

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 eritrocitno (rdečo), levkocitno (belo), trombocitno krvno sliko. 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. Celice v raztopini elektrolita potujejo skozi kapilaro določenega premera in dolžine. Ob zunanji in notranji strani kapilare sta pritrjeni elektrodi. Celice, ki potujejo med elektrodami, povzročijo povečanje električnega upora. Povečanje električnega upora zazna instrument kot električne impulze, ki se ojačijo. Število električnih impulzov v enoti časa je sorazmerno številu celic. Velikost spremembe upora oziroma jakost impulzov je sorazmerna velikosti oziroma posredno volumnu celice (1947 Wallace H. Coulter).

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. Pri tem se žarek na površini celice lomi in razprši (sipa), prehaja skozi celico ali se razprši znotraj celice. Razpršeno ali lomljeno 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.

Univerzitetni program Farmacija - Vaje iz klinične kemije: gradivo za interno uporabo

Koncentracijo hemoglobina določajo analizatorji fotometrično s hemiglobincianidno metodo.

Izmerijo tudi volumen eritrocitov. Hematokritno vrednost, povprečno količino hemoglobina v eritrocitih in povprečno koncentracijo hemoglobina v litru eritrocitov izračunajo.

Referenčne vrednosti krvne slike za odraslega človeka

Levkocitna (bela) krvna slika

-število levkocitov	4.0 - 10.0 x 10 ⁹ /L-deleži posameznih vrst levkocitov	
	delež	absolutno št. (x 10 ⁹ /L)
- nevtrofilci	0.4 - 0.75	1.6 - 7.5
- limfociti	0.2 - 0.50	0.8 - 5.0
- monociti	0.02 - 0.10	0.08 - 1.0
- eozinofilci	0.01 - 0.06	0.04 - 0.6
- bazofilci	0.0 - 0.01	do 0.1

Eritrocitna (rdeča) krvna slika

Število eritrocitov	(x 10 ¹² /L)	Moški (m)	4.5- 6.3
		ženske (ž)	4.2- 5.4
Volumen stisnjenih eritrocitov (hematokrit)		m	0.40 - 0.54
		ž	0.37 - 0.47
Koncentracija hemoglobina	(g/L)	m	140 - 180
		ž	120 - 160
Število retikulocitov	(x 10 ⁹ /L)		20 - 100
	(%)		0.2 - 2
Eritrocitni indeksi:			
PVE (MCV)	(fL)		81 - 94
PHE (MCH)	(pg)		26 - 32
PKHE (MCHC)	(g/L)		310-350
KVVE (RDW)	(%)		11.5 – 14.5

Trombocitna krvna slika

Število trombocitov	(x 10 ⁹ /L)	150 - 440
---------------------	------------------------	-----------

Praktično delo:

-krvna slika z hematološkim analizatorjem

Po vklopu aparat preizkušamo s tremi kontrolnimi vzorci krvi znanih vrednosti za belo, rdečo in trombocitno 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

Univerzitetni program Farmacija - Vaje iz klinične kemije: gradivo za interno uporabo

meritvijo. Po končani meritvi se vrednosti krvne slike izpišejo skupaj z izrisom grafične predstavitve levkocitov, eritrocitov in trombocitov.

-vrednosti 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 krvno bolezen ali pa sumimo nanjo, če je število levkocitov $> 15 \times 10^9/L$ ali $< 3 \times 10^9/L$, 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 iz hematološkega števca opozorilo za morfološke nepravilnosti, če so spremembe v grafični predstavitvi levkocitov kot so 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) za 5 minut. Nato razmaze prenesemo v drugo posodico v kateri je barvilo po May-Grunwaldu razredčeno z pufrom (1:1). 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 pustimo, 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)

Če krvi dodamo sredstvo proti strjevanju, se bodo čez čas celice zaradi lastne teže začele posedati na dno navpično postavljene steklene cevke (sedimentacija). Ker je od vseh celic največ eritrocitov, govorimo o sesedanju eritrocitov. Sedimentacija je spontano sesedanje eritrocitov. Najprej nastanejo reverzibilne oblike, imenovane "rouleaux", nato se eritrociti sesedejo na dno.

Ugotavljanje hitrosti sedimentacije eritrocitov je ena najstarejših laboratorijskih preiskav. Običajno jo vedno določimo skupaj s krvno sliko. Prvi jo je uvedel Westergreen. Mednarodno združenje ICSH priporoča, da preiskavo izvajamo pod standardnimi pogoji po načinu, ki jo je uvedel Westergreen. Kri odzamemo v epruvete z natrijevim citratom v razmerju 1:5 (en del antikoagulanta natrijev citrat in štirje deli krvi). Preiskavo izvajamo pri sobni temperaturi (idealna 20°C; priporočena 18-24°C). Eritrociti sedimentirajo v graduirani stekleni cevki dolžine 300 mm in notranjim premerom 2,55 mm v navpičnem položaju. Po eni uri odčitamo mejo med eritrociti in plazmo in rezultata podamo v milimetrih na uro.

Praktično delo

Kri za določitev HSE odzamemo 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 so odvisne od starosti.

pod 50 letom starosti:	m	0-15 mm/h,	ž	0-20 mm/h.
nad 50 letom starosti:	m	0-20 mm/h,	ž	0-28 mm/h.

-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 koncentracija fibrinogena.

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 odvezamo pri minimalnem zažetju žile. Žilo smemo prebosti le enkrat s kratko, toda debelo iglo. Prvi mL krvi uporabimo za druge preiskave. Kri odvezamo v epruveto z raztopino natrijevega citrata 109 mM v razmerju 1:10. Vzorce krvi centrifugiramo pri centrifugalni sili 2000 x 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 določitvev.

- **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. Trombotoplastini, ki jih uporabljamo za

določitev PČ, so komercialno pripravljene iz možganov, pljuč, placentalnega 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.