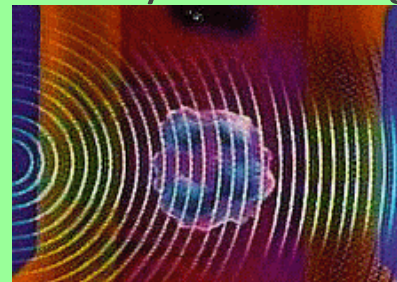
## ➤ průchod buněk mezi elektrodami (*stejnoseměrné elektrické pole*) → impuls

- ✓ prochází vždy jediná buňka
- ✓ počet impulsů = počet buněk
- ✓ velikost impulsů = velikost buněk



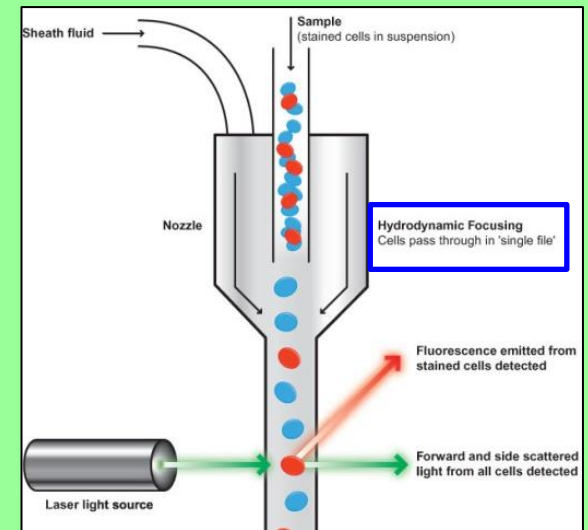
## ➤ možné doplnění vysokofrekvenční analýzou

- ✓ na buňku superponováno vysokofrekvenční elektrické pole
- ✓ analýza vysokofrekvenčního napětí buňky = morfologie buňky

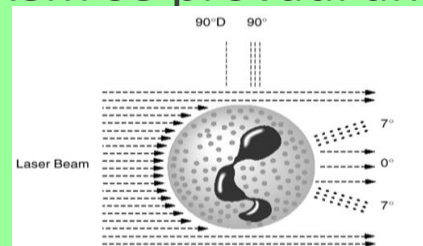


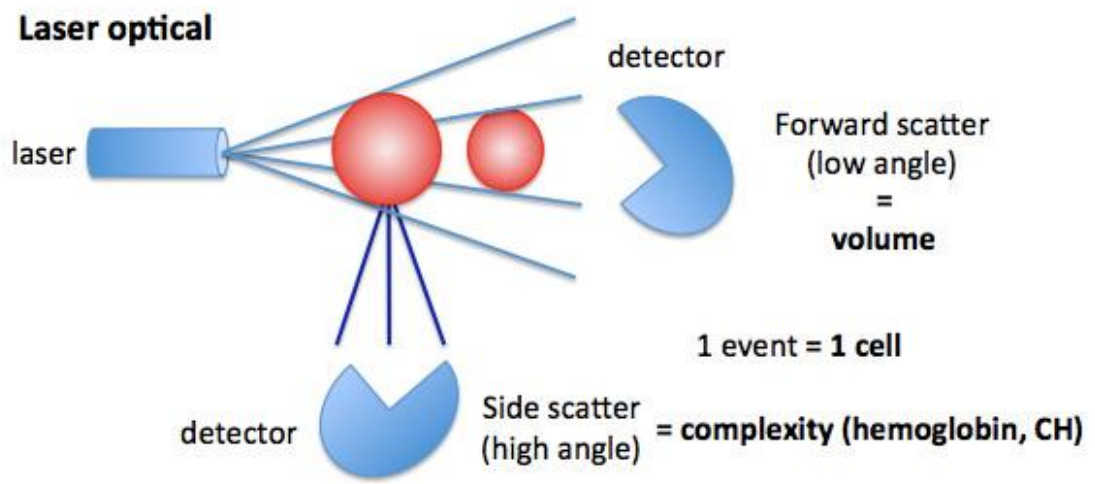
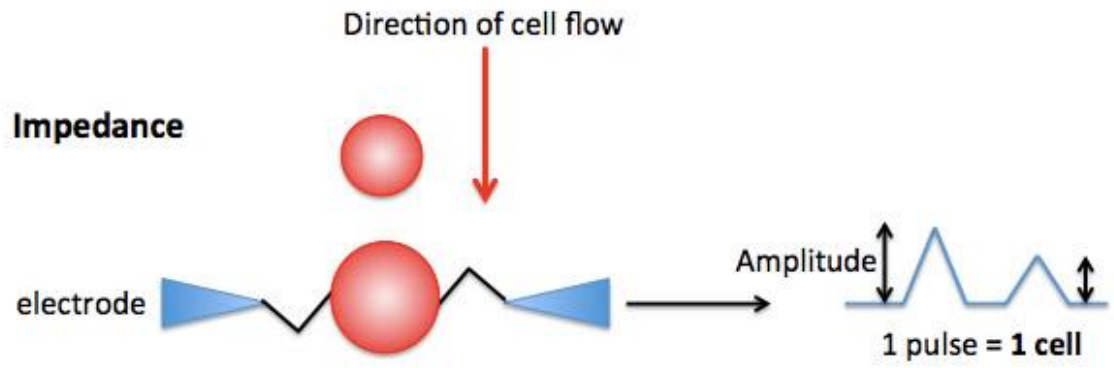
# Optická analýza

- hydrodynamická fokusace: usměrnění buněk proudem izotonické kapaliny při průchodu měřícím kanálem „po jedné“
- ředění buněčné suspenze
  - ✓ diluent – opticky inaktivní
  - ✓ krevní buňka – opticky aktivní
- interakce buněk s monochromatickým laserovým paprskem
- po interakci buňky s paprskem se provádí analýza:



- ✓ prošlého světla ( $0^\circ$ )
- ✓ odraženého světla
- ✓ depolarizovaného světla
- ✓ fluorescence
  - *cytochemické barvení enzymu (peroxidáza) v buňkách, doplňková analýza absorpce a rozptylu světla dle stupně reakce enzymu v cytoplasmě (u některých typů přístrojů)*
- vyšetření:
  - ✓ kvantitativní a velikost buňky → detekce ve směru ( $0^\circ$ )
  - ✓ kvalitativní/morfologie buňky → detekce odraženého a depolarizovaného světla, fluorescence, případně kombinace s cytochemickou analýzou

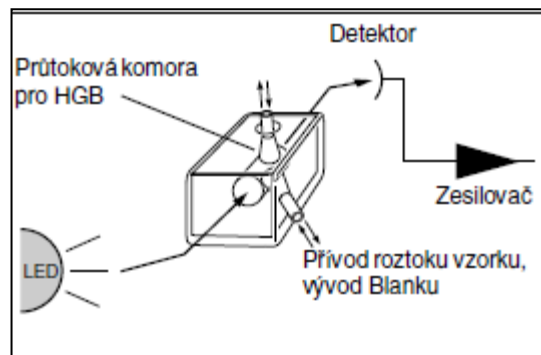




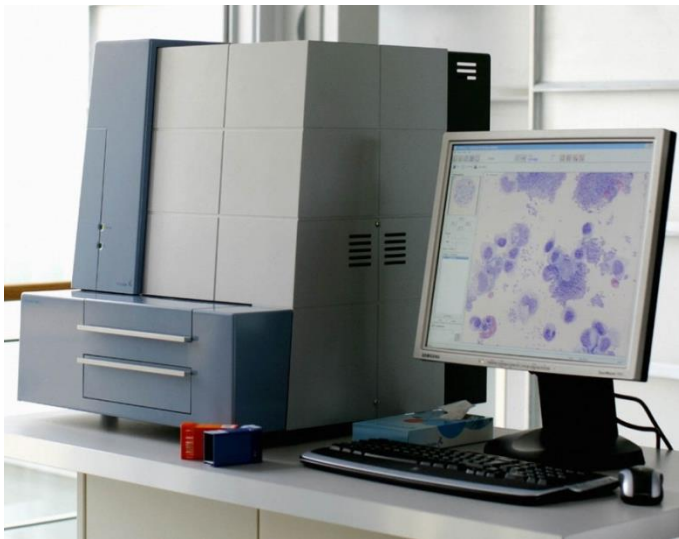
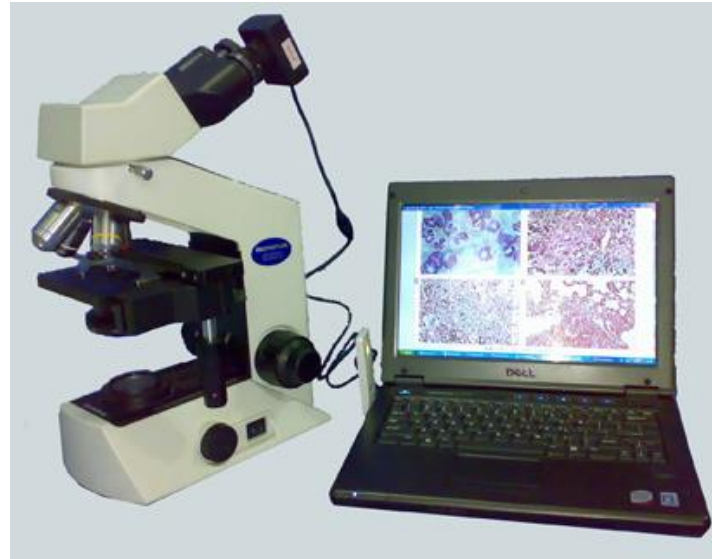
<http://www.eclinpath.com/hematology/tests/hemoglobin/rbc-analysis-2/>

# Spektrofotometrická analýza hemoglobinu

- hemolýza všech erytrocytů lyzačním (*bezkyanidovým*) roztokem
- uvolněný HGB je převeden na chromogenní formu s nejvyšší hodnotou absorbance při  $\lambda = 540 \text{ nm}$ 
  - ✓ HGB je převeden na chromogenní formu reagensy (*např. imidazolem nebo sodium lauril sulfátem*), která vytváří hemoglobinový komplex
- měření absorbance hemolyzovaného vzorku a blanku (*lyzační roztok*)
  - ✓ měření cca 8x (*dle typu přístroje*)
- z rozdílu absorbancí je vypočítána koncentrace HGB

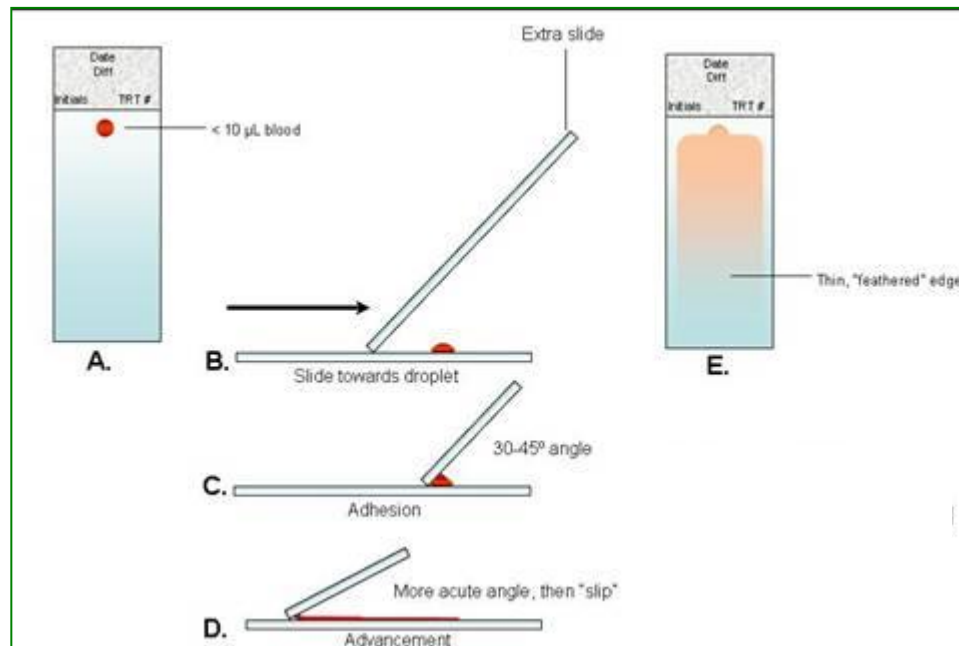


# Mikroskopovací zařízení



# Zhotovení nátěru krve

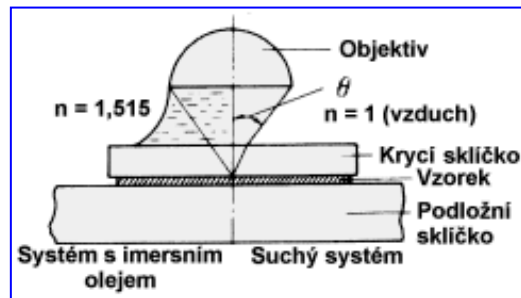
- roztírací sklíčko položit před kapku krve na podložním skle pod úhlem cca 30 - 40° (*nikdy ne do kapky krve*); po dotyku krve a roztíracího skla se krev rozlije podél hrany skla; po té rychle krev rozetřít po podložním skle
- sílu nátěru zvažovat – čím větší úhel, tím silnější nátěr
  - ✓ úhel se řídí hodnotou HCT: čím  $\uparrow$ HCT, tím  $\downarrow$ úhel; čím  $\downarrow$ HCT, tím  $\uparrow$ úhel
- nátěr musí být: rovnoměrný, přiměřeně tenký, dlouhé okraje musí být rovné, na konci přechází „do ztracena“



# Mikroskopování

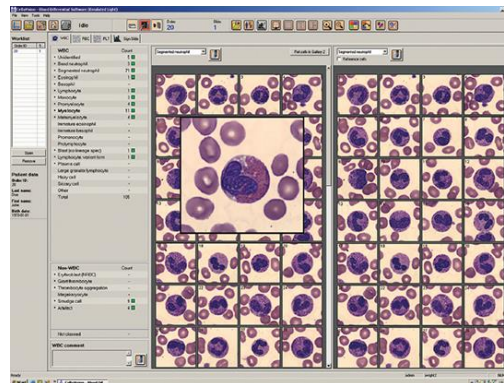
## ➤ mikroskop

- ✓ suchý objektiv: mezi preparátem a objektivem je vzduch (*přehledné prohlížení a buněčnost preparátu*)
- ✓ imerzní objektiv: mezi preparátem a objektivem je imerzní olej (*morfologie buněk*)
  - imerzní olej má podobný index lomu jako sklo – vznikne opticky homogenní prostředí, zvýší se index lomu prostředí mezi preparátem a objektivem  
*imerzí může být: voda, parafinový olej, glycerol, cedrový olej, kanadský balzám (voda má vyšší index lomu než vzduch, ale nižší než imerzní olej)*



## ➤ digitální morfologie

nové generace analyzátorů svým softwarovým vybavením digitálně zpracovávají a vyhodnocují krevní nátěry, hovoří se o virtuální mikroskopii (telehematologie), digitální analýza vytváří databázi digitálních fotografií krvinek, které lze i exportovat e-mailem nebo po internetu odborníkům ke konzultaci



# Barvení nátěrů periferní krve a aspirátů kostní dřeně

- Panoptická barvicí technika:
  - ✓ fixační roztok May-Grunwald – složení: eozin Y, metylenová modř, metylalkohol, glycerol
  - ✓ barvicí roztok Giemsa-Romanowsky – složení: metylenová modř, azur-eozin, azur II, metylalkohol, glycerol, fosfátový pufr pH 6,8-7,0
- Základní principy barvení:
  - ✓ Aniontové (kyselé) barvivo eozin Y se váže na *kationtové* části molekul proteinů a barví oranžovočerveně hemoglobin a eozinofilní granula
  - ✓ Kationtové (zásadité) barvivo azur B, se váže na *aniontové* části molekul a barví modrošedě zbarvení nukleové kyseliny (DNA nebo RNA), nukleoproteiny, granula bazofilů a sekundární granula neutrofilů.

*Pro správné vyhodnocení preparátů je nutná pravidelná kontrola kvality panoptického i speciálního cytochemického barvení.*

Celkové obarvení nátěru je výsledkem řady různých kombinací těchto barevných reakcí, které nakonec dávají výsledný vzhled nabarveného preparátu.

*Preparáty lze připravovat manuálně nebo na nátěrových a barvicích automatech. Princip barvení je vždy stejný.*