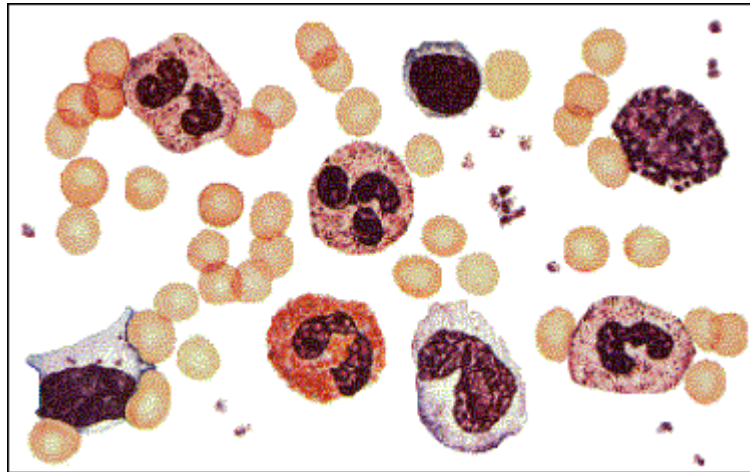


**Krevní buňky a principy jejich
vyšetřování
na hematologických
analyzátorech a mikroskopicky**

Bourková L., OKH FN Brno

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 (WBC - White Blood Cells)

blast

promyelocyt

myelocyt

metamyelocyt

neutofilní tyč

neutofilní segment

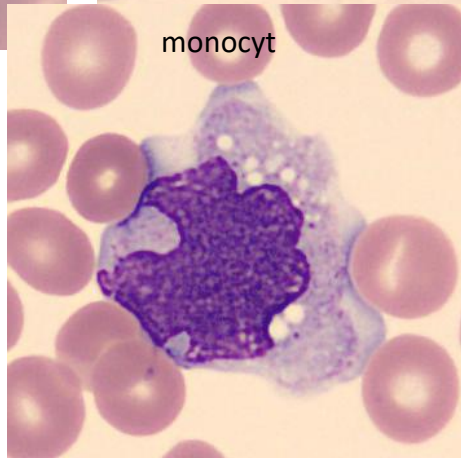
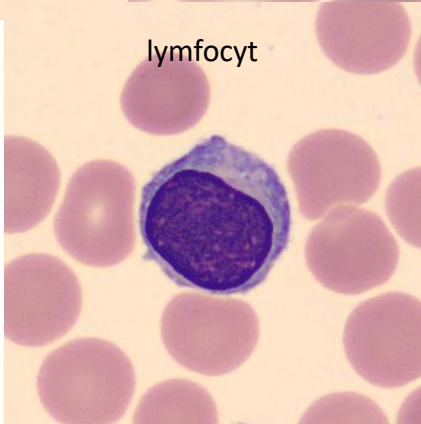
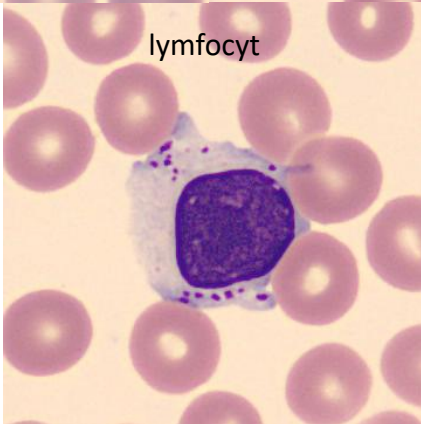
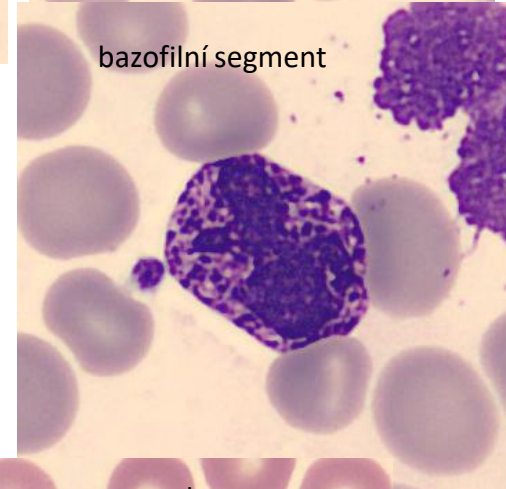
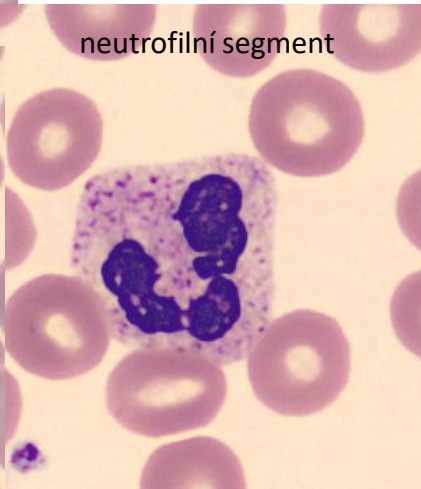
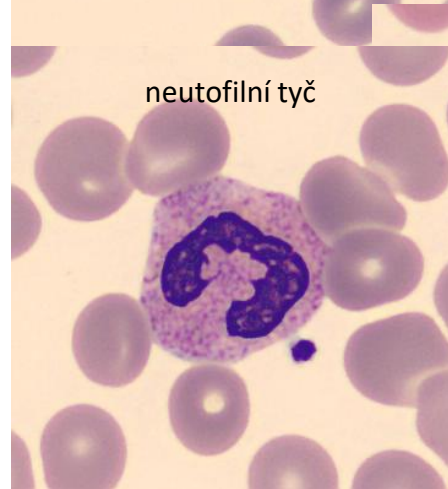
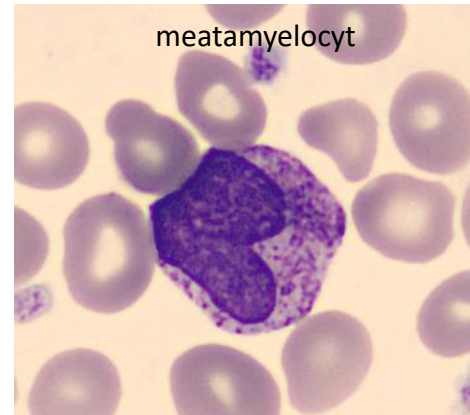
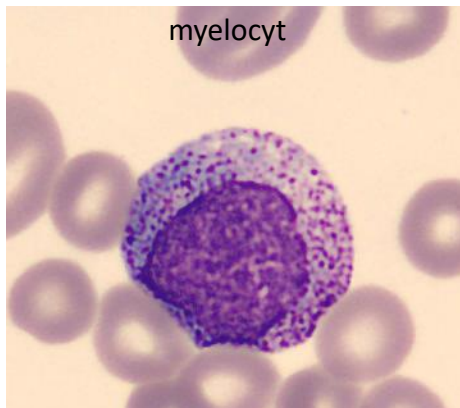
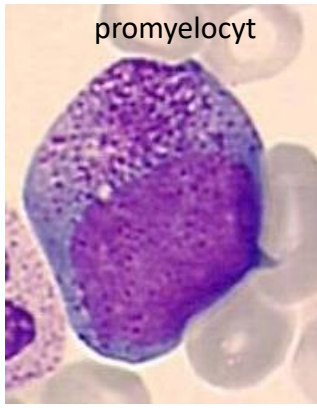
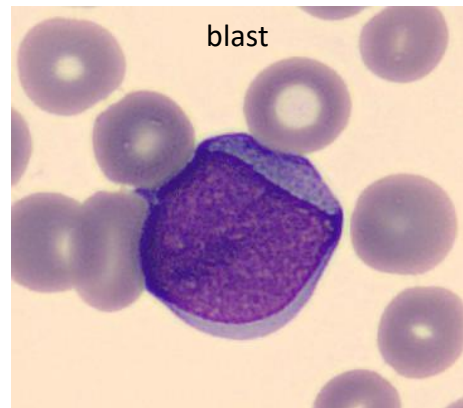
eozinofilní segment

bazofilní segment

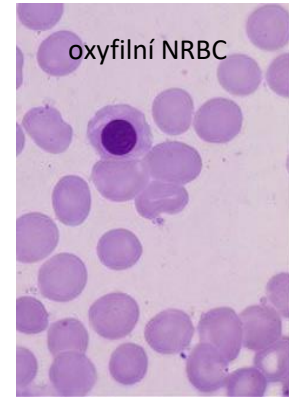
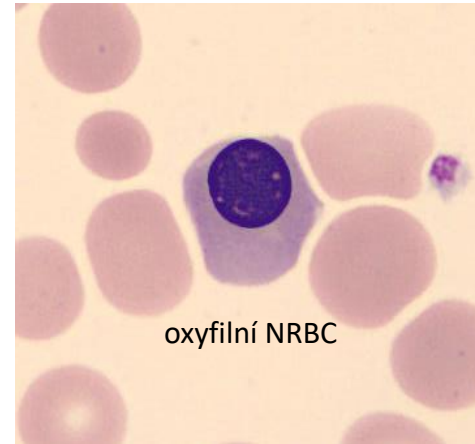
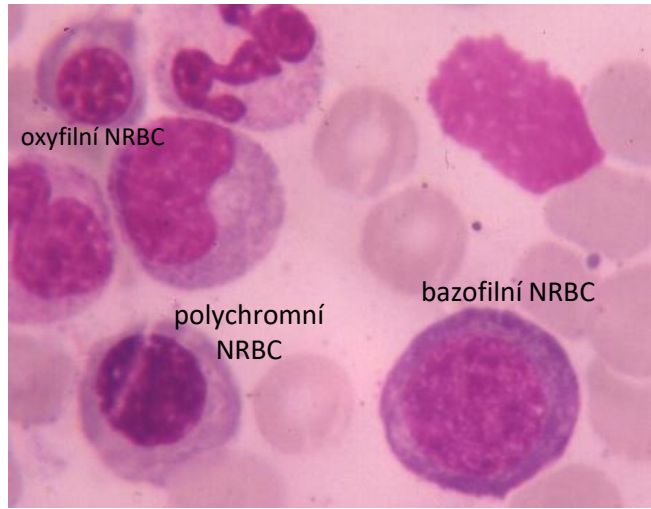
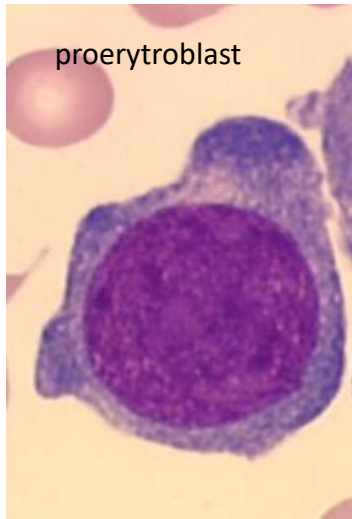
lymfocyt

lymfocyt

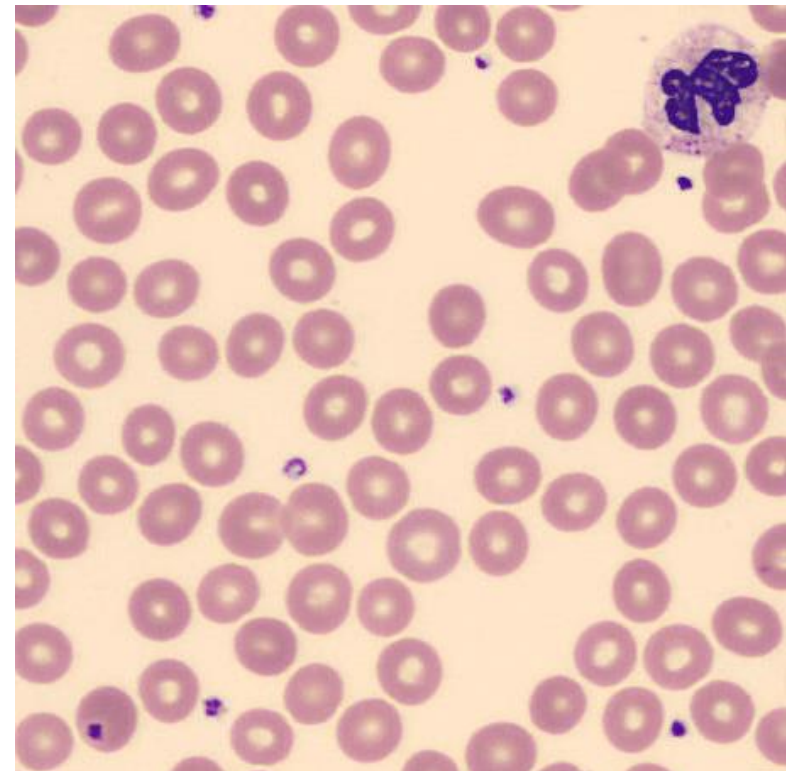
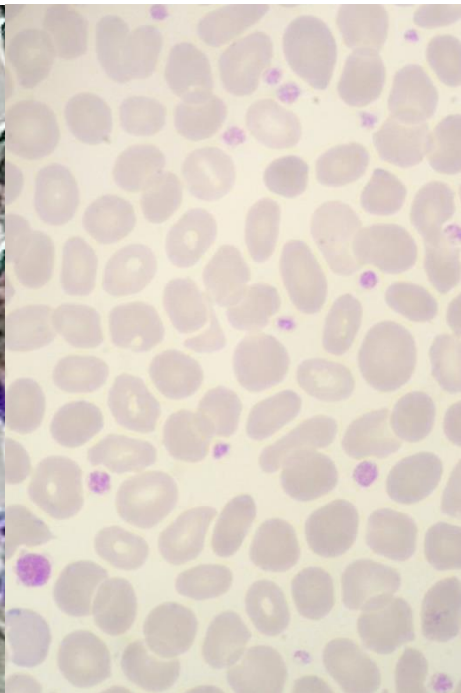
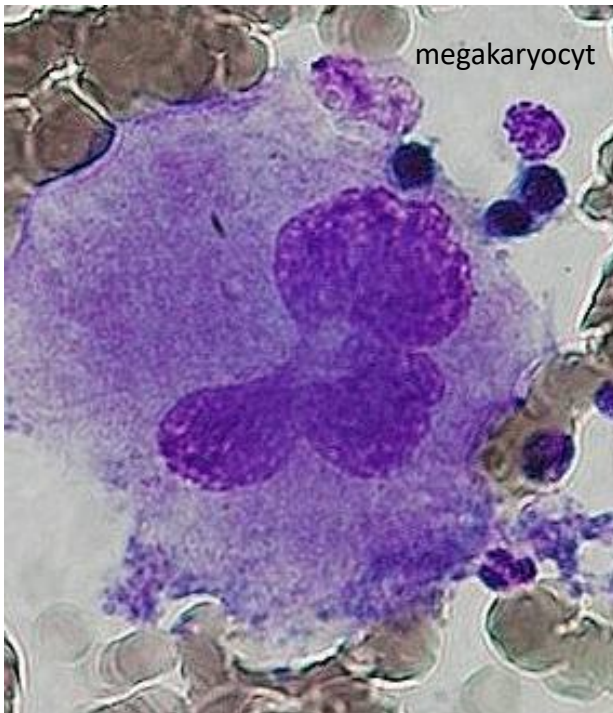
monocyt



Erythrocyty (*RBC – Red Blood cells*)



Trombocyty – (*PLT – Platelets*)



Hematologické analyzátořy

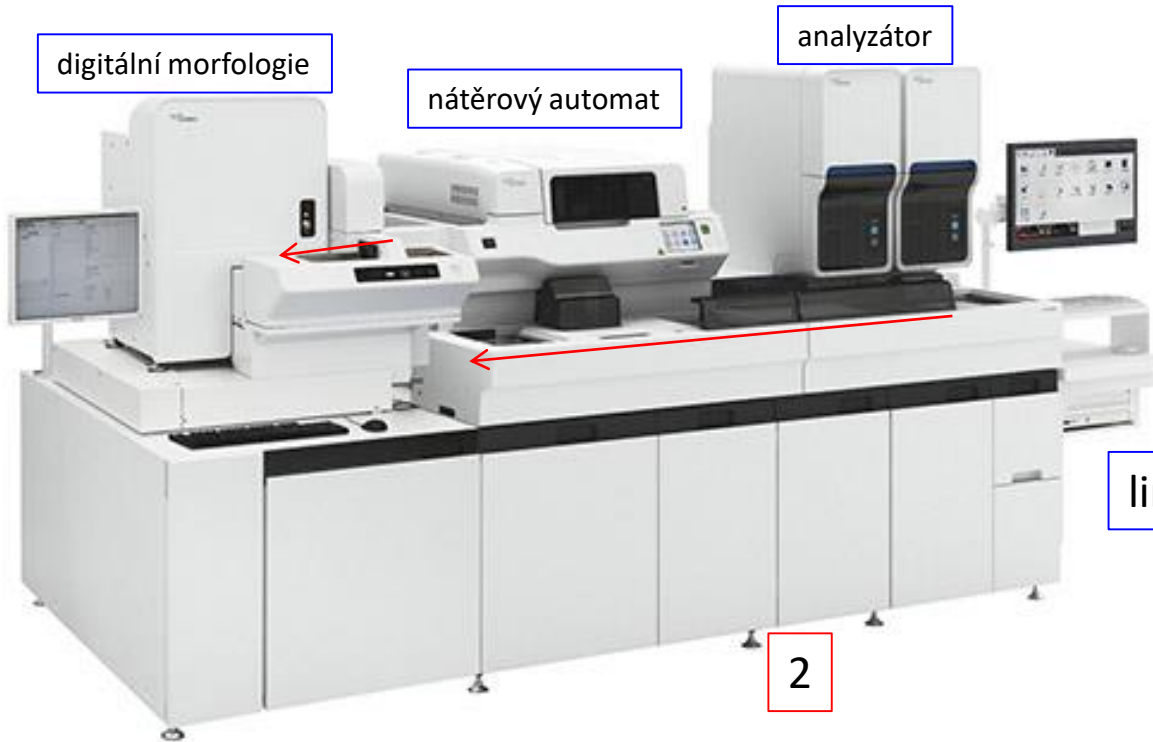


digitální morfologie

nátěrový automat

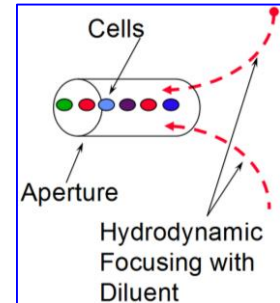
analyzátoř

linka



Principy měření hematologických analyzátorů

- principy měření buněk:
 - ✓ impedanční analýza
 - ✓ optická analýza
 - kombinace různých principů analýzy
 - hydrodynamická fokusace:
usměrnění buněk proudem izotonické kapaliny (diluentem) při průchodu měřícím kanálem „po jedné“
- spektrofotometrická analýza hemoglobinu



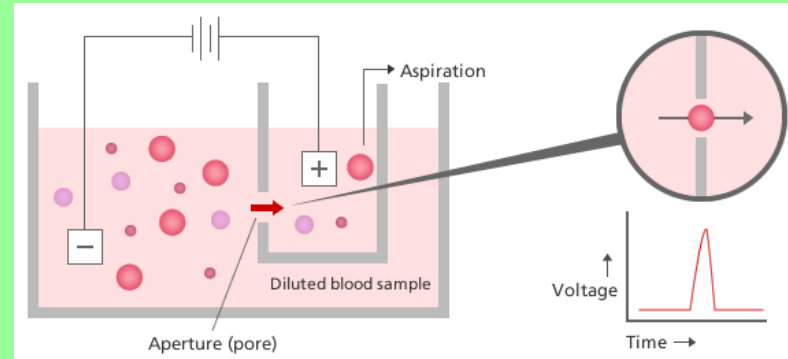
Principy měření umožňují vyšetření:

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

Impedanční analýza

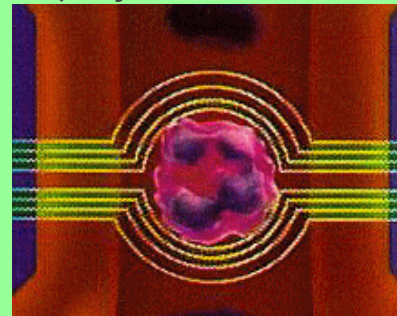
➤ ředění buněčné suspenze

- ✓ diluent - vodivý
- ✓ krevní buňka – nevodivá



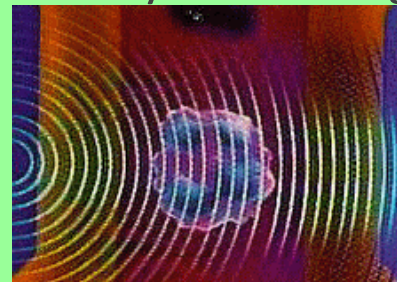
➤ průchod buněk mezi elektrodami (*stejnoseměrné elektrické pole*) → impuls

- ✓ 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

➤ ředění buněčné suspenze

- ✓ diluent – opticky inaktivní
- ✓ krevní buňka – opticky aktivní

➤ interakce buněk s monochromatickým laserovým paprskem

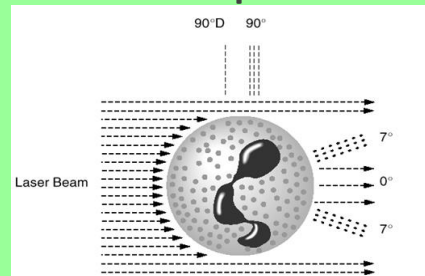
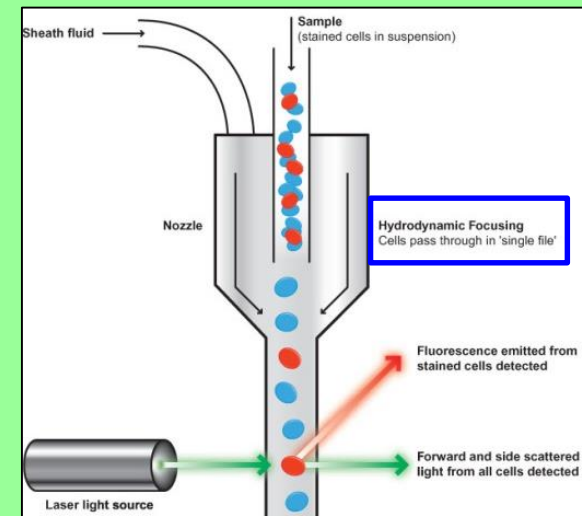
➤ po interakci buňky s paprskem se provádí analýza:

- ✓ prošlého světla (0°)
- ✓ 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)*

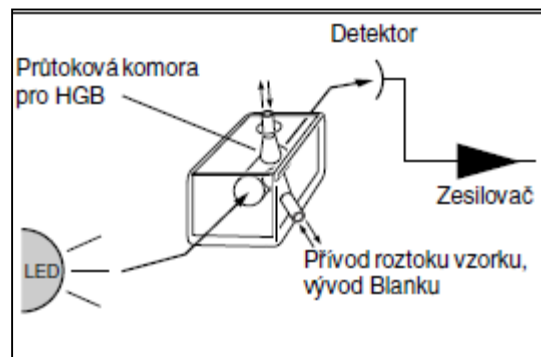
➤ vyšetření:

- ✓ kvantitativní a velikost buňky → detekce ve směru (0°)
- ✓ kvalitativní/morfologie buňky → detekce odraženého a depolarizovaného světla, fluorescence, případně kombinace s cytochemickou analýzou

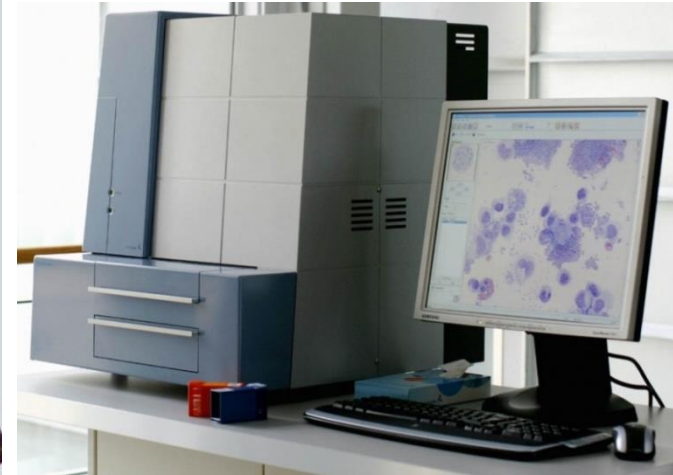
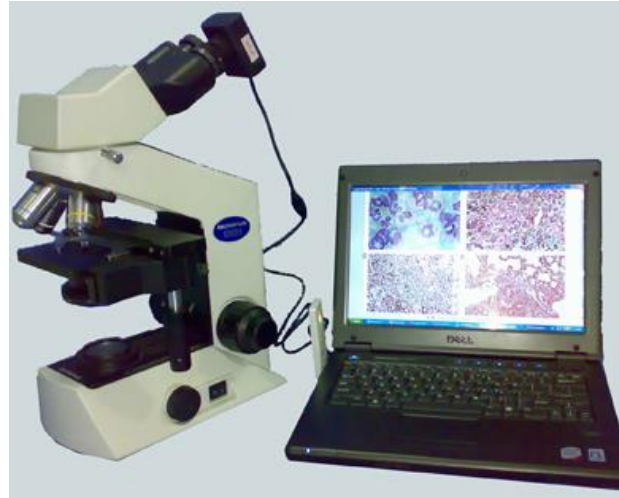


Spektrofotometrická analýza hemoglobinu

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



Mikroskopovací zařízení

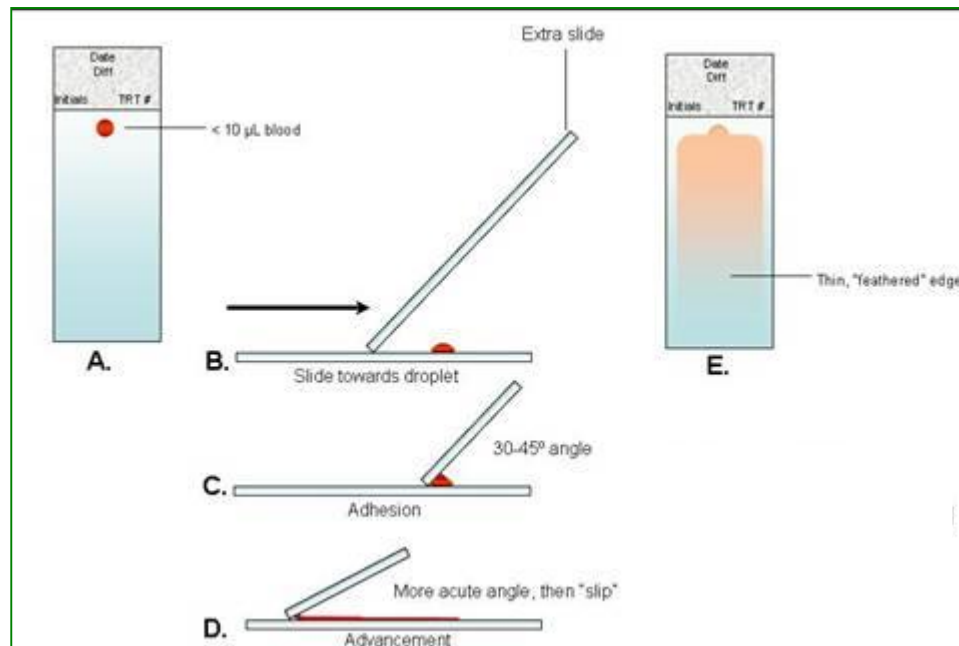


WBC	Count	%
• Unidentified	-	-
• Band neutrophil	-	-
• Segmented neutrophil	121	54.0
• Eosinophil	1	0.4
• Basophil	-	-
• Lymphocyte	50	22.3
• Monocyte	17	7.6
• Plasmacytocyte	-	-
• Myelocyte	-	-
• Metamyelocyte	-	-
Immature basophil	-	-
Promonocyte	-	-
Prolymphocyte	-	-
• Blast (no storage spec)	-	-
• Lymphocyte, variant form	8	3.6
• Plasma cell	3	1.3
Large granule lymphocyte	-	-
Hairy cell	-	-
Szary cell	-	-
Other	-	-
Pseudopelger	-	-
Total	224	100

Non-WBC	Count	%
• Erythroblast (NEBC)	-	-
• Giant thrombocyte	1	-
• Thrombocyte aggregation	1	-
• Megakaryocyte	-	-
• Smudge cell	-	-

Zhotovení nátěru krve

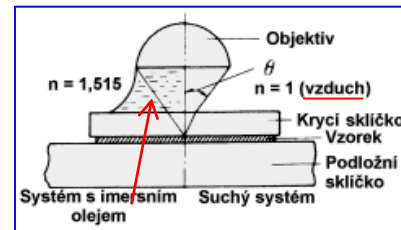
- roztírací sklíčko položit před kapku krve na podložním skle pod úhlem cca 30 - 40° (*nikdy ne do kapky krve*); po doteku krve a roztíracího skla se krev rozlije podél hrany skla; po té rychle krev rozetřít po podložním skle
- sílu nátěru zvažovat – čím větší úhel, tím silnější nátěr
 - ✓ úhel se řídí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



Mikroskopování

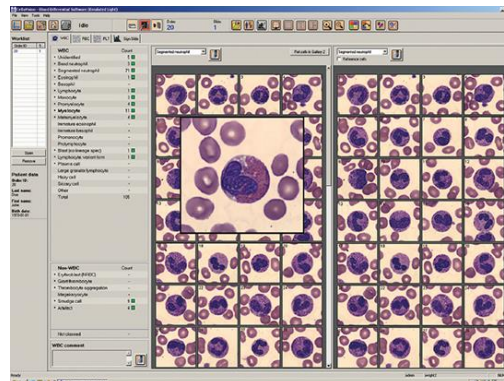
➤ mikroskop

- ✓ 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)
- ✓ zvětšení:
1000x (morfologie buněk)
200x (přehledný náhled na preparát)
- ✓ hodnotit nátěr komplexně (WBC, RBC, PLT)
- ✓ hodnocení subpopulací WBC a obecně jaderných buněk v periferní krvi i KD v %



➤ 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.