

VAJE IZ KLINIČNE KEMIJE

VAJA 1 : HEMATOLOGIJA

Ime in priimek:

Skupina:

Datum:

LABORATORIJSKE PREISKAVE V KLINIČNI HEMATOLOGIJI

1. KRVNA SLIKA

Bolezni se velikokrat pokažejo tudi s spremembami v krvi. Izsledke kvantitativnih in kvalitativnih preiskav celic v periferni krvi imenujemo krvna slika. Razdelimo jo na rdečo in belo krvno sliko ter število trombocitov. Za pravilno vrednotenje je pri sumu na bolezen krvotvornih organov potrebno vedno napraviti celotno krvno sliko.

Avtomatizirano analizo krvnih celic omogočajo hematološki analizatorji. Štetje in ocena lastnosti krvnih celic poteka s pomočjo električnih, optičnih ali kombinacijom obojih načinov detekcije.

Električne meritve so zasnovane na spoznanju, da krvne celice slabo prevajajo električni tok. Pretok suspenzije celic v raztopini elektrolita povzroči povečanje električnega upora. Število sprememb upora v enoti časa je sorazmerno številu celic. Velikost spremembe upora je sorazmerna velikosti oziroma posredno volumnu celice. Meritve prevodnosti, kjer gre skozi celico elektromagnetni tok visoke frekvence, dajo informacijo o razmerju jedra in citoplazme, gostoti jedra in zrnih v citoplazmi.

Pri optičnih meritvah vzorec kri potuje v enakomernem toku skozi polje zaznave v katerega je usmerjen laserski žarek ali žarek vidne svetlobe. Ko celica prečka polje zaznave, jo žarek zadene in pri tem sipa. Sipano svetlobo lovijo fotodetektorji in jo pretvarjajo v električne impulze. Jakost sipane svetlobe pod velikimi koti poda značilnosti notranje zgradbe celice, pod malimi koti pa velikost celice. Pri obdelavi podatkov z ustrežno programsko opremo, dobljene lastnosti omogočajo določanje števila, velikosti in ločevanje podvrst levkocitov.

Pri optičnih meritvah se pri nekaterih analizatorjih uporablja reakcija na peroksidazo. V tem primeru z merjenjem sipane svetlobe in absorbance, ki je sorazmerna aktivnosti peroksidaze lahko opredelimo posamezne vrste levkocitov. Reakcija je močno pozitivna v azurofilnih zrnih granulocitov, manj v monocitih in vedno negativna v limfocitih.

Koncentracijo hemoglobina določajo analizatorji fotometrično s hemiglobincianidno metodo. Izmerijo tudi volumen eritrocitov medtem ko hematokritno vrednost, povprečno količino hemoglobina v eritrocitih in povprečno koncentracijo hemoglobina v litru eritrocitov izračunajo.

Referenčne vrednosti krvne slike za odraslega človeka

Rdeča krvna slika

Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	4.5 - 5.9 moški 4.1 - 5.1 ženske
hemoglobin (g/L)	140 - 175 moški 123 - 153 ženske
hematokrit	0.42 - 0.50 moški 0.36 - 0.45 ženske
retikulociti ($\times 10^9/L$)	21 - 94
(%)	0.2 - 2
PVE (fL)	80 - 96
PHE (pg)	27 - 33
PKHE (g/L)	334-355

Bela krvna slika

Levkociti ($\times 10^9/L$) 4.5 - 11.0

Vrednosti diferencialne bele krvne slike :

	Relativno (%)	Absolutno ($\times 10^9/L$)
	število	število
neutrofilci	40 - 70	1.8 - 7.7
limfociti	22 - 44	1.0 - 4.8
monociti	0 - 7	0 - 0.8
eozinofilci	0 - 4	0 - 0.45
bazofilci	0 - 2	0 - 0.2

Trombociti ($\times 10^9/L$) 150 - 440

Praktično delo:

-krvna slika z hematološkim analizatorjem

Po vklopu aparat preizkušamo z tremi kontrolnimi vzorci krvi znanih vrednosti za belo in rdečo krvno sliko. Rezultati kontrolnih vzorcev morajo ustrezati vrednostim, ki jih predpisuje proizvajalec. Krvi ki jo bomo analizirali odvzamemo v epruvete z EDTA. premešamo ter pričnemo z meritvijo. Po končani meritvi se vrednosti krvne slike izpišejo skupaj z izrisom grafične predstavitev levkocitov.

-vednosti krvne slike analiziranega vzorca:

-komentar

Čeprav z analizatorji dobimo izsledke hitro natančno in poceni je za nekatere vzorce potrebno pregledati razmaz krvi (napraviti diferencialno krvno sliko). Zaradi raznolikosti morfologije krvnih celic jih analizator ne more oceniti, če niso normalne. Priporočajo, da pregledamo razmaz periferne krvi: če gre za sum na krvno bolezen, če je število levkocitov $> 15 \times 10^9/L$ in $< 3 \times 10^9/L$, število trombocitov $< 100 \times 10^9/L$, če je zvečan delež posameznih levkocitov (nevtrofilcev > 0.80 , limfocitov > 0.50 , monocitov > 0.15 , eozinofilcev > 0.20 , bazofilcev > 0.20), če je v izpisu opozorilo za morfološke nepravilnosti in če so spremembe v grafični predstavitvi levkocitov, kot sta slaba ločitev celičnih populacij, nepravilna lega ali dodatna populacija celic. .

2. DIFERENCIALNA BELA KRVNA SLIKA (DKS)

Diferencialna bela krvna slika je podatek v odstotkih o deležu posameznih vrst levkocitov, ki ga ugotovimo z razlikovanjem in štetjem levkocitov v razmazu periferne krvi.

Praktično delo:

-priprava krvnega razmaza

Za pripravo krvnega razmaza uporabimo čisto objektno steklo, na katerega kanemo majhno kapljico sveže kapilarne krvi ali venske odvzete z EDTA. S palcem in kazalcem desne roke primemo drugo steklo z katerim bomo razmazali kri, in ga pod kotom 25-30 postavimo a na objektno steklo, tik pred kapljico krvi. Počasi ga premaknemo v desno, da zajamemo kapljico krvi in z enakomernim pritiskom na površino hitro potegnemo po objektnem steklu. Ob tem ne smemo spreminjati nagiba in pritiska na objektno steklo. Debelina krvnega razmaza je odvisna od pritiska na površino objektnega stekla, od kota in hitrosti potega.

Krvni razmaz mora biti tanek, enakomeren in mora imeti ravne stranske robove. Pokriva naj približno 2/4 površine v sredini objektnega stekla in ne sme segati do roba objektnega stekla. Na koncu mora biti zaobljen. Krvni razmaz označimo in pustimo da se posuši na zraku.

-barvanje krvnega razmaza

Barvanje po Pappenheimu (MGG- May-Grunwald-Giemsa)

Posušene krvne razmaze potopimo v posodico z barvilom po May-Grunwaldu (raztopina eozina in metilenskega modrila v metanolu) 5 minut. Nato razmaze prenesemo v drugo posodico v kateri je barvilo po May-Grunwaldu razredčeno z pufrom (1:2) Po 1 minuti prenesemo razmaze brez spiranja v tretjo posodico za 15-20 minut v razredčeno raztopino po Giemsi (1:10). Obarvane razmaze speremo s pufrom in postimo da se posušijo na zraku.

V pravilno obarvanih razmazih so celična jedra obarvana vijoličasto, celična citoplazma rožnato do modro, nevtrofilne granulacije sivovijoličasto, eozinofilne granulacije oranžno, bazofilne granulacije pa temnovijoličasto.

-pregled krvnega razmaza

Pri mikroskopskem pregledu obarvanih krvnih razmazov, najprej z majhno povečavo poiščemo vidno polje. Na tanek zaobljen del razmaza kanemo kapljico imerzijskega olja in z 1000 x povečavo ocenimo vse vrste celic, ki jih vidimo. Zabeležimo vsak levkocit, ki ga vidimo, in ga opredelimo. Pozornost posvetimo morebitnim morfološkim spremembam citoplazme in jedra. Ocenimo tudi velikost, obarvanost in obliko eritrocitov ter trombocitov. Za oceno moramo pregledati najmanj 200 celic v krvnem razmazu. Rezultat izrazimo z relativnim številom. Bolj kot delež posameznih vrst levkocitov je pomembno njihovo absolutno število. Dobimo ga tako, da število vseh levkocitov pomnožimo z deležem za posamezno vrsto. Rezultat izrazimo s številom v litru. Referenčne vrednosti za zdravega človeka, glej predhodno vajo

- DKS analiziranega vzorca krvi:

-komentar

3. HITROST SEDIMENTACIJE ERITROCITOV (HSE)

Ugotavljanje hitrosti sedimentacije je ena najstarejših laboratorijskih preiskav. Običajno jo vedno določimo skupaj s krvno sliko. HSE je odvisna od številnih dejavnikov, zato je njen diagnostični pomen omejen. Kadar je izrazito pospešena, gre zelo verjetno za neko bolezensko stanje, ne pa za določeno bolezen. Pospešena HSE je nespecifičen znak bolezni, tako kot je zvečana telesna temperatura.

Eritrociti se v navpično postavljeni cevki sesedajo, ker imajo večjo relativno gostoto od plazme. Na HSE vpliva več dejavnikov : kopičenje eritrocitov v večje ali manjše » rulo« oblike, viskoznost plazme, oblika in velikost eritrocitov, spremembe v sestavi plazemskih beljakovin, položaj cevke, temperatura okolja.

Praktično delo

Kri za določitev HSE odvezamemo z natrijevim citratom v razmerju 1:5. Kri dobro premešamo. V epruveto z krvjo počasi potisnemo posebno graduirano cevko določenega premera. Pri tem nastali nadpritisk napolni cevko s krvjo do oznake 0. Pripravljeno pipeto skupaj z epruveto postavimo navpično v kovinsko stojalo in vključimo uro za meritev časa.

Po 1 uri odčitamo razdaljo od meniskusa plazme do roba stolpa eritrocitov. Rezultat izrazimo v mm/ h

-referenčne vrednosti:	starost	< 50	> 50 let
	moški	15	20
	ženske	20	28

-izsledek in razlaga

4. DOLOČANJE PROTROMBINSKEGA ČASA

V presejalne preiskave s katerimi lahko opredelimo večino klinično pomembnih motenj v hemostazi sodijo: **protrombinski čas**, število trombocitov, čas krvavitve, parcialni trombotoplastinski čas, trombinski čas in fibrinogen.

Protrombinski čas (PČ) meri aktivnost v ekstrinzični koagulaciji (FII, FV, FX, FVII). Prvi ga je opisal Quick leta 1935 in domneval, da meri aktivnost protrombina. Izsledke je izrazil v odstotkih aktivnosti plazme zdravega. V tem času še niso poznali F V, F VII in F X.

Danes je PČ presejalna preiskava za oceno pridobljenih in prirojenih motenj aktivnosti protrombina, faktorjev V, VII, X in fibrinogena. Primeren je tudi za spremljanje antikoagulacijskega zdravljenja s kumarini. Citratni plazmi dodamo zmes popolnega trombotoplastina in kalcijevega klorida. Merimo čas, ki je potreben za nastanek strdka.

- **reagenti in oprema:** popolni trombotoplastin v raztopini kalcijevega klorida, pipete 100 in 200 uL, ura štoperica, vodna kopel ali koagulometer.

-**odvzem krvi za določanje protrombinskega časa:** kri odvezamemo pri minimalnem zažetju žile. Žilo smemo prebosti le enkrat s kratko, toda debelo iglo. Prvi mL krvi uporabimo za druge preiskave. Kri odvezamemo v epruveto z raztopino natrijevega citrata 109 mM v razmerju 1:10. Vzorce krvi centrifugiramo 2000 g 15 minut da ločimo krvno plazmo od krvnih celic

- **postopek:** PČ določimo pri temperaturi 37°C, v vodno kopel postavimo štiri epruvete in postopek izvajamo na način prikazan v tabeli 2.

Število epruvet	1	2	3	4
plazma bolnika (uL)	100	100		
plazma zdravega (uL)			100	100
inkubiramo 1-2 minute				
trombotoplastin in kalcijev klorid (uL)	200	200	200	200

Sprožimo uro, in merimo čas ki je potreben da nastane strdek. Izsledok je povprečje dveh določitev.

- *izsledki*: V primerih, ko PČ uporabljamo za diagnostične namene, zadošča izražanje izsledkov v časovnih enotah ali v odstotkih aktivnosti. V večini primerov preiskovanje tudi nadaljujemo z določanjem aktivnosti posameznega faktorja ekstrinzične koagulacije. Pri primerih, ko PČ uporabljamo za oceno učinka zdravljenja s kumarini, se soočamo z številnimi problemi. Tromboplastini, ki jih uporabljamo za določitev PČ, so komercialno pripravljene iz možganov, pljuč, placentnega tkiva različnih živali ali človeka. Njihova občutljivost na zmanjšano aktivnost posameznih koagulacijskih faktorjev je odvisna od vira in vsebine fosfolipida ter načina priprave. Zaradi tega so izsledki neprimerljivi, če so izraženi v časovnih enotah ali v odstotkih. Da bi poenotili izsledke PČ so leta 1977 pripravili referenčni tromboplastin (first international reference preparation lot 67/40) iz človeških možganov in mu določil indeks občutljivosti (ISI = International Sensitivity Index)¹. Danes so na voljo samo tromboplastini z ugotovljenim indeksom občutljivosti v primerjavi z referenčnim tromboplastinom. Tromboplastini z naraščajočo vrednostjo ISI imajo vse manjšo občutljivost. Izsledke PČ sedaj poenotimo tako, da jih izražamo z mednarodno umerjenim razmerjem (INR = International Normalised Ratio). INR je pravzaprav razmerje protrombinskih časov, ki bi ga dobili, če bi uporabili referenčni tromboplastin namesto uporabljenega. Priporočeni INR za antikoagulacijsko profilakso s kumarini, npr. za preprečevanje globoke venske tromboze in pljučne embolije, embolij pri srčnih hibah, atrijski fibrilaciji in miokardnem infarktu je 2,0 do 3,0; za preprečevanje embolizmov pri mehaničnih srčnih zaklopkah pa je 2,5 do 3,5.

$$R = \frac{\text{PČ bolnika}}{\text{povprečje PČ zdravih}} \quad \text{INR} = R^{\text{ISI}}$$

Praktično delo

Določanje protrombinskega časa z koagulacijskim analizatorjem ACL 3000

-izsledki in razlaga

**Tabela 1. Povzetek priporočil za laboratorijsko spremljanje zdravljenja s kumarini
(College of American Pathologists)**

1. Kri odvzamemo z 109 mM Natrijevim citratom.
2. Vzorce krvi ali plazme lahko hranimo 24 ur pri sobni temperaturi. Priporočilo velja samo za ambulantne bolnike z uravnano terapijo, ne smemo ga uporabljati za hospitalne bolnike z kombiniranimi motnjami hemostaze.
3. Priporočajo uporabo tromboplastina z občutljivostjo med 0,9 - 1,7 ISI.
4. Moramo se zavedati vpliva uporabljenega aparata na ISI in zato priporočajo uporabo sistema reagent / aparat, za katerega so ISI določili.
5. Priporočajo kontrolo bolnika na enem sistemu aparat / reagent. Če bolniku določamo INR v isti ustanovi na različnih sistemih, je potrebno medsebojno uravnavanje.