

BREDA PIVK

VAJE IZ HEMATOLOGIJE

DELOVNI ZVEZEK

ZA 3. LETNIK TEHNIŠKE ŠOLE
PROGRAM LABORATORIJSKI TEHNIK

Breda Pivk

VAJE IZ HEMATOLOGIJE

DELOVNI ZVEZEK

za 3. letnik srednje tehniške šole
program laboratorijski tehnik

Avtorica: Breda Pivk, mag. farm., spec. med. biokemije

VAJE IZ HEMATOLOGIJE – delovni zvezek

Recenzentki: Nadja Prijatelj, mag. farmacije
Tanja Kos, dipl. ing. lab. biomedicine

Lektorica: Vesna Lavrič, prof. slovenskega in srbohrvaškega jezika

Avtor naslovnice in fotografij: Ian Pivk

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

616.15-074(075.3)(076.5)

PIVK, Breda, farmacevtka

Vaje iz hematologije [Elektronski vir] : delovni zvezek za 3. letnik srednje tehniške šole : program Laboratorijski tehnik / Breda Pivk ; avtor fotografij Ian Pivk. - Besedilni podatki. - Ljubljana : Center RS za poklicno izobraževanje, 2007

Dostopno tudi na: http://www.cpi.si/ucitelji/strokovna_podrocja-izobrazevalni_programi/zdravstvo_farmacija_in_kozmetika.aspx
Dostopno tudi na: <http://www.ssfkz.si/>. - Opis temelji na verziji z dne 31.8.2007

ISBN 978-961-6246-57-6

234736896

Pripravo delovnega zvezka Hematologija je omogočilo sofinanciranje Evropskega socialnega sklada Evropske unije in Ministrstva za šolstvo in šport.



PREDGOVOR

Delovni zvezek, ki ga imate pred seboj, je plod dolgoletnih izkušenj in dela z dijaki. Vaje podpirajo teoretični pouk iz predmeta hematologija in zato potekajo vzporedno s snovjo, ki jo boste poslušali pri predavanjih.

Delovni zvezek ima naslednje sestavine: naslov vaje, datum, teoretične osnove, pribor in material, delo, rezultat, obrazložitev rezultata, oznaka, da je bila vaja opravljena in opombe. Opombe so namenjene pisnemu komentarju učitelja/ice, ki je delovni zvezek pregledal/a.

V kratkem »teoretičnem delu« se boste seznanili z načinom dela, ki ga boste opravljali pri vajah. Temu sledi natančen opis postopka, ki ga boste izvajali. Pazljivo preberite teoretični del, da boste razumeli, zakaj to vajo sploh izvajamo in kaj nam povedo dobljeni rezultati.

V »priboru in materialu« so navedeni vsi laboratorijski pripomočki, reagenti in material, ki ga boste analizirali. Števila čaš, epruvet in njihovega volumna nimate navedenega. To morate ugotoviti sami na podlagi postopka in števila dijakov v skupini. Če skupina potrebuje manj kot 10 mL reagenta, kot je to primer pri merjenju številčne koncentracije levkocitov, ne boste potrebovali velike 500 mL-čase, kamor je potrebno preliti reagent.

V rubriki »delo« so po točkah navedene faze dela, daljši postopki pa so opisani v teoretičnih osnovah. Dosledno se držite vrstnega reda posameznih faz. Delajte samostojno in se držite napotkov delovnega zvezka. Šele če česarkoli ne razumete, vprašajte za pojasnilo učitelja/ico. Ne zanašajte se zgolj na nasvete sošolcev oz. sošolk glede načina izvedbe vaje, ker so lahko napačni.

Po končani vaji takoj vpišite rezultat in pospravite delovno površino. Ne pozabiti preveriti, ali je rezultat točen. V primeru napačnega rezultata analizirajte celoten postopek dela in skušajte ugotoviti, kje ste naredili napako. Svoja opažanja skrbno zabeležite v delovni zvezek.

Na koncu večine vaj imate vprašanja za domačo nalogo. Namenjena so preverjanju in utrjevanju znanja iz vaj kot tudi iz teoretičnega pouka. Domačo nalogo lahko naredite tudi v šoli v okviru vaje, če jo predčasno končate.

Praktično delo pri vajah je pomembno dopolnilo teoretičnega znanja. Čeprav v hematoloških laboratorijih večino preiskav izvajajo hematološki analizatorji, je za razumevanje hematoloških preiskav potrebno analize izvesti ročno. Razvoj je šel v smeri od ročnih metod do avtomatiziranih in še zdaleč ni končan. Z ogledom celic pod mikroskopom si boste lažje predstavljali, kako posamezne celice izgledajo, znanje pa boste utrdili, če določeno celico, kljub slikovnemu gradivu, ki ga imate v učbeniku, tudi narišete in pobarvate. Izkustveno znanje je veliko pomembnejše kot znanje, ki vam ga posredujejo drugi.

Želim si, da vam bo delovni zvezek koristen pripomoček pri spoznavanju in razumevanju osnov hematologije in da boste prek njega usvojili veščine in znanja, potrebne za poklic laboratorijski tehnik, poleg tega pa razvijali radovednost, vedoželjnost in dvom o dobljenih rezultatih.

Avtorica

KAZALO

1	VARSTVO PRI DELU, NAVODILA ZA DELO, OGLED HEMATOLOŠKEGA LABORATORIJA, PRIBOR IN PIPETIRANJE	1
2	KAPILARNI ODVZEM KRVI S KLASIČNO LANCETO.....	7
3	KAPILARNI ODVZEM KRVI Z MIKROLANCETO	10
4	PRIPRAVA NA VENSKI ODVZEM KRVI, PRIPRAVA IN POLNENJE KOMORICE ZA ŠTETJE KRVNIH CELIC	12
5	OGLED HEMATOLOŠKEGA LABORATORIJA IN VENSKI ODVZEM KRVI	16
6	PRIPRAVA KRVNEGA RAZMAZA POD KOTOM.....	19
7	BARVANJE KRVNIH RAZMAZOV PO PAPPENHEIMU	22
8	MIKROSKOPIRANJE LASTNIH KRVNIH RAZMAZOV	26
9	MIKROSKOPIRANJE MORFOLOŠKO SPREMENJENIH ERITROCITOV	31
10	MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE ERITROCITOV V VENSKI KRVI S KOMORICO.....	34
11	MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE ERITROCITOV V KAPILARNI KRVI S KOMORICO.....	40
12	MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE RETIKULOCITOV I	43
13	MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE RETIKULOCITOV II.....	46
14	MERJENJE MASNE KONCENTRACIJE HEMOGLOBINA V VENSKI KRVI	50
15	MERJENJE MASNE KONCENTRACIJE HEMOGLOBINA V KAPILARNI KRVI.....	55
16	MERJENJE HEMATOKRITA.....	57
17	MERJENJE HITROSTI SEDIMENTACIJE ERITROCITOV.....	60
18	RAČUNSKÉ NALOGE.....	62
19	MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE LEVKOCITOV V VENSKI KRVI S KOMORICO	65
20	MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE LEVKOCITOV V KAPILARNI KRVI S KOMORICO.....	69
21	OGLED MORFOLOŠKO NEPRAVILNIH GRANULOCITOV	72
22	UČENJE TEHNIKE DIFERENCIRANJA OBARVANEGA KRVNEGA RAZMAZA PO CIKCAK SISTEMU - I.....	76
23	UČENJE TEHNIKE DIFERENCIRANJA OBARVANEGA KRVNEGA RAZMAZA PO CIKCAK SISTEMU - II	80
24	MIKROSKOPIRANJE KOSTNEGA MOZGA I.....	83
25	MIKROSKOPIRANJE KOSTNEGA MOZGA II - CELICE RDEČE VRSTE	86
26	DIFERENCIRANJE NEVTROFILIJ	88
27	DIFERENCIRANJE EOZINOFILIJ	90
28	MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE TROMBOCITOV V VENSKI KRVI S KOMORICO.....	92

29	INDIREKTNO MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE TROMBOCITOV V VENSKE KRVI - I	95
30	INDIREKTNO MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE TROMBOCITOV V VENSKE KRVI - II.....	97
31	INDIREKTNO MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE TROMBOCITOV V VENSKE KRVI - III ...	98
32	OGLED CELIC GRANULOCITNE VRSTE IN DIFERENCIRANJE POMIKA V LEVO	101
33	OGLED MONONUKLEARNIH CELIC IN DIFERENCIRANJE.....	106
34	MIKROSKOPIRANJE ODTISNJENCA KOSTNEGA MOZGA	110
35	TESTNA VAJA: DIFERENCIRANJE	112
36	MERJENJE ČASA KAPILARNE KRVAVITVE PO DUKEJU	114
37	MERJENJE AKTIVIRANEGA REKALCIFIKACIJSKEGA ČASA	116
38	MERJENJE PROTROMBINSKEGA ČASA S KOAGULOMETROM	119
39	MERJENJE APTČ S KOAGULOMETROM	123
40	FIBRINOLIZA EVGLOBULINSKEGA STRDKA	125

Datum: _____

1 VARSTVO PRI DELU, NAVODILA ZA DELO, OGLED HEMATOLOŠKEGA LABORATORIJA, PRIBOR IN PIPETIRANJE

1.1 VARSTVO PRI DELU

1. Kemikalije shranjujemo v posebnem prostoru (protipožarna omara).
2. V laboratoriju je prepovedano malicanje, pitje kave in kajenje. Za malico je namenjen poseben prostor, ločen od laboratorija.
3. Laboratorijski delavci so cepljeni proti hepatitisu B.
4. Pri delu je treba nositi zapete delovne halje in primerno obuvalo.
5. Za brisanje rok se uporabljajo le papirnate brisače.
6. Pri odvzemu krvi se uporablja sterilni pribor za enkratno uporabo (gaze, igle, razkužilo v obliki razpršila).
7. Pri delu s kužnim materialom se uporabljajo rokavice za enkratno uporabo. Tudi pri delu z rokavicami je nujna pazljivost, ker niso neprepustne in lahko virusi, ki so zelo majhni, prodirajo skozi pore rokavic.
8. Pri pomivanju steklovine je bolje uporabiti gospodinjske rokavice, ker so debelejšje.
9. Pipetiranje z usti je prepovedano. Pipetiramo lahko le z avtomatskimi pipetami, s pipetorji ali s steklenimi pipetami z žogico za pipetiranje.
10. V laboratoriju mora biti omarica za prvo pomoč.
11. Kužni material, ki vsebuje virus HIV ali virus hepatitisa B, so včasih označevali z rumeno nalepko, kako pa bo v prihodnje, se še niso dogovorili.
12. Z vsem biološkim materialom je treba ravnati, kot da je kužen.
13. Kužni material odlagamo v za to namenjene zabojnike (ne v koš za smeti), enako velja tudi za rabljene kemikalije.

1.2 NAVODILA ZA DELO

1.2.1 Steklovina in drug pribor

Steklovina in drug pribor (nastavki za pipete, zamaški ...) morajo biti kemijsko čisti, ker le čist pribor zagotavlja, da bodo rezultati analiz biološkega materiala točni. Pribor pomivamo z vodo in detergentom, splaknemo z navadno vodo, nato pa še z destilirano vodo. Na koncu posušimo brez brisanja.

Opozorilo

Ne puščajte razbite steklovine v lijaku! Za red in čistočo skrbi vsak dijak sam, za nadzor in red pa so odgovorni reditelji. Ti tudi poskrbijo, da bo po končanih vajah ves pribor pomit in pospravljen na svojih mestih.

Epruvete pred analizo označimo z alkoholnim flomastrom. Označimo jih s številko ali z imenom preiskovanca. Po končanem delu moramo z epruvet odstraniti napis. Odstranimo ga lahko že samo s ščetko za pomivanje epruvet ali pa z vato, namočeno v alkohol. Epruvete v laboratorijih zdravstvenih ustanov imajo večinoma črtno kodo (barkodo).

1.2.2 Reagenti

Preračunano količino reagenta (le toliko, kot ga potrebujemo za analizo) prelijemo v čašo, označeno z alkoholnim flomastrom, da ne bi prišlo do nepotrebnih zamenjav različnih reagentov.

Pogledati je treba rok trajanja reagenta in način shranjevanja.

Liofilizirani reagenti

Liofilizirani reagenti so reagenti v suhi praškasti obliki. Dobijo jih iz raztopin določene koncentracije, ki jim odstranijo vodo pod posebnimi pogoji (pri nižji temperaturi in znižanem tlaku). Zaradi sušenja pri dovolj nizkih temperaturah in ob odsotnosti vode so sestavine liofiliziranih reagentov, kontrolnih serumov in standardov kemijsko in fizikalno stabilnejše od njihovih raztopin.

Liofilizirane reagente raztopimo z destilirano vodo z rahlim obračanjem brez stresanja.

Uporabimo jih lahko šele po določenem času od takrat, ko jih raztopimo, kar je navedeno v navodilih proizvajalca. Raztopljeni reagenti imajo krajši rok trajanja, zato jih ne smemo raztopiti preveč naenkrat.

Postopek liofilizacije

1. Prva faza liofilizacije je zamrzovanje vodne raztopine, pri čemer nastanejo kristali ledu.
2. V drugi fazi odstranijo kristale vode pri znižanem tlaku s sublimacijo.
3. V tretji fazi gre za sušenje pri nizkih temperaturah.

Destilirana in demineralizirana voda

Destilirana in demineralizirana voda ne vsebujeta raztopljenih snovi (kationov, anionov ali nedisociiranih spojin). Zaradi odsotnosti raztopljenih snovi takšna voda ne prevaja električnega toka. Razlika med obema vodama je le v njuni pripravi. Destilirano vodo dobimo s postopkom destilacije, demineralizirano vodo pa s postopkom demineralizacije z ionskimi izmenjevalci. Po določenem času se ionski izmenjevalci nasitijo in jih je potrebno regenerirati s kislinami in bazami.

Izotonične, hipotonične in hipertonične raztopine

Izotonične raztopine imajo enak osmotski tlak oz. enako število raztopljenih snovi (anionov, kationov, molekul) kot telesne tekočine (kri, vsebina krvnih in drugih celic, solzna tekočina). Zaradi tega izotonična raztopina, če jo vnesemo v telo, ne poškoduje celic, ker voda niti ne prodira v celice niti se ne izloča iz njih.

Hipotonične raztopine imajo nižji osmotski tlak oz. manjše število raztopljenih snovi (anionov, kationov, molekul) kot telesne tekočine. Zaradi tega hipotonična raztopina, če jo vnesemo v telo, poškoduje celice, ker voda prodira v celice, da bi se osmotska tlaka izenačila. Celica ne zdrži pritiska vode in poči.

Hipertonične raztopine imajo višji osmotski tlak oz. višje število raztopljenih snovi (anionov, kationov, molekul) kot telesne tekočine. Zaradi tega hipertonična raztopina, če jo vnesemo v telo, poškoduje celice, ker voda prodira iz celic, da bi se osmotska tlaka izenačila. Celica se posuši in propade.

1.2.3 Napake pri delu

Napake pri delu razdelimo na grobe, sistematčne in slučajne napake.

1. Grobe napake: zamenjava vzorcev ali reagentov, neoznačevanje vzorcev, napačen izračun rezultata, uporaba pipet z napačnim volumnom itd.
2. Sistematčne napake: pokvarjeni reagenti, ki imajo pretečen rok uporabnosti, napačno shranjevanje reagentov, tovarniška napaka, napake pri merilnih instrumentih, netočnost pipet itd.
3. Slučajne napake: nezadostno mešanje zmesi vzorca in reagenta, nenatančno pipetiranje itd.

1.2.4 Pipete in pipetiranje

Pipetiramo lahko s klasičnimi steklenimi pipetami, z avtomatskimi pipetami ali s pipetorji. Pipete kažejo točen volumen le, če ima tekočina, ki jo pipetiramo, sobno temperaturo oziroma najpogosteje temperaturo 20 °C. Poleg temperature in volumna mora imeti pipeta tudi oznako, ki nam pove, ali je treba tekočino po napolnitvi pipete do konca izprazniti (izpihati), ali pa jo pustimo, da sama izteče iz pipete in v njej ostane še določen preračunan volumen tekočine. Takšne oznake na pipetah so angleške kratice IN, EX, TC ali TD.

Oznake IN, EX, TC, TD na steklenih pipetah

Oznaki IN in TC pomenita, da je treba vsebino pipete izpihati. Pravi je tisti volumen, ki je v pipeti. Angleška beseda **IN** v slovenskem jeziku pomeni **v**. Kratica **TC** izhaja iz angleške besede »**to contain**« in pomeni **vsebovati**. Oznaki EX in TD pomenita, da moramo tekočino pustiti, da sama izteče iz pipete, v pipeti pa ostane določen stalni volumen, ki se ga ne sme izpihati in ni vračunan v volumen, ki piše na pipeti. Angleška beseda **EX** pomeni v slovenskem jeziku **iz**, kratica **TD** pa izhaja iz angleške besede »**to discard**« in pomeni **zavreči**.

Pipetiranje z avtomatskimi pipetami

Večina avtomatskih pipet ima dve stopnji pipetiranja iz razloga, da lahko iz pipete iztisnemo tudi zadnjo kapljico tekočine podobno kot pri steklenih pipetah z oznako IN, ko moramo zadnjo kapljico izpihati šele z usti. Ko pipetiramo, moramo tekočino povleči samo do prve stopnje, da ne dobimo napačnega volumna.

Vsebine z avtomatsko pipeto ne smemo potegniti prehitro, ker lahko del tekočine prodre v notranjost pipete in jo onesnaži, pipeta pa se sčasoma zamaši. Ne smemo pozabiti, da so onesnažene pipete s kužnim materialom tudi vir okužbe. Zato je treba avtomatsko pipeto po končanem delu, pogosto pa tudi že med samim delom, očistiti in razkužiti z etanolom.

Paziti moramo, da nastavki za pipetiranje niso zamašeni, da ni zamašena odprtina v pipeti in da pipeta ne pušča. Pipete, ki imajo nameščene steklene kapilare, nimajo dveh stopenj pipetiranja, ker se iz njih iztisne vsa vsebina. Te pipete moramo na koncu izplakniti z destilirano vodo in vodo pustiti v notranjosti kapilare do naslednje uporabe.

Ker je kri suspenzija celic v plazmi, jo je treba pred pipetiranjem dobro premešati. Po dodatku reagenta in tik pred meritvijo zmes ponovno premešamo.

Delo

1. Oglejte si hematološki laboratorij in zapišite, kje je shranjen posamezen pribor oz. material.
 2. Oglejte si in zapišite, kje dobimo demineralizirano vodo.
 3. Oglejte si in narišite klasično lanceto in polnilno pipeto z volumnom 4975 μL .
 4. Oglejte si merilno pipeto.
 5. Oglejte si komorico za štetje krvnih celic.
 6. Pipetirajte destilirano vodo s klasično stekleno pipeto z žogico za pipetiranje in ob upoštevanju oznak IN, EX, TC oz. TD.
 7. Pipetirajte destilirano vodo z avtomatskimi pipetami ob upoštevanju navodil pipetiranja z avtomatskimi pipetami.
-

Rezultati

1. Pribor in material v hematološkem laboratoriju

Reagente shranjujemo

Posodice za barvanje krvnih razmazov, predmetna stekla, brušena krovna stekla in stekla z vdolbinicami za ugotavljanje krvnih skupin shranjujemo

Epruvete shranjujemo

Žogice za pipetiranje, steklene palčke, pincete shranjujemo

2. Demineralizirano vodo dobimo

3. Slika klasične lancete: Slika polnilne pipete (za pipetiranje 4975 μL Hayemovega reagenta, ki je reagent za redčenje krvi pred štetjem eritrocitov v komorici):



Domača naloga

1. Napišite po dva primera grobe napake, sistematične napake in slučajne napake.

.....

.....

.....

2. Kako so laboratorijski delavci zaščiteni pred virusom hepatitisa B in virusom HIV?

.....

.....

3. Kaj pomeni rumena nalepka na laboratorijskem izvidu ali na biološkem materialu?

.....

4. Kaj pomenijo oznake EX in IN na klasičnih pipetah? Ali so te oznake tudi na drugem merilnem priboru (graduiranih čašah, merilnih bučkah in merilnih valjih)?

.....

.....

.....

5. V čem se razlikujeta merilna in polnilna pipeta?

.....

.....

6. Kako pravilno pipetiramo z avtomatsko pipeto z nastavki? Razložite odgovor.

.....

.....

.....

.....

7. Zakaj se lahko avtomatska pipeta zamaši? Kako to preprečimo?

.....

.....

.....

8. Ali je lahko avtomatska pipeta vir okužbe? Razložite odgovor.

.....

.....

.....

9. Zakaj moramo steklovino na koncu spirati z destilirano vodo? Katere napake se lahko zgodijo, če steklovina ni dobro sprana?

.....
.....

10. Kakšna je razlika med destilirano in demineralizirano vodo?

.....
.....

11. Kaj je graduirani laboratorijski pribor?

.....

12. Kako čistimo pipete?

.....
.....
.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

2 KAPILARNI ODVZEM KRVI S KLASIČNO LANCETO

Teoretične osnove

Kapilarno kri je smiselno jemati takrat, kadar potrebujemo majhen volumen krvi.

Vzorec krvi lahko dobimo s kapilarnim odvzemom na naslednjih vbodnih mestih:

- lateralna in medialna površina stopala,
- plantarna površina palcev na nogi,
- palmarne površine zadnjega segmenta prstov na roki.

Odvzem iz ušesne mečice ni priporočljiv.

Pri starejših otrocih in pri odraslih običajno jemljemo vzorec iz palmarne površine zadnjega segmenta prstov na roki.

Če potrebujemo krvne vzorce za različne preiskave, odvzamemo najprej vzorec krvi za hematološke preiskave v epruvete z EDTA. Tako zagotovimo zadostno količino krvi in s tem pravilne hematološke rezultate. Nato je na vrsti krvni vzorec s katerim drugim aditivom in šele nazadnje kri za serumski vzorec. Kri, odvzeto v epruveto z antikoagulantom, moramo takoj po odvzemu dobro premešati tako, da epruveto od 8- do 10-krat obrnemo na glavo. Nato jo še pretresemo, kakor bi zbijali termometer, in s tem odstranimo ostanke krvi pod zamaškom.

Za pripravo krvnega razmaza prenesemo kri neposredno iz vbodne površine na čisto površino objektnega stekla.

Pri odvzemu kapilarne krvi lahko pride do hemolize, ki jo povzroči ostanek alkohola na koži, premočno stiskanje okolice vbodnega mesta in krhkost eritrocitov. Rezultati hemoliziranih vzorcev so napačni. Kri hemolizira v hipotonični raztopini, v izotonični pa ne.

V novejšem času izvajamo vbod z mikrolancetami, ker je preprosteje in globina vboda ni odvisna od osebe, ki vbod izvaja. Včasih je še vedno potreben kapilaren vbod s klasično lanceto. V tem primeru je še posebno pomembno, da dobro poznamo tehniko kapilarnega odvzema krvi.

Po uporabi odvržemo lancete v posebne zbiralnike (plastične, kovinske ali iz trdega kartona), ki so običajno rdeče barve in so označeni z oznako »biohazard«.¹

Pribor:

- klasična lanceta, rokavice za enkratno uporabo,
- pipetor in sterilne kapilare ali mikrokoklektor s kapilaro,
- staničevina, sterilne gaze ali vata,
- razkužilo (70–80 % etanol),
- destilirana voda,
- fiziološka raztopina (raztopina NaCl s konc. 9 g/L oz 0,9 % = izotonična raztopina),

¹ Oznaka je v skladu z navodili NCCLS.

- centrifugirka, alkoholni flomaster, stojalo za epruvete,
- avtomatska pipeta (od 1 do 5 mL), pipetor (od 1 do 5 mL),
- zbirnik za rabljene lancete in kapilare.

Postopek jemanja kapilarne krvi iz palmarne površine zadnjega segmenta prsta na roki

Vzorec kapilarne krvi jemljemo s sterilnim priborom za enkratno uporabo.

Običajno kapilarno kri jemljemo iz prstanca. Izogibamo se vbodu v mezinec. Konico prsta zmasiramo, da povečamo prekrvavitev (prst lahko tudi segrejemo pod toplo vodo).

Če prst ni dovolj prekrvavljen ali je osebo, ki daje kri strah, kri ne bo tekla. V primeru prenežnega vboda bo kri slabo tekla in krvavitev se bo prehitro ustavila. Če kri ne teče, včasih pomaga, da obrnemo prst za nekaj časa navzdol.

Pred mestom vboda s stiskom prsta napnemo kožo, na gazo naneseemo razkužilo in mesto vboda razkužimo z enkratnim potegom. Počakamo, da se razkužilo posuši. Če se razkužilo ne posuši, pride le-to v stik s krvjo in lahko pride do hemolize.

Opozorilo

Pomembno je, da vbodemo na pravo mesto in s primerne razdalje. Vbosti moramo v sredino zadnjega segmenta prsta, ker je tu tkivo dvakrat debelejše kot na konici prsta ali ob strani. Paziti moramo, da ne poškodujemo kosti prsta. Vbodno mesto ne sme biti oteklo ali poškodovano.

Po vbodu prvo kapljico krvi obrišemo, ker vsebuje preveč medceličnine.

Nato kri zbiramo v mikrokolektor ali pa jo odmerimo v razredčevalno tekočino. Če jo odmerimo v tekočino, moramo kapilaro neposredno potopiti v njo. Ko iztisnemo iz kapilare vso kri, pipeto splaknemo z isto tekočino. Na ta način odmerjeno kri kvantitativno prenesemo.

Opozorilo

Če krvi takoj ne iztisnemo iz kapilare, bo zaradi hrapave površine kapilare koagulirala že v njej.

Pri nepravilnem pipetiranju krvi pridejo v kapilaro zračni mehurčki, zato jih moramo sproti odstranjevati, ker v nasprotnem primeru odmerjen volumen krvi ne bo pravi. Če mehurčkov ne odstranimo, bo v podaljšek kapilare (gumijasto cevko) prišla kapilarna kri, ki jo moramo po končanem pipetiranju iz cevke odstraniti tako, da jo splaknemo z destilirano vodo, nato pa razkužimo z alkoholom.

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
2. Z zobotrebcom določite mesto odvzema krvi iz prsta.
3. V označeno centrifugirko s pipetorjem pipetirajte 3 mL fiziološke raztopine, s pipeto pa enako količino demineralizirane vode. Polovica skupine naj pipetira fiziološko raztopino, druga polovica pa demineralizirano vodo.
4. Povečajte prekrvavitev prsta in razkužite vbodno mesto.

5. Pravilno odstranite zaščitni papir s klasične lancete in pravilno vbodite v konico prsta. Prvo kapljico krvi obrišite.
 6. S sterilno kapilaro s pomočjo pipetorja pipetirajte 25 μL krvi in jo iztisnite v tekočino.
 7. Vsebino premešajte in centrifugirajte 5 minut pri 3000 vrt./min ali shranite v hladilniku. Iz cevke pipetorjev odstranite ostanke krvi.
 8. Napišite rezultat in ga ovrednotite.
-

Rezultat, izkušnje pri delu in razlaga rezultata po centrifugiranju odvzete krvi oziroma če ste pustili kri stati v hladilniku

Na katere težave ste naleteli pri izvedbi vaje? Kakšne barve je tekočina nad usedlino? Razložite pojav.

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

3 KAPILARNI ODVZEM KRVI Z MIKROLANCETO

Teoretične osnove

Vbod z mikrolanceto je preprostejši in ni odvisen od moči vboda. Vseeno moramo paziti, kam vbodemo in da pri tem roke ne odmaknemo v stran.

Poznamo različne vrste mikrolancet, odvisno od proizvajalca. Vse so, tako kot tudi klasične lancete, za enkratno uporabo. Tehnika dela z njimi je odvisna od vrste posameznih.

Pribor:

- mikrolanceta, pipetor, sterilne kapilare,
- staničevina, sterilne gaze ali vata,
- razkužilo (70–80 % etanol), centrifugirka, stojalo za epruvete, alkoholni flomaster,
- avtomatska pipeta (od 1 do 5 mL), pipetor (od 1 do 5 mL),
- destilirana voda, fiziološka raztopina,
- zbiralnik za rabljene lancete in kapilare.

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
 2. Ponovite, kako jemljemo kapilarno kri.
 3. V označeno centrifugirko s pipetorjem pipetirajte 3 mL fiziološke raztopine, s pipeto pa enako količino demineralizirane vode. Polovica skupine naj pipetira fiziološko raztopino, druga polovica pa demineralizirano vodo.
 4. Povečajte prekrvavitev prsta in razkužite vbodno mesto.
 5. Z mikrolanceto vbodite v konico prsta in prvo kapljico krvi obrišite.
 6. Pipetirajte 25 μ L krvi v tekočino, vsebino premešajte in centrifugirajte 5 minut pri 3000 vrt./min. Iz cevke pipetorjev odstranite ostanke krvi.
 7. Napišite rezultat in ga ovrednotite.
-

Rezultat, izkušnje pri delu, in razlaga rezultata po centrifugiranju odvzete krvi

Na katere težave ste naleteli pri izvedbi vaje? Kakšne barve je tekočina nad usedlino (supernatant) po centrifugiranju razredčene krvi? Razložite pojav.

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:



Domača naloga

1. Kaj je supernatant? Navedite nekaj primerov.

.....

2. Kaj je hipotonična raztopina? Navedite primer. Kaj bi se zgodilo z eritrociti v hipotonični raztopini?

.....

3. Kaj je izotonična raztopina? Navedite primer. Kaj bi se zgodilo z eritrociti v izotonični raztopini?

.....

4. Kaj je hipertonična raztopina? Navedite primer. Kaj bi se zgodilo z eritrociti v hipertonični raztopini?

.....

5. Na kaj moramo paziti, preden začnemo centrifugirati?

.....

6. Kaj se zgodi, če pustimo kri predolgo v kapilari? Razložite odgovor.

.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

4 PRIPRAVA NA VENSKI ODVZEM KRVİ, PRIPRAVA IN POLNJENJE KOMORICE ZA ŠTETJE KRVNIH CELIC

4.1 PRIPRAVA NA VENSKI ODVZEM KRVİ

Teoretične osnove

Vensko kri jemljemo iz ven, ki so najlažje dostopne, dovolj debele in niso premakljive. Temu najbolj ustreza kubitalna vena. V večini primerov je kubitalna vena vidna, če namestimo žilno prevezo in stisnemo pest. Pacienta pripravimo za odvzem krvi, pripravimo si ves pribor in izvedemo odvzem. Pri vbodu je pravilno, da je igla obrnjena s poševno stranjo navzgor. Iglo privijemo na plastični nosilec. Plastični nosilec je poseben nosilec, v katerega pred odvzemom krvi vstavimo posebno dvostransko iglo. Nosilec ni sterilen. Uporablja se lahko za odvzem krvi pri več bolnikih. Čistimo in steriliziramo ga po potrebi. Podvezo odstranimo že takrat, ko kri še teče, nato odstranimo in premešamo epruveto in šele nazadnje odstranimo iglo ter poskrbimo za ranico.

Pribor:

- pribor za vakuumski odvzem krvi (igla, plastični nosilec in vakuumirana epruveta),
- žilna preveza,
- razkužilo,
- sterilna vata ali tamponi.

Delo

1. Pripravite ves pribor.
 2. Privijte iglo na plastični nosilec.
 3. Določite mesto odvzema krvi.
 4. Demonstrirajte odvzem venske krvi tako, da vadite gibe pred in po vbodu v žilo.
 - a. Namestite žilno prevezo in otipajte žilo (pest mora biti stisnjena).
 - b. Pravilno nanesite razkužilo na sterilno gazo in mesto razkužite z enkratnim krožnim potegom.
 - c. Počakajte, da se razkužilo posuši in pravilno nastavite iglo (vzporedno z žilo, luknjica je obrnjena navzgor). Z drugo stranjo igle preluknjajte epruveto.
 - d. Odstranite prevezo.
 - e. Odstranite in premešajte epruveto.
 - f. Demonstrirajte, kako izvlečemo iglo in na vbodno mesto istočasno položimo sterilni tampon.
-

4.2 PRIPRAVA IN POLNJENJE KOMORICE ZA ŠTETJE KRVNIH CELIC

Teoretične osnove

Zavedati se moramo, da za štetje posameznih krvnih celic uporabljamo različne komorice. Za štetje krvnih celic v krvi lahko uporabljamo Neubauerjevo ali Bürker-Türkovo komorico, za štetje krvnih celic v likvorju pa Fucks-Rosenthalovo komorico. Komorica in brušeno krovno steklo za pokrivanje komorice morata biti čista.

Pribor in material:

- komorica za štetje krvnih celic, brušeno krovno steklo, pipetor, kapilare, čaše,
- destilirana voda, obarvana raztopina (raztopina CuSO_4), mikroskop.

Pokrivanje in polnjenje komorice (navodilo)

Brušeni strani komorice pred pokrivanjem narahlo navlažimo z destilirano vodo. Ne sme je biti preveč, da ne pride na mrežico. S palcema pritrdimo brušeno krovno steklo, tako da ga vlečemo od spodaj navzgor. Steklo se mora tesno prilegati in pokriti morata biti obe mrežici. Na koncu je treba preveriti, ali steklo dobro tesni. Na obeh robovih komorice se mora pokazati mavrica, imenovana tudi Newtonovi krogi. Komorico napolnimo s kapilaro ali pipeto pod robovoma brušenega stekla. Polnimo vsako mrežico posebej. Paziti moramo, da v komorici ni zračnih mehurčkov.

Opozorilo

Neustrezna priprava komorice in neustrezno polnjenje vplivata na točnost rezultata. V komorico ne sme priti voda, ki jo uporabljamo za navlaženje robov. Steklo na komorici ne sme drseti, če se ga dotaknemo s prstom. Pred štetjem celic v komorici moramo preveriti, ali je komorica napolnjena do robov krovnega stekla in ali ni vmes zračnih mehurčkov.



Slika 1. Bürkerjeva komorica (hemocitometer).

Delo

1. Makroskopsko si oglejte komorico za štetje krvnih celic.
2. Izpišite si oznake na objektivih mikroskopa.
3. Nepokrito mrežico komorice si oglejte pod mikroskopom z upoštevanjem navodil mikroskopiranja pri suhi povečavi. Natančno si oglejte kvadratke, kjer štejemo eritrocite (trombocite) in levkocite. Na začetku si komorico oglejte pri najmanjši povečavi, nato pa povečavo večajte do 400-kratne povečave.
4. Pokrijte komorico z brušenim krovnim steklom (glejte navodila) in s kazalcem preverite, ali steklo tesni in ali se pojavijo Newtonovi krogi.

5. S kapilaro ali pipeto napolnite komorico z obarvano tekočino skozi režo in pazite, da ne pridejo v njo zračni mehurčki.
-

Oznake objektivov:

Odgovorite na vprašanja

1. Opišite mikroskopiranje s suho povečavo.
 - a. Kateri objektiv (napišite njihovo povečavo) so namenjeni mikroskopiranju s suho povečavo?
.....
 - b. Katera je največja suha povečava?
 - c. Katerih delov mikroskopa ne smemo premikati?
 - d. S katero povečavo začnemo mikroskopirati, da ne poškodujemo objektivov ali komorice?
.....
 - e. Ali je kondenzor pri najmanjši povečavi, 100- in 200-kratni povečavi, dvignjen ali spuščen?
.....
 - f. Kolikšna je na začetku (še pred mikroskopiranjem) razdalja med mizico mikroskopa in objektivom potem, ko smo že vstavili preparat v mizico?
.....
 - g. Kako reguliramo osvetlitev mikroskopa?
1. Opišite mikroskopiranje z imerzijsko povečavo.
 - a. Kaj piše na objektivu z imerzijsko povečavo?
 - b. Navedite oba načina, s katerima poiščemo in izostrimo sliko.
.....
.....
 - c. Zakaj je potrebno imerzijsko olje oziroma kakšna je njegova vloga?
 - d. V kakšnem položaju je kondenzor pri imerzijski povečavi? (Vlogo kondenzorja lahko ima pri nekaterih mikroskopih reža pod mizico mikroskopa.)

.....
e. Kako iz preparatov in mikroskopa odstranimo imerzijsko olje?
.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

5 OGLED HEMATOLOŠKEGA LABORATORIJA IN VENSKI ODVZEM KRVI

Teoretične osnove

Učenje venskega odvzema krvi se lahko izvaja le pod nadzorom izkušenega strokovnjaka. Zaenkrat večinoma še vedno jemljejo vensko kri laboratorijski tehniki, ki morajo zelo dobro poznati odvzem venske krvi tako teoretično kot praktično. Laboratoriji za odvzem krvi morajo biti zračni, svetli, ustrezno opremljeni, v bližini mora biti tudi zdravnik, ki lahko, če postane bolniku slabo, nudi prvo pomoč.

Vbod moramo izvajati vzporedno z žilo, ne pa tako, kot je napačno prikazano v nekaterih filmih. Podvezo lahko odvežemo že takrat, ko kri še teče. Ko je epruveta napolnjena s krvjo, jo takoj premešamo, šele nato izvlečemo iglo in istočasno na vbodno mesto namestimo sterilni tampon.



Slika 2. Prikaz odvzemnega mesta krvi v laboratoriju.

Pribor:

- pribor za vakuumski odvzem krvi (igla z nastavkom in vakuumirana epruveta),
- podveza, razkužilo, sterilna vata ali tamponi.

Ime in priimek:



Domača naloga

1. Kdaj po odvzemu krvi nastane hematoma?
.....
.....
2. Kaj se zgodi, če krvi takoj po odvzemu ne premešamo? Razložite odgovor.
.....
.....
.....
3. Kaj je hemoliza in kdaj lahko nastane?
.....
.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

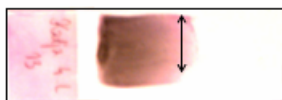
6 PRIPRAVA KRVNEGA RAZMAZA POD KOTOM

Teoretične osnove

Pravilno izdelan krvni razmaz mora imeti v najtanjšem delu redko posejane eritrocite (v otočkih), temu sledi pas celic s »pravo gostoto«, ki mora biti čim širši, ves preostali del razmaza pa zavzema pregosti del. Analiziramo le obarvane krvne razmaze. Barvamo jih za diferencialno krvno sliko in za opazovanje celic (zlasti malignih) po predhodnem citokemičnem barvanju. Celice opazujemo v »pravi gostoti«, kjer so eritrociti razločno vidni in nanizani drug zraven drugega brez večjih otočkov. V pregostem delu razmaza se eritrociti prekrivajo, zato ne moremo opazovati njihove morfologije, morfologija levkocitov pa je popačena.

Idealen krvni razmaz mora biti homogen, na koncu zaobljen, prave dolžine (ne predolg in ne prekratek), na začetku gost in na koncu tanek. Meja med gostim in tankim delom razmaza mora biti vidna tudi s prostim očesom.

Vakuoliziran krvni razmaz je posledica nečistih predmetnih stekel, kar vpliva na kvaliteto barvanja. Na kvaliteto barvanja vpliva tudi pH stekel in nepravilno sušenje ter shranjevanje razmazov.



Slika 3. Mesto, kjer moramo mikroskopirati.

Pribor in material:

- venska kri, stojalo za epruvete, rokavice za enkratno uporabo,
- razmaščena objektna stekla, brušeno objektno ali krovno steklo,
- staničevina, vata, 70–80 % etanol, mikropipetor in kapilare,
- navaden svinčnik za oznako objektnih stekel,
- plinski gorilnik, plastični pladenj za shranjevanje krvnih razmazov.

Številka vzorca:

Navodilo za pripravo krvnega razmaza

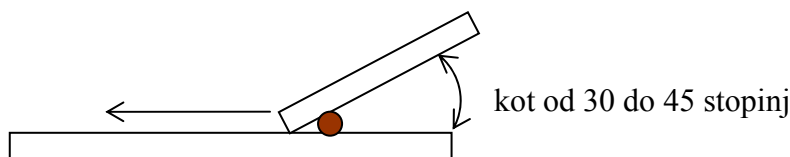
Kapljico premešane venske krvi, ki mora imeti primeren volumen, kanemo na začetek objektnega stekla malo stran od roba. Predmetna stekla morajo biti popolnoma čista in razmaščena. Rob brušenega (razmaznega) stekla postavimo pred kapljico, potegnemo nazaj, da se kapljica razporedi po celem robu, in na hitro potegnemo pod kotom od 30 do 45 stopinj z desne proti levi (če smo desničarji). Objektno steklo lahko držimo v roki ali pa delamo razmaz na mizi. Po vsakem razmazu moramo odstraniti kri z roba razmaznega stekla. Na

koncu moramo krvni razmaz primerno označiti, ga posušiti na zraku in šele tak je primeren za barvanje.

Sušenje in shranjevanje krvnih razmazov

V praksi se krvni razmazi sušijo do ene ure, spodnja meja časa sušenja pa je odvisna od temperature in vlažnosti okolja. Če krvni razmaz ni pravilno posušen na zraku, se neenakomerno obarva. Najbolje se obarva, če ga sušimo od štiri do pet ur, nekateri avtorji pa priporočajo celo 24-urno sušenje.

Nepobarvane razmaze lahko ohranimo dalj časa, če jih predhodno fiksiramo 30 minut v absolutnem metanolu. Namesto metanola lahko uporabimo sterilni etanol s koncentracijo najmanj 75 %. Svetujemo, da s fiksiranjem razmazov ne čakamo več kot pet ur po izdelavi.



Slika 4. Priprava krvnega razmaza pod kotom.

Delo

1. Pripravite ves pribor in razmastite objektna stekla z alkoholom. Po večkratni uporabi razmastite stekla tudi v plamenu plinskega gorilnika.
2. Po eno kapljico premešane krvi pipetirajte na več objektnih stekel. Volumen kapljice je cca. 10 μL .
3. Izdelajte razmaze pod kotom, izberite dva najboljša, ju posušite, označite in shranite na suhem do naslednje vaje.
4. Preverite pravo gostoto celic pod suho povečavo mikroskopa (kriterij naj bo ogled dveh pasov vidnih polj pod 100-kratno povečavo).
5. Napišite rezultat.

Rezultat in izkušnje pri delu

1. Koliko razmazov je bilo potrebnih za izdelavo idealnega razmaza in kateri so bili vzroki neuspešnih razmazov?

.....

.....

2. Ocena gostote razmaza, mikroskopiranega pri 100-kratni ali 200-kratni povečavi, če pregledamo dva pasova vidnih polj po širini razmaza (obkrožite primeren odgovor):

- a. razmaz ima dovolj širok del prave gostote
- b. razmaz je pregost

- c. razmaz prehitro prehaja iz redkega dela v pregosti del
- d. razmaz je stopničast
- e. razmaz ima repke
- f. drugo

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

7 BARVANJE KRVNIH RAZMAZOV PO PAPPENHEIMU

Skupinska vaja

Teoretične osnove

Krvne celice, zlasti levkocite, lahko med seboj ločimo le, če jih obarvamo. Uveljavilo se je barvanje po Pappenheimu, imenovano tudi barvanje z May-Grünwald-Giemso.

Reagenti za barvanje po Pappenheimu vsebujejo kislina in bazična barvila, ki obarvajo posamezne sestavine celic, kot so: jedro, citoplazma, jedrca in granulacije.

Beseda bazofilno pomeni, da se kisle sestavine celice obarvajo z bazičnimi barvili. V prenesenem pomenu pomeni bazofilna barva modro, modrovijolično ali vijolično. Beseda acidofilno pomeni, da se bazične sestavine celice obarvajo s kislimi barvili, njihova obarvanost pa je rdečkasta oziroma oranžna.

Obarvane krvne razmaze lahko zaščitimo tako, da jih pokrijemo in prelepimo s krovnim steklom ali pa uporabimo polistirenski oziroma smolni razpršilec.

Reagenti, ki jih uporabljamo v metodi po Pappenheimu, so: May-Grünwaldov reagent, razredčen fosfatni pufer in razredčena raztopina Giemse.

May-Grünwaldov reagent uporabljamo nerazredčen. Razredčeni fosfatni pufer pripravljamo tik pred barvanjem z razredčitvijo koncentriranega fosfatnega pufra z demineralizirano vodo v razmerju 1 : 20. Tudi razredčeno raztopino Giemse pripravimo tik pred barvanjem tako, da koncentrirano raztopino Giemse razredčimo z razredčenim fosfatnim puferom v razmerju 1 : 20.

Če je pH prenizek, se bazofilne komponente (jedro, ribosomi v citoplazmi) slabo obarvajo, levkociti so blede, eozinofilne granulacije pa so močno poudarjene. Če je pH previsok, težko ločimo med normalnimi in polikromatskimi eritrociti, eozinofilne granulacije so modre ali temno sive, granulacije normalnih nevtrofilnih granulocitov pa so močno obarvane, kot bi šlo za toksične granulacije.

Pribor in material:

- krvni razmazi, narejeni v predhodni vaji,
- posodice z nosilnimi stojali in pokrovi za barvanje krvnih razmazov,
- May-Grünwaldov reagent, reagent po Giemsi, koncentrirani fosfatni pufer s pH 6,8,
- destilirana voda, vodovodna voda,
- čaše, merilni valji, avtomatska pipeta (od 1 do 5 mL),
- staničevina.

Reagenti

Priprava koncentriranega fosfatnega pufra (0,66 mol/L, pH 6,8)

Raztopina A: 1,19 g dinatrijevega hidrogenfosfata dihidrata raztopimo v majhnem volumnu demineralizirane vode in dopolnimo z njo do 100 mL.

Raztopina B: 0,91 g kalijevega dihidrogenfosfata raztopimo v majhnem volumnu demineralizirane vode in dopolnimo z njo do 100 mL.

Zmešamo 49,2 mL raztopine A in 50,8 mL raztopne B ter umerimo pH na vrednost 6,8.

Delovni raztopini: raztopina 1 in raztopina 2

Raztopina 1 je razredčeni fosfatni pufer v razmerju 1 : 20. Uporablja se za pripravo razredčene raztopine Giemse in za spiranje razmazov. Pripravimo jo iz enega dela koncentriranega pufra in devetnajstih delov vode. Preverimo pH in če ni 6,8, ga z dodatkom kisline ali baze naravnamo na to vrednost.

Raztopina 2 je z razredčenim fosfatnim pufrom razredčeni reagent po Giemsi v razmerju 1 : 20. Pripravimo jo iz enega dela koncentriranega reagenta po Giemsi in devetnajstih delov razredčenega fosfatnega pufra (raztopine 1).

Postopek barvanja po Pappenheimu

Pred pričetkom barvanja si pripravimo delovni raztopini 1 in 2 (razredčen fosfatni pufer in razredčena raztopina Giemse).

V vsako od treh posodic nalijemo raztopine:

- I. posodica: May-Grünwaldov reagent,
- II. posodica: razredčen fosfatni pufer (raztopina 1),
- III. posodica: razredčena raztopina Giemse (raztopina 2).

V nosilno stojalo vstavimo posušene krvne razmaze in stojalo potopimo v:

I. posodico za 3 minute, II. posodico za 3 minute, III. posodico za 20 minut.

Spiramo pod tekočo vodo in posušimo na zraku v navpičnem položaju.

⚡ Opozorilo

Barvila za barvanje krvnih razmazov so derivati anilina in zato zelo strupena. Zlasti strupen je May-Grünwaldov reagent, ki je metanolna raztopina barvil. Barvil zato ne smemo vdihovati, med barvanjem pa morajo biti posodice za barvanje pokrite. Barvila shranjujemo v dobro zaprtih steklenicah pri sobni temperaturi.

Delo

1. Pripravite ves pribor, material in reagente.
 2. Pripravite preračunan volumen razredčenega fosfatnega pufra in razredčene raztopine po Giemsi (v posodice za barvanje gre približno 200 mL tekočine).
 3. Nalijte v posodice ustrezne raztopine in barvajte razmaze po predpisanem postopku.
 4. Obarvane in dobro sprane razmaze posušite na zraku v navpičnem položaju in jih pospravite, zaščitene pred prahom, do naslednje vaje.
-

Pripravili bomo mL razredčenega fosfatnega pufra.

Odmerili bomo mL konc. pufra in mL destilirane vode.

Račun:

Pripravili bomo mL razredčene Giemse.

Odmerili bomo mL konc. Giemse in mL razredčenega fosfatnega pufra.

Račun:

Aktivnosti pri vaji

Med vajo sem opravil/a naslednja dela:

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:



Domača naloga

1. Kako označujemo krvne razmaze? S katerim pisalom jih ne smemo označiti? Razložite odgovor.

.....

.....

2. Kako ohranimo krvne razmaze dalj časa?

3. Kakšen bo krvni razmaz, če kri vlečemo prepočasi?

.....

4. Kakšno vlogo ima pri barvanju metanol?

5. Katera so kisla in katera bazična barvila?

.....

.....

6. Katere dele celic obarvajo posamezna barvila?

.....

.....

7. Kakšno vlogo ima pri barvanju pH?

-
8. Ali na kakovost barvanja vpliva čas?
9. Kaj praktično pomenita razredčitvi 1 : 20 in 1 + 19?
-
10. Kolikšen pH mora imeti fosfatni pufer? Kako bi ga uravnali?
-
11. Koncentrirano kislino moramo razredčiti v razmerju 1 : 200. Pripraviti moramo 800 mL razredčene raztopine? Kolikšen volumen koncentrirane kisline in kolikšen volumen vode moramo odmeriti?

Račun:

Odmeriti moramo

Pregledal/a:

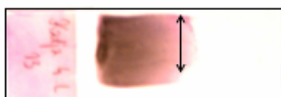
Opombe:

Datum: _____

8 MIKROSKOPIRANJE LASTNIH KRVNIH RAZMAZOV

Teoretične osnove

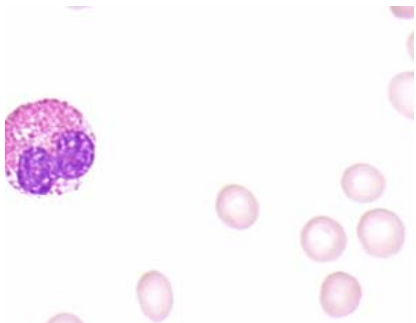
Krvne razmaze mikroskopiramo z imerzijsko povečavo. Mikroskopiramo v najtanjšem delu razmaza (slika 10), kjer se glede gostote ravnamo po eritrocitih.



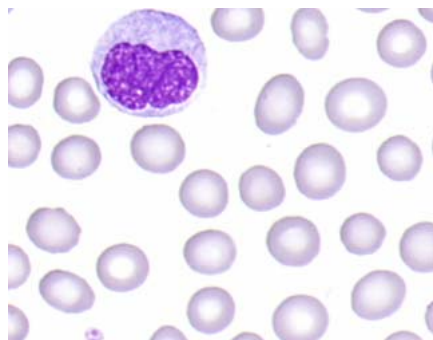
Slika 5. Prikaz enega pasu širine razmaza.

Eritrociti morajo biti enakomerno razporejeni po celotnem vidnem polju drug zraven drugega, ne smejo se prekrivati, med njimi pa tudi ne sme biti prevelikih praznih prostorov (otočkov). Velikost vseh celic vedno primerjamo z velikostjo eritrocita. Obarvanost celic primerjamo med seboj. Če se ne moremo odločiti, za katero celico gre, si moramo ogledati še druge celice (več vidnih polj).

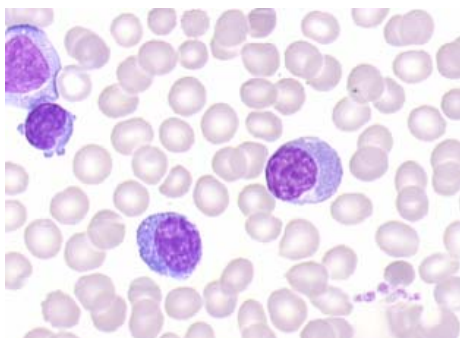
Pri prikazu krvnih celic se orientiramo glede na številčnice na uri.



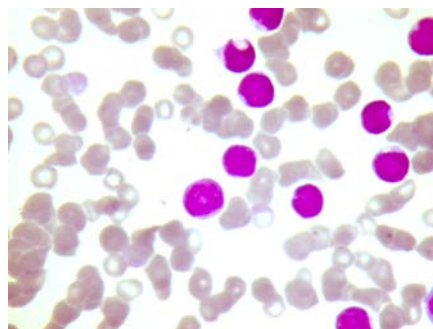
Slika 6. Preredek del razmaza.



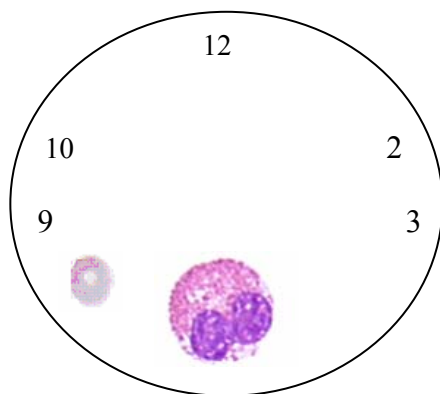
Slika 7. Prava gostota.



Slika 8. Začetek pregostega dela razmaza.



Slika 9. Pregost del razmaza.



Slika 10. Eozinofilec na številki šest, eritrocit na številki osem.

Pribor in material:

- obarvan krvni razmaz od predhodne vaje, barvice,
- mikroskop in pribor za mikroskopiranje.

Delo

1. Na najtanjši del najbolj izdelanega obarvanega krvnega razmaza kanite kapljico imerzijskega olja in poiščite sliko pod imerzijsko povečavo. Poiščite pravo gostoto celic, preredek del in pregost del razmaza. Primerjajte najdena vidna polja mikroskopa s slikami 6, 7, 8 in 9.
 2. Ocenite kakovost gostote razmaza.
 3. Ocenite kakovost obarvanosti posameznih celic v razmazu.
 4. Poiščite nevtrofilec in ga vstavite v center vidnega polja razmaza. Narišite ga.
 5. Poiščite trombocit in ga vstavite na številko dvanajst vidnega polja razmaza. Narišite ga.
 6. Poiščite limfocit in ga vstavite na številko deset vidnega polja razmaza. Narišite ga.
 7. Poleg vseh celic zaradi primerjave velikosti narišite tudi eritrocit.
 8. Na podlagi predhodnih ocen ovrednotite kakovost razmaza.
-

Rezultati

Ad 2.

Ocena kakovosti gostote razmaza v najtanjšem delu razmaza (obkrožite):

- a. razmaz ima širši del prave gostote (kriterij je 8 pasov vidnih polj širine razmaza)
- b. razmaz je pregost
- c. razmaz hitro prehaja iz redkega dela v pregosti del
- d. drugo:

Ad 3

I Ocena obarvanosti citoplazme limfocitov:

- a. svetlo modra
- b. temno modra
- c. brezbarvna
- d. drugo:

II Ocena obarvanosti eritrocitov:

- a. rožnata
- b. sivkasta
- c. modrikasta
- d. drugo:

III Ocena intenzitete obarvanosti jeder levkocitov (nevtrofilcev, limfocitov ali monocitov):

- a. slabo obarvana (difuzna)
- b. dobro obarvana

IV Ocena intenzitete obarvanosti trombocitov:

- a. slabo obarvani
- b. dobro obarvani

Prikaz posameznih celic

Nevtrofilce prepoznamo po tem, da imajo segmentirano jedro.



Nevtrofilec in eritrocit.

Risba nevtrofilca in eritrocita.



Trombocit in eritrocit.

Risba trombocita in eritrocita.

Limfocit je po velikosti podoben eritrocitu in ima zelo malo modro obarvane citoplazme.



Limfocit in eritrocit.

Risba limfocita in eritrocita.

Vrednotenje kakovosti razmaza

1. Kakšna je kakovost razmaza glede na dobljene rezultate in kaj je vzrok za morebitno slabšo kakovost?

.....

.....

2. Kaj je vzrok za morebitno slabšo obarvanost jeder levkocitov, acidofilno citoplazmo limfocitov ali bazofilno obarvanost eritrocitov?

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:



Domača naloga

1. Kaj pomeni beseda filija?
2. Kaj je acidofilna citoplazma?
3. Kaj je bazofilna citoplazma?
4. Zakaj je treba mikroskopirati v najtanjšem delu razmaza?
5. Kakšna je barva vseh jeder?
6. Po čem spoznamo mali limfocit? Opišite morfologijo.
7. Kaj je polikromatski eritrocit?

8. Iz katerega normoblasta najverjetneje nastane polikromatski eritrocit?

.....

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

9 MIKROSKOPIRANJE MORFOLOŠKO SPREMENJENIH ERITROCITOV

Teoretične osnove

Patološke oblike eritrocitov (eliptociti, ehinociti, anulociti), patološke velikosti eritrocitov (mikrociti, makrociti, megalociti) in patološki vključki v eritrocitih se pojavljajo pri različnih bolezenskih stanjih, najpogostejše pa pri anemijah. Morfološko spremenjene (patološke) eritrocite je treba poznati zaradi prepoznavanja bolezenskih stanj, v laboratorijski izvid pa jih vpisujemo pod opombe diferencialne krvne slike.

Opozorilo

Če so v krvnem razmazu le posamezni morfološko spremenjeni eritrociti, še ne pomeni, da gre npr. za pojav ovalocitoze (v primeru posameznih ovalocitov), za sferocitozo (v primeru posameznih sferocitov), za mikrocitozo (v primeru posameznih mikrocitov) itd. V tem primeru na laboratorijski izvid napišemo le izraz poikilocitoza in anizocitoza. Pojav patoloških vključkov moramo obvezno napisati na laboratorijski izvid tudi, če so prisotni le posamezni. Howell-Jollyjeva telesca lahko zamenjamo s Pappenheimovimi telesci ali celo s trombociti, ki ležijo na eritrocitih. Da se prepričamo, ali gre res za Howell-Jollyjeva telesca, moramo mikrometrski vijak mikroskopa premakniti, da telesca rdečkasto zasvetlikajo.

Pribor in material:

- obarvani krvni razmazi, barvice,
- mikroskop in pribor za mikroskopiranje.

Delo

1. V pravi gostoti krvnih razmazov poiščite pod imerzijsko povečavo morfološko spremenjene eritrocite, anizocitozo, poikilocitozo ter patološke vključke v eritrocitih.
 2. Natančno si oglejte posamezne morfološko spremenjene eritrocite ter patološke vključke in celice narišite.
-

Rezultati

Risba tarčastih eritrocitov ali kodocitov.	Risba sferocitov.
Risba akantocitov.	Risba ehinocitov.
Risba dakrocitov (»tear drops«).	Risba srpastih eritrocitov ali drepanocitov.
Risba shistocitov.	Risba stomatocitov.
Risba ovalocitov ali eliptocitov.	Risba prstanastih eritrocitov ali anulocitov.

Risba bazofilno punktiranih eritrocitov.	Risba eritrocitov s Howell-Jollyjevimi telesci.
Risba Cabotove zanke v eritrocitih.	Risba polikromatskih eritrocitov.

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:



Domača naloga

1. Katerih patoloških vključkov v eritrocitih ne vidimo, če jih obarvamo po Pappenheimu?

.....

2. Kateri patološki vključki v eritrocitih se obarvajo vijolično in kateri modro?

.....

.....

3. Kdaj uporabljamo obrazilo -citoza?

.....

4. Pri kateri preiskavi vpisujemo pod opombe morfološke nepravilnosti eritrocitov?

.....

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

10 MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE ERITROCITOV V VENSKE KRVIS KOMORICO

Teoretične osnove

Številčno koncentracijo eritrocitov v sodobnih laboratorijih merijo s hematološkimi analizatorji. V izjemnih primerih (dežurstva, okvara analizatorjev, nadzor dela analizatorjev, terensko delo) se štetje eritrocitov v komorici (hemocitometru) še vedno izvaja. Prednost štetja v komorici je v tem, da je poceni, ker ne potrebuje dragih analizatorjev in reagentov ter niso potrebni standardi. Pomanjkljivost je v manjši točnosti, slabši ponovljivosti in dolgotrajnosti postopka.

Za štetje eritrocitov v komorici lahko uporabljamo Neubauerjevo, Bürker-Türkovo ali katero drugo komorico, ne smemo pa uporabljati Fuchs-Rosenthalove komorice, ker je le-ta namenjena za štetje celic v likvorju. Vsi hemocitometri za štetje celic v krvi imajo globino 0,1 mm in površino mrežice 9 mm². Komorice se med seboj razlikujejo že po tem, da imajo nekatere za razmejitev kvadratov enojno, druge pa dvojno črto. Skupna značilnost vseh je, da imajo enako površino najmanjšega kvadrata v sredinskem delu komorice, kjer štejemo eritrocite in trombocite, ta pa znaša 1/400 mm² ali 0,0025 mm². Sredinski (najbolj zamrežen) kvadrat s površino 1 mm² je razdeljen na 16 ali 25 manjših kvadratov s površino 1/25 mm² ali 0,04 mm², ti pa še na 16 najmanjših kvadratkov s površino 0,0025 mm². Eritrocite štejemo v površini petih kvadratov s celotno površino 0,2 mm² (5 x 0,04 mm²). Pri komoricah, ki imajo v sredinskem kvadratu 16 kvadratov, so vmes pravokotniki s površino 0,01 mm² in vmesni najmanjši kvadrati s površino 0,0025 mm². V vmesnih kvadratih in pravokotnikih eritrocitov ne štejemo, ker bi bila v tem primeru površina, kjer štejemo celice, prevelika in rezultat napačen.

Izračun številčne koncentracije eritrocitov

Številčno koncentracijo eritrocitov dobimo tako, da vsoto prešteti eritrocitov delimo s 100.

$$\text{Št. konc. Erci} = \frac{\text{seštevek Erci v petih kvadratih (0,2 mm}^2\text{)}}{100}$$

Formulo za izračun številčne koncentracije eritrocitov dobimo tako, da upoštevamo površino prešteti kvadrata, globino komorice in razredčitev, vse skupaj pa preračunamo na liter krvi.

$$\text{Razredčitev} = 1 : 200$$

$$\text{faktor} = 200$$

$$\text{Globina komorice} = 1/10 \text{ mm}$$

$$\text{faktor} = 10$$

$$\text{Površina prešteti kvadrata} = 5 \cdot 16 \cdot 1/400 = 20/100 \text{ ali } 1/5 \text{ mm}^2$$

$$\text{faktor} = 5$$

$$\text{Število Erci} \times 200 \cdot 10 \cdot 5 = \text{število Erci} \times 10\,000 \text{ (ali } 10^4) / \text{mm}^3$$

Število eritrocitov je treba preračunati na liter krvi.

1 liter vsebuje 10⁶ µL ali 10⁶ mm³, zato moramo pomnožiti 10⁴ z 10⁶ = št Erci x 10¹⁰. Da bi dobili enoto 10¹², ker 10¹⁰ ni SI enota, moramo rezultat deliti in množiti s 100.

Referenčne vrednosti: $4,2\text{--}6,3 \times 10^{12}/\text{L}$

Pribor in material:

- Neubauerjeva ali Bürker-Türkova komorica, brušeno krovno steklo,
- pipetor in kapilara,
- premešana venska kri,
- Hayemov reagent,
- pipeta z volumnom $4975 \mu\text{L}$, pipeta z volumnom $25 \mu\text{L}$, žogica za pipetiranje,
- čaše, epruveta,
- destilirana voda, vata,
- 70–80 % etanol.

Številka vzorca:

Postopek

Premešano kri razredčimo z izotonično raztopino (Hayemov reagent) v razmerju 1 : 200.

Hayemov reagent	venska kri
4975 μL	25 μL

Pravilno pokrijemo komorico z brušenim krovnim steklom, jo napolnimo tako, da v njej ni zračnih mehurčkov, in jo vstavimo v mikroskop.

Opozorilo

Hayemov reagent je izotonična raztopina in vsebuje živosrebrov klorid, ki mumificira eritrocite. Zaradi vsebnosti živega srebra je reagent strupen in ga ne smemo pipetirati z usti. Komorica ne sme biti niti preveč niti premalo napolnjena. Če je komorica premalo napolnjena, v njej vidimo prazne prostore, če pa preveč, se izlije odvečna tekočina v stranske žlebove. V obeh primerih je treba brušeno steklo za pokrivanje komorice odlepiti, komorico in steklo očistiti in obrisati s krpo, ki ne pušča vlaken, ter polnjenje ponoviti. Če je komorica neenakomerno napolnjena, kar vidimo le pod mikroskopom, je prav tako treba polnjenje ponoviti.

Štetje eritrocitov

Eritrocite štejemo pri 400-kratni povečavi v petih sredinskih kvadratih, kot prikazuje slika. Zaradi večje točnosti moramo šteti eritrocite v obeh mrežicah.

Vrednosti med posameznima mrežicama se ne smeta razlikovati za več kot 15 %.

Če je razlika večja, moramo polnjenje komorice in štetje eritrocitov ponoviti.

$$\% \text{ odstopanja med mrežicama} = \frac{\text{razlika med obema mrežicama}}{\text{število Erci v eni od mrežic}} \cdot 100$$

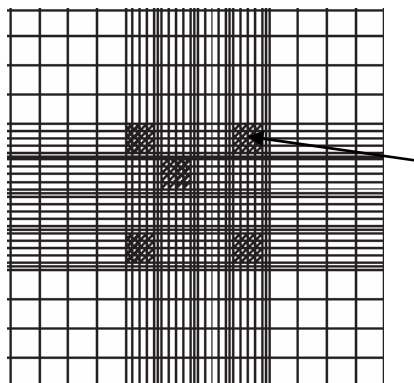
Rezultat je povprečna številčna koncentracija eritrocitov obeh mrežic. Številčno koncentracijo eritrocitov dobimo tako, da število prešteti celic v petih kvadratih delimo s 100 (glej teoretične osnove).

$$\text{Povprečna št. konc. Erci.} = \frac{\text{št.konc. Erci v prvi mrežici} + \text{št.konc. Erci v drugi mrežici}}{2}$$

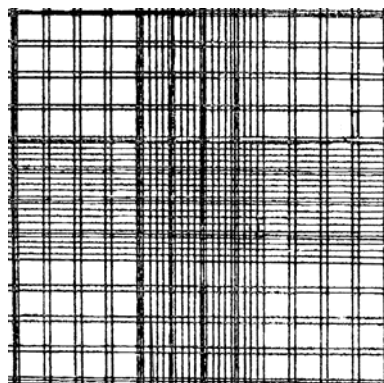
Povprečno št. konc. Erci lahko izračunamo tudi tako, da izračunamo povprečno število prešteti celic obeh mrežic in dobljeno vrednost delimo z vrednostjo 100.

Dobljeni rezultat primerjamo z vrednostjo, dobljeno s hematološkim analizatorjem oziroma s »pravo« vrednostjo, ki se ne sme razlikovati za več kot 10 %.

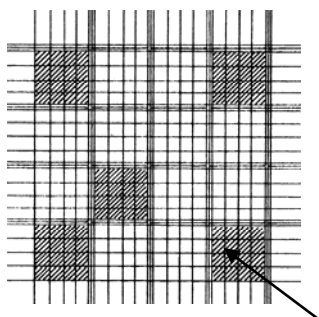
$$\text{Izračun \% odstopanja} = \frac{\text{dobljena vrednost (rezultat)} - \text{prava vrednost}}{\text{prava vrednost}} \cdot 100$$



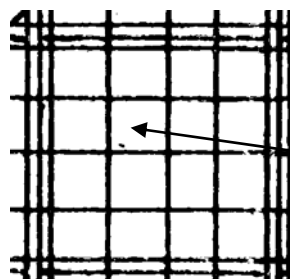
Slika 11. Mrežica Neubauerjeve komorice s petimi sredinskimi kvadrati, kjer štejemo eritrocite.



Slika 12. Mrežica Bürker-Türkove komorice.



Slika 13. Črtkan (zatemnjen) kvadrat s površino 0,04 mm², vseh pet pa ima površino 0,2 mm².



Slika 14. Najmanjši kvadrataček, ki ima površino 0,0025 mm².

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
2. Na komorico vstavite brušeno krovno steklo in preizkusite, ali je dobro pritrjeno.
3. Pri mali povečavi mikroskopa pogledajte ali je komorica čista in da v njej ni vodnih kapljic.
4. V epruveto s pomočjo žogice za pipetiranje pipetirajte Hayemov reagent in dodajte dobro premešano kri ter zmes dobro premešajte.
5. Pravilno napolnite komorico, vstavite jo v mikroskop in poiščite mrežico pri najmanjši povečavi. S pomočjo slike poiščite najprej sredinski kvadrat, nato pa postopoma kvadrat, kjer štejemo eritrocite.
6. Pri 400-kratni povečavi z mikrometrskim vijakom izostrite sliko ter začnite šteti.
7. Preštajte eritrocite v obeh mrežicah in izračunajte % odstopanja med mrežicama.
8. V primeru, da odstopanje med mrežicama ni večje od 15 %, izračunajte povprečno številčno koncentracijo eritrocitov in jo vpišite kot rezultat.
9. Primerjajte dobljeno vrednost z vrednostjo, dobljeno s hematološkim analizatorjem in izračunajte % napake.
10. Izračunajte srednjo vrednost meritev istega vzorca in % odstopanja srednje vrednosti od prave vrednosti.
11. Obrazložite dobljene rezultate.

Dobljene vrednosti in računi

št. Erci v kvadratih prve mrežice	št. Erci v kvadratih druge mrežice
I. kvadrant:	I. kvadrant:
II. kvadrant:	II. kvadrant:
III. kvadrant:	III. kvadrant:
IV. kvadrant:	IV. kvadrant:
V. kvadrant:	V. kvadrant:
skupaj =	skupaj =

% odstopanja med mrežicama =

Št. konc. Erci. v prvi mrežici =

Št. konc. Erci. v drugi mrežici =

Rezultat: povprečna št. konc. Erci obeh mrežic =

Število ponovitev istega vzorca =

\bar{X} =

Prava vrednost št. konc. Erci, dobljena s hematološkim analizatorjem =

% odstopanja od prave vrednosti (točnost rezultata) =

$$\% \text{ odstopanja od } \bar{X} = \frac{\text{prava vrednost} - \bar{X}}{\text{prava vrednost}} \cdot 100 = \dots\dots\dots$$

Obrazložitev rezultatov

Kaj bi bili možni vzroki za napačni rezultat, če ste dobili odstopanje, ki je večje od $\pm 10\%$?

Kaj bi bili možni vzroki večjega odstopanja \bar{X} od prave vrednosti?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:



Domača naloga

1. V katerih primerih se še vedno uporablja štetje eritrocitov v komorici?

.....

2. Kakšno vlogo ima Hayemov reagent? Zakaj se za razredčitev krvi ne uporablja fiziološka raztopina?

.....

.....

3. Kaj vpliva na rezultat, kadar merimo številčno koncentracijo eritrocitov v komorici?

.....

.....

.....

4. Kolikšna je referenčna vrednost številčne koncentracije eritrocitov za odrasle v krvi?

.....

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

11 MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE ERITROCITOV V KAPILARNI KRVIS KOMORICO

Teoretične osnove

Za merjenje številčne koncentracije eritrocitov rabimo majhen volumen krvi, zato je v primeru, če niso zahtevane druge preiskave, smiselno izmeriti številčno koncentracijo eritrocitov v kapilarni krvi in ne v venski. Rezultati merjenja v kapilarni krvi so primerljivi s tistimi, ki jih dobimo z analizo venske krvi. Kapilarni odvzem krvi se največ uporablja v pediatriji.

Pribor in material:

- pribor za odvzem kapilarne krvi, rokavice za enkratno uporabo,
- Neubauerjeva ali Bürker-Türkova komorica, brušeno krovno steklo,
- Hayemov reagent,
- pipetor in kapilara (25 µL), pipeta (4975 µL), žogica za pipetiranje,
- čaše, epruveta,
- vata, staničevina,
- destilirana voda, 70–80 % etanol.

Priimek in ime ali številka vzorca:

Postopek

Kapilarno kri razredčimo z izotonično raztopino (Hayemov reagent) v razmerju 1 : 200.

Hayemov reagent	kapilarna kri
4975 µL	25 µL

Pravilno pokrijemo komorico z brušenim krovnim steklom, jo napolnimo tako, da ni v njej zračnih mehurčkov, in jo vstavimo v mikroskop.

Preštajemo eritrocite pri 400-kratni povečavi na površini 0,2 mm². Štejemo v obeh mrežicah, izračunamo povprečno številčno koncentracijo in srednjo vrednost večkratnih meritev, na koncu pa odstopanje od srednje vrednosti.

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
2. V označeno epruveto pipetirajte Hayemov reagent in iz prsta odvzeto krvi ter premešajte.

3. Na komorico pravilno vstavite brušeno krovno steklo, pod mikroskopom pri mali povečavi preverite, ali je čista in če ne vsebuje vodnih kapljic.
4. Pravilno napolnite komorico, pod mikroskopom poiščite mrežico in preštajte eritrocite pri 400-kratni povečavi v obeh mrežicah.
5. Izračunajte % odstopanja med mrežicama in povprečno številčno koncentracijo eritrocitov v primeru, da je razlika med mrežicama manjša od 15 %.
6. Izračunajte povprečno vrednost večkratnih meritev istega vzorca (srednjo vrednost) in % odstopanja od srednje vrednosti, kar bo predstavljalo % napake.
7. Razložite dobljeni rezultat.

Dobljene vrednosti in računi

št. Erci v kvadratih prve mrežice	št. Erci v kvadratih druge mrežice
I. kvadrant:	I. kvadrant:
II. kvadrant:	II. kvadrant:
III. kvadrant:	III. kvadrant:
IV. kvadrant:	IV. kvadrant:
V. kvadrant:	V. kvadrant:
skupaj =	skupaj =

% odstopanja med mrežicama =

Št. konc. Erci. v prvi mrežici =

Št. konc. Erci. v drugi mrežici =

Rezultat: povprečna št. konc. Erci obeh mrežic =

Število ponovitev istega vzorca =

\bar{X} =

% odstopanja od \bar{X} = $\frac{\text{dobljena vrednost (rezultat)} - \bar{X}}{\bar{X}} \cdot 100 = \dots\dots\dots$

Obrazložitev rezultata

Kaj bi bili možni vzroki za povišano ali znižano številčno koncentracijo eritrocitov?

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

12 MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE RETIKULOCITOV I

Teoretične osnove

Retikulocitov (Rtc) v razmazih, obarvanih po Pappenheimu, ne vidimo. Vsebujejo ostanke ribonukleoproteinov v obliki zrn ali mrežice, medtem, ko jih pri eritrocitih ni. Retikulocite prepoznamo, če obarvamo ribonukleoproteine. Barvamo jih v epruveti, ker se barva veže samo na žive, nefiksirane retikulocite. Za barvanje uporabljamo novo metilensko modrilo (koncentrirana raztopina metilenskega modrila), včasih pa so uporabljali barvilo briljantkrezilmodro. Citoplazma retikulocitov in eritrociti se obarvajo rumenozeleno, medtem ko se mrežica retikulocitov obarva temno modro. Preiskavo izvedemo tako, da preštejemo eritrocite in retikulocite v obarvanem razmazu pod imerzijsko povečavo mikroskopa. Če retikulocitov ne štejemo isti dan, moramo obarvane razmaze fiksirati 3 minute z metanolom in kontrastno barvati 20 minut z razredčeno raztopino reagenta po Giemsi. V nasprotnem primeru ribonukleinska mrežica do naslednjega dneva zbledi.

Novejši hematološki analizatorji lahko poleg drugih meritev izmerijo tudi številčno koncentracijo retikulocitov.

Vrednotenje porazdelitve celic v najtanjšem delu razmaza

Porazdelitev celic lahko v grobem ocenimo že z mikroskopiranjem pod suho povečavo (100- ali 200-kratno).

12.1 BARVANJE RETIKULOCITOV IN PRIPRAVA RAZMAZA

Pribor in material:

- mikroeproveta, stojalo za mikroeprovete,
- premešana venska kri,
- rokavice za enkratno uporabo,
- barvilo za barvanje retikulocitov (novo metilensko modrilo ali briljantkrezilmodro),
- avtomatske pipete (od 100 μ L do 1 mL), čaše,
- pribor za pripravo krvnih razmazov,
- koncentrirana raztopina metanola, posodice za fiksiranje in barvanje krvnih razmazov,
- razredčen reagent po Giemsi.

Številka vzorca:

Št. konc. Erci =

Priprava raztopine barvila (briljantkrezilmodro)

Briljantkrezilmodro 1,0 g

Trinatrijev citrat 0,4 g

Zmes raztopimo v malo vodne raztopine NaCl (konc. je 9 g/L) in dopolnimo z njo do 100 mL. Raztopino nato prefiltriramo.

Postopek

V mikroepruveto vnesemo 25 μ L raztopine barvila in dodamo 100 μ L premešane krvi. Previdno premešamo, zamašimo in pustimo stati 45 minut. Ponovno premešamo, eno kapljo prenesemo na objektno steklo in naredimo tanek razmaz. Razmaz sušimo najmanj 30 minut na zraku. Po potrebi fiksiramo s koncentriranim metanolom (3 minute), kontrastno obarvamo z razredčenim reagentom po Giemsi (20 minut) in speremo z vodo.

Razmerje med krvjo in barvilom je odvisno od kakovosti in starosti barvila, zato se določi eksperimentalno, enako tudi čas barvanja. Običajno se uporablja mešanica dveh delov krvi in enega dela barvila, čas barvanja pa je ~20 minut. Namesto pipetiranja barvila lahko barvilo doziramo tudi po kapljicah. Pred tem moramo izmeriti volumen ene kapljice. Po izračunih predhodnih meritev ima 1 kapljica volumen ~35 μ L.

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
 2. Označite mikroepruveto in v njo pipetirajte barvilo in vensko kri v predpisanem razmerju. Za večje število razmazov lahko pipetirate večji volumen krvi (npr. 200 μ L) in ustrezen volumen barvila (npr. 100 μ L ali 3 kapljice).
 3. Zmes premešajte, mikroepruveto zamašite in jo med občasnim mešanjem pustite vsaj 20 minut.
 4. Naredite najmanj dva tanka razmaza in ju posušite na zraku.
 5. Enega od razmazov fiksirajte z metanolom in kontrastno obarvajte z razredčenim reagentom po Giemsi.
 6. Pod malo povečavo ocenite kvaliteto razmazov, označite in shranite do naslednje vaje.
-

Rezultat

Ocena gostote razmaza, mikroskopiranega pri 100- ali 200-kratni povečavi v primeru, da pregledamo dva pasova vidnih polj po širini razmaza (obkrožite primeren odgovor):

- a. razmaz ima dovolj širok del prave gostote
- b. razmaz je pregost
- c. razmaz prehitro prehaja iz redkega dela v pregosti del
- d. razmaz je stopničast
- e. razmaz ima repke
- f. drugo

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

13 MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE RETIKULOCITOV II

13.1 ŠTETJE RETIKULOCITOV IN IZRAČUN ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE

Teoretične osnove

Retikulocite štejemo v krvnem razmazu pod imerzijsko povečavo. Štejemo jih na 1000 eritrocitov in retikulocitov. Točnejše rezultate bi dobili, če bi prešteli več kot 1000 eritrocitov in retikulocitov (vsaj 5000), ker je število retikulocitov odvisno od razporeditve retikulocitov v krvnem razmazu. Vrednosti, dobljene s hematološkim analizatorjem, so točnejše, ker analizator prešteje zelo veliko število celic. Zaradi boljše preglednosti pod mikroskopom je bolje, da omejimo vidno polje z okencem, ki ga vstavimo v enega od okularjev mikroskopa.

Izbira okularja, kamor vstavimo okence, je odvisna od vodilnega očesa. Vodilno oko je tisto oko, pri katerem se slika, gledana z enim očesom, ne premakne, ko ga usmerimo na nek predmet potem, ko smo predmet centriral z obema očesoma.

Štetje si lahko tudi poenostavimo tako, da natančno preštejemo celice v enem vidnem polju, nato pa preštejemo število vidnih polj, dokler ne pridemo do števila 1000. Če je celic veliko, lahko preštejemo del vidnega polja in preračunamo na celoto.

Retikulociti so normalno prisotni v krvi in jih je od 5 do 15 na 1000 eritrocitov.

Izračun relativnega deleža retikulocitov:

$$\frac{\text{število prešteti RtcI}}{1000 (\text{ErcI} + \text{RtcI})}$$

Znižano ali zvišano število retikulocitov kaže na eno od vrst anemij ali slabokrvnosti.

Številčno koncentracijo retikulocitov dobimo tako, da relativni delež retikulocitov množimo s številčno koncentracijo eritrocitov.

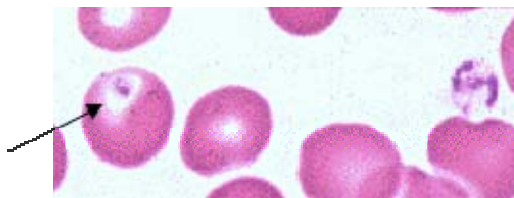
$$\text{Št. konc. RtcI} = \text{relativni delež} \cdot \text{št. konc. ErcI}$$

Primer

Če smo na 1000 eritrocitov in retikulocitov prešteli 15 retikulocitov, je relativni delež $15/1000 = 0,015$. Če je številčna koncentracija eritrocitov $5 \times 10^{12}/L$, bo številčna koncentracija retikulocitov $0,015 \cdot 5 \cdot 10^{12} = 75 \times 10^9/L$.

Referenčne vrednosti št. konc. Rtc: $21-95 \times 10^9/L$.

Retikulocit lahko zamenjamo s trombocitom, ki leži na eritrocitu.



Slika 15. Prikaz trombocita na eritrocitu.

Pribor in material:

- mikroskop in pribor za mikroskopiranje, barvice,
- obarvani krvni razmazi za štetje retikulocitov (razmazi od predhodne vaje),
- okenca kot pripomoček za mikroskopiranje.

Št. konc. Erci =

Delo

1. Pod imerzijsko povečavo poiščite pravo gostoto celic v obeh razmazih. Ocenite kvaliteto posameznega razmaza in za štetje retikulocitov izberite najboljši razmaz.
 2. V obeh razmazih poiščite nekaj retikulocitov, z barvilom obarvane levkocite, trombocite in trombocit na eritrocitu. Celice narišite. Poiščite več različnih trombocitov zato, da jih ne boste zamenjali z retikulociti, če leži trombocit na eritrocitu.
 3. Določite vodilno oko in če vam mikroskop to omogoča, vstavite okence v enega od okularjev. Če ste določili levo vodilno oko, vstavite okence v levi okular.
 4. Pod imerzijsko povečavo preštejte vse retikulocite na 1000 celic (eritrocitov + retikulocitov) v enem od razmazov.
 5. Iz relativnega deleža izračunajte številčno koncentracijo retikulocitov.
 6. Obrazložite rezultate.
-

Rezultati

Ocena gostote najboljšega razmaza, mikroskopiranega pri 1000-kratni povečavi, če pregledamo vsaj deset pasov vidnih polj po širini razmaza brez okenca (obkrožite primeren odgovor):

- a. razmaz ima dovolj širok del prave gostote
- b. razmaz je pregost
- c. razmaz prehitro prehaja iz redkega dela v pregosti del

Moje vodilno oko je

Risba retikulocitov.	Risba trombocitov in trombocita na eritrocitu.	Risba levkocitov.
----------------------	--	-------------------

Število prešteti celic

	število eritrocitov	število retikulocitov	Erci + Rtc
skupaj			

Relativni delež Rtc =

Št. konc. Rtc =

Obrazložitev rezultatov

Kaj je lahko vzrok za neustrezni razmaz in morebitno znižano vrednost številčne koncentracije retikulocitov?

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:



Domača naloga

1. Ali je merjenje številčne koncentracije retikulocitov rutinska preiskava? Razložite odgovor.
.....
.....
2. S katerimi barvili lahko obarvamo retikulumsko mrežico?
.....
3. Ali so retikulociti normalno prisotni v krvi? Če so, kolikšna je njihova normalna številčna koncentracija?
.....
4. Kaj vpliva na rezultat merjenja številčne koncentracije retikulocitov, kadar jih merimo v krvnem razmazu?
.....
.....
.....



Razmislite in odgovorite

Kakšen diagnostični pomen ima merjenje številčne koncentracije retikulocitov?

.....
.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

14 MERJENJE MASNE KONCENTRACIJE HEMOGLOBINA V VENSKE KRV

Teoretične osnove

Masno koncentracijo hemoglobina ugotavljamo s cianhemoglobinsko metodo ročno ali pa s hematološkim analizatorjem. V obeh primerih je princip metode enak.

Princip cianhemoglobinske metode

Kri razredčimo s hipotonično raztopino (Drabkinovim reagentom), da pride do hemolize eritrocitov in sproščanja hemoglobina. Drabkinov reagent vsebuje dve spojini, ki reagirata s hemoglobinom: $K_3Fe(CN)_6$ in KCN. Reakcija poteka dvostopenjsko. Najprej se oksidira hemoglobin, nato pa se na nastali methemoglobin veže cianidna skupina v rdeče obarvani produkt, ki ga merimo fotometrično pri valovni dolžini 540 nm.



KCN so nekateri proizvajalci nadomestili z drugimi reagenti.

Faktorji, ki lahko vplivajo na točnost meritev

Na točnost meritev masne koncentracije hemoglobina vpliva motnost krvi, ki je lahko posledica zvišane številčne koncentracije levkocitov, zvišane koncentracije proteinov ali zvišane koncentracije lipidov. Levkocite odstranimo s centrifugiranjem, proteine z dodatkom K_2CO_3 ali ene kapljice NH_3 , lipide pa z dodatkom etra in s centrifugiranjem. Tarčasti eritrociti, hemoglobin S in hemoglobin C v diluentu ne hemolizirajo.

Hemoglobin lahko merimo tudi neposredno pri valovni dolžini 548,5 nm, kjer imata deoksihemoglobin in oksihemoglobin enake absorbance, karboksihemoglobin pa ne dosti nižje.

Referenčne vrednosti: 120–180 g/L

Opozorilo

KCN je sol in hud celični strup. Deluje na citokrome dihalne verige in s tem blokira celično dihanje, zastrupljena oseba pa se v hudih mukah zaduši. Smrt nastopi že, če ga zaužijemo v zelo majhnih količinah. V stiku s kislino zreagira in nastane prav tako nevaren plin HCN. Spoznamo ga po tem, da ima vonj po mandeljnih. Ker vdihavanje tega plina povzroči smrt, cianidnega reagenta ne smemo vlivati v lijak, kamor so predhodno vlili kislino.

Cianidnega reagenta tudi ne smemo vlivati v kanalizacijo, temveč ga je treba zbirati posebej. Preden ga zavržemo, moramo KCN razstrupiti tako, da v 1 L odpadne tekočine dodamo 0,1 g natrijevega tiosulfata.

Pribor in material:

- cianidni reagent ali Drabkinov reagent, rokavice za enkratno uporabo,
- standardna raztopina z znano masno koncentracijo hemoglobina,
- venska kri z dodatkom antikoagulant,
- avtomatska pipeta (25 µl), pipetor z volumnom od 1 do 5 mL ali avtomatska pipeta z volumnom od 1 do 5 mL,
- epruvete, čaše, stojalo za epruvete,
- fotometer ali spektrometer,
- alkoholni flomaster, staničevina.

Priprava cianidnega reagenta

0,2 g trikalijevega heksacianoferata $K_3Fe(CN)_6$, 0,05 g kalijevega cianida in 0,14 g kalijevega dihidrogenfosfata raztopimo v demineralizirani vodi, dodamo 0,5 mL Steroxa SE ali 1 mL Nonideta P 40 in dopolnimo z demineralizirano vodo do 1 litra. Kontroliramo pH reagenta, ki mora biti od 7 do 7,4. Reagent hranimo v temni steklenici pri sobni temperaturi.

Številka vzorca:

Postopek

V označene epruvete pipetiramo:

	slepi vzorec	standard	vzorec
Hb-reagent	5 mL	5 mL	5 mL
Hb-standard	/	25 µL	/
venska kri	/		25 µL

Premešamo in po najmanj treh minutah lahko merimo absorbanco standarda in vzorca proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 540 nm.

Koncentracijo hemoglobina (Hb) izračunamo po formuli:

$$Hb \text{ (g/L)} = A_{vz} \cdot \frac{C_{st}}{A_{st}}$$

Princip fotometrične meritve

Instrument meri prepuščeno svetlobo, ki jo imenujemo prepustnost ali transmitanca (T). Nato logaritmiramo vrednost $1/T$ in na ta način dobimo vrednost absorbance (A). Absorbanca je premo sorazmerna s koncentracijo, kar prikazuje enačba $A = \varepsilon \cdot C \cdot \ell$, medtem ko je odnos med transmitanco in koncentracijo logaritmičen.

Pred meritvijo moramo instrument naravnati na želeno valovno dolžino in s slepim vzorcem umeriti na vrednost absorbance 0. Šele nato lahko izmerimo absorbance vzorcev in standardnih raztopin. Na podlagi znane vrednosti koncentracije standarda in izmerjene absorbance vzorca in standarda lahko izračunamo koncentracijo vzorca, lahko pa jo izračuna tudi sam instrument.

Delo

1. Pripravite ves material in pribor ter vključite spektrometer ali fotometer.
2. Tri epruvete primerno označite (prvo z oznako slepa, drugo z oznako standard, tretjo pa s številko vzorca) in izvedite reakcijo po predpisanem postopku s cianhemiglobinsko metodo.
3. Umerite instrument pri valovni dolžini 540 nm s slepim vzorcem, premešajte epruveti s standardom in vzorcem in izmerite njuni absorbanci.
4. Izračunajte povprečno vrednost absorbanc standarda in faktor.
5. Izračunajte koncentracijo vzorca in jo primerjajte s pravo vrednostjo.
6. Izračunajte % odstopanja od prave vrednosti (% napake).
7. Obrazložite rezultat.

Podatki, izmerjene vrednosti in račun

$$C_{st} = \dots\dots\dots$$

$$A_{st} = \dots\dots\dots$$

$$A_{vz} = \dots\dots\dots$$

$$\overline{A}_{st} = \dots\dots\dots$$

$$\frac{C_{st}}{\overline{A}_{st}} \text{ ali } F = \dots\dots\dots$$

$$\textbf{Rezultat: } Hb \text{ (g/L)} = A_{vz} \cdot \frac{C_{st}}{\overline{A}_{st}} = \dots\dots\dots$$

Rezultat odstopa / ne odstopa (ustrezno podčrtajte) od normalnih vrednosti.

Prava vrednost masne koncentracije hemoglobina =

% napake = $\frac{\text{razlika med dobljeno vrednostjo in pravo vrednostjo}}{\text{prava vrednost}} \cdot 100 = \dots\dots\dots$

Obrazložitev rezultata

Kaj je lahko vzrok morebitnega odstopanja rezultata od prave vrednosti?

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:



Domača naloga

1. Napišite reakcijo določanja masne koncentracije hemoglobina.
.....
2. Kolikšne so referenčne vrednosti masne koncentracije hemoglobina za odrasle?
moški:
ženske:
3. Zakaj je hemoglobinski reagent strupen? Kaj se zgodi, če ga zlijemo v kislino? Napišite reakcijo.
.....
.....
.....
.....
4. Zakaj je pri meritvah koncentracije vzorca potreben podatek za koncentracijo standarda?
.....
.....
.....
5. Kazalec katerega bolezenskega stanja je znižana masna koncentracija hemoglobina?
.....
6. Kaj je lahko vzrok za netočnost rezultata, ko merimo masno koncentracijo hemoglobina?
.....

.....
.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

15 MERJENJE MASNE KONCENTRACIJE HEMOGLOBINA V KAPILARNI KRVI

Teoretične osnove

Tako kot za merjenje številčne koncentracije krvnih celic potrebujemo tudi za merjenje masne koncentracije hemoglobina le 25 µL krvi. Zato je za to preiskavo smiselno uporabljati kapilarno kri, ker ne rabimo velikega volumna krvi, poleg tega pa se koncentraciji hemoglobina med vensko in kapilarno krvjo bistveno ne razlikujeta.

Pribor in material:

- pribor za odvzem kapilarne krvi,
- hemoglobinski reagent (cianidni reagent ali Drabkinov reagent),
- standardna raztopina z znano masno koncentracijo hemoglobina,
- pipetor z volumnom od 1 do 5 mL ali avtomatska (od 1 do 5 mL),
- epruvete, čaše, stojalo za epruvete,
- alkoholni flomaster, staničevina,
- fotometer ali spektrometer.

Priimek in ime ali številka vzorca:

Postopek merjenja masne koncentracije hemoglobina v kapilarni krvi s cianhemoglobinsko metodo

V označene epruvete pipetiramo:

	slepi vzorec	standard	vzorec
Hb-reagent	5 mL	5 mL	5 mL
Hb-standard	/	25 µL	/
kapilarna kri	/		25 µL

Zmesi premešamo in po najmanj treh minutah lahko merimo absorbanco standarda in vzorca proti slepemu vzorcu pri valovni dolžini 540 nm.

Izračunamo koncentracijo vzorca po formuli: $C_{vz} = A_{vz} \cdot \frac{C_{st}}{A_{st}}$

Delo

1. Pripravite ves material in pribor ter vključite spektrometer oz fotometer.
 2. Tri epruvete primerno označite (prvo z oznako slepa, drugo z oznako standard, tretjo pa s številko vzorca) in izvedite reakcijo po predpisanem postopku. Kot vzorec uporabite kapilarno kri, odvzeto iz prsta.
 3. Umerite instrument s slepim vzorcem pri valovni dolžini 540 nm.
 4. Premešajte epruveti s standardom in vzorcem in izmerite njuni absorbanci.
 5. Izračunajte povprečno vrednost absorbanc standarda in faktor.
 6. Izračunajte koncentracijo vzorca.
 7. Ugotovite, ali je dobljena vrednost koncentracije vzorca v mejah referenčnih vrednosti in razložite dobljeni rezultat.
-

Podatki in izmerjene vrednosti $C_{st} = \dots\dots\dots$ $A_{st} = \dots\dots\dots$ $A_{vz} = \dots\dots\dots$ $\overline{A}_{st} = \dots\dots\dots$ $\frac{C_{st}}{\overline{A}_{st}}$ ali $F = \dots\dots\dots$ **Rezultat:** $Hb \text{ (g/L)} = A_{vz} \cdot \frac{C_{st}}{\overline{A}_{st}} = \dots\dots\dots$

Rezultat odstopa / ne odstopa (ustrezno podčrtajte) od referenčnega območja.

Obrazložitev rezultata

Kaj je vzrok morebitnega odstopanja rezultata od referenčnih vrednosti?

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

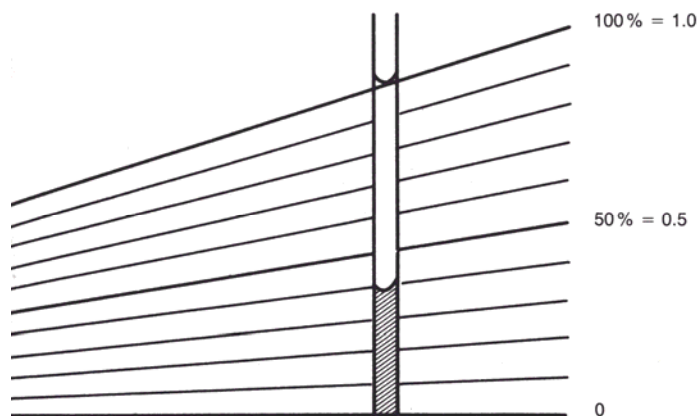
16 MERJENJE HEMATOKRITA

Teoretične osnove

Hematokrit (volumen stisnjenih eritrocitov) so včasih določali z meritvijo razmerja med dobljenim stolpcem stisnjenih eritrocitov in stolpcem celotne krvi po centrifugiranju v hematokritnih centrifugah. Med stisnjenimi celicami so poleg eritrocitov, ki jih je številčno največ, tudi levkociti in trombociti. Prav tako ostane po centrifugiranju med krvnimi celicami tudi majhen volumen plazme, ker vseh celic ne moremo stisniti v stolpec.

Izračun hematokrita po centrifugiranju:

$$Ht = \frac{\text{dolžina stolpca Erci}}{\text{dolžina stolpca krvi}}$$



Slika 16. Prikaz merjenja razmerja med stolpcem eritrocitov in stolpcem celotne krvi.

Danes je metodo merjenja hematokrita s centrifugiranjem izpodrinil hematološki analizator, ki vrednost hematokrita izračuna. Da bi ločili obe metodi, so starejši avtorji rezultat metode s centrifugiranjem imenovali hematokrit, rezultat izračunane vrednosti hematokrita s hematološkim analizatorjem pa hematokritno vrednost.

Hematokritna vrednost pomeni idealno vrednost hematokrita, ki bi jo dobili, če med centrifugiranjem ne bi ostalo nič plazme. Zato so hematokritne vrednosti vedno nekoliko nižje od hematokrita, dobljenega s centrifugiranjem.

Hematološki analizatorji izračunajo hematokritno vrednost na podlagi izmerjene vrednosti številčne koncentracije eritrocitov in njihovega povprečnega volumna (MCV).

Hematokritna vrednost = MCV · št. konc. Erci

Hematokrit je dober kazalec slabokrvnosti. Če je nižja številčna koncentracija eritrocitov, bo tudi vrednost hematokrita znižana.

Referenčne vrednosti: 0,37–0,54

Pribor in material:

- premešana venska kri, rokavice za enkratno uporabo,
- heparinizirane hematokritne kapilare, kit,
- staničevina,
- merilec dolžine (geotrikotnik),
- hematokritna centrifuga.

Številka vzorca:

Postopek merjenja hematokrita v venski krvi

S premešano vensko krvjo napolnimo kapilaro do 2/3 ali 3/4. Napolnimo jo tako, da nagnemo epruveto s krvjo, v njo pomočimo kapilaro in kri steče v njo sama od sebe. Kapilaro od strani obrišemo s staničevino in jo zamašimo s posebnim kitom.

Delamo v paraleli, kar pomeni, da za vsak vzorec krvi potrebujemo dve kapilari.

Kapilare vstavimo v centrifugo z zamašenim delom zunaj. Kapilari z istim vzorcem krvi postavimo v centrifugo nasproti.

Centrifugiramo 5 minut pri 10 000 vrt./min in izmerimo dolžino stolpca eritrocitov ter dolžino stolpca celotne krvi. Izračunamo razmerje in povprečno vrednost obeh meritev.

Delo

1. Pripravite ves material in pribor.
 2. Izvedite merjenje hematokrita s centrifugiranjem po predpisanem postopku in ovrednotite rezultat.
-

Izmerjene vrednosti in izračun

Prva paralela: Ht =

Druga paralela: Ht =

Rezultat: povprečna vrednost Ht =

Vrednotenje rezultata

Hematokrit je / ni (ustrezno podčrtajte) v mejah referenčnih vrednosti.

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:



Domača naloga

1. Kazalec katerega bolezenskega stanja je hematokrit?
2. Zakaj hematokrit nima enot?
3. Zakaj se hematokrit in hematokritna vrednost med seboj minimalno razlikujeta?
.....
4. Navedite orientacijske referenčne vrednosti za hematokrit pri moških in pri ženskah.
moški:
ženske:
5. Napišite formulo za izračun hematokritne vrednosti.
.....
6. Kako mora biti obrnjena kapilara, ki jo vstavimo v hematokritno centrifugo? Razložite
odgovor.
.....
.....
7. Zakaj moramo kapilaro na zunanji strani po pipetiranju krvi obrisati?
-

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

17 MERJENJE HITROSTI SEDIMENTACIJE ERITROCITOV

Teoretične osnove

Hitrost sedimentacije eritrocitov je nespecifična preiskava, ker rezultati ne pokažejo, za katero bolezen gre. Pričakovali bi, da bodo to preiskavo opustili, namesto tega pa proizvajalci izdelujejo vedno bolj izpopolnjene analizatorje za odčitavanje sedimentacije. Razlog je v tem, da mnogi zdravniki to preiskavo še vedno naročajo, čeprav je na voljo bolj specifična preiskava, ki meri CRP (C-reaktivni protein).

Hitrost sedimentacije eritrocitov so na začetku izvajali z metodo po Westergrenu (antikoagulant je bil Na citrat, razmerje med krvjo in antikoagulantom pa 4 + 1). Kasneje so metodo modificirali, da so lahko uporabljali EDTA-kri, metodo pa so poimenovali po Dowsonu. Danes zopet izvajajo metodo po Westergrenu, vse več laboratorijev pa že uporablja najnovejšo metodo s pomočjo analizatorjev, ki merijo kinetiko agregacije eritrocitov. Za razliko od klasične metode sedimentacije, ki je potekala eno uro, novejši analizatorji izpišejo rezultat že v nekaj minutah.

Merjenje hitrosti sedimentacije eritrocitov po Dowsonu je za učenje najprimernejša metoda, ker ni potreben poseben odvzem krvi, za preiskavo pa lahko uporabljamo, namesto citratne krvi, s fiziološko raztopino razredčeno EDTA-kri.



Slika 17. Prikaz hitrosti sedimentacije eritrocitov po Westergrenu.

Referenčne vrednosti: 0–15 mm/h

Pribor in material:

- pribor za sedimentacijo: plastična posodica z zamaškom, graduirana plastična cevka, stojalo za sedimentacijo,
- venska kri,
- fiziološka raztopina,
- rokavice za enkratno uporabo,
- avtomatske pipete (1 mL in 250 μ L).

Številka vzorca:

Postopek

Kri in fiziološko raztopino pipetiramo v plastično posodico, zamašimo in premešamo.

fiziološka raztopina	EDTA-kri
0,25 mL	1 mL

V zmes krvi in fiziološke raztopine vstavimo graduirano plastično cevko in pustimo v navpičnem položaju pri sobni temperaturi točno 1 uro, da eritrociti sedimentirajo. Odčitamo rezultat v mm/uro.

Delo

1. Pripravite ves material in pribor.
2. Nastavite sedimentacijo v skladu z navodili.
3. Odčitajte stolpec sedimentiranih eritrocitov in vpišite rezultat.

Rezultat: hitrost sedimentacije eritrocitov je mm/h.

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:

**Domača naloga**

1. V čem se razlikujeta postopka sedimentacije po Dowsonu in po Westergrenu?

.....

2. Za katere bolezni lahko gre, če je hitrost sedimentacije močno pospešena, npr. nad 30 mm/uro?

.....

3. Ali na hitrost sedimentacije eritrocitov vplivata temperatura in čas?

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

18 RAČUNSKÉ NALOGE

Teoretične osnove

Včasih so bile enote za masno koncentracijo g/100 ml, relativne deleže so izražali v odstotkih, število krvnih celic pa na mm^3 ali na μl .

Z uvedbo mednarodnih ali SI enot leta 1980 so se odstotki spremenili v relativne deleže (enote od 1), številčno koncentracijo celic so začeli izražati kot število celic na liter krvi, masno koncentracijo hemoglobina pa v gramih hemoglobina na liter krvi (g/L). Če je le mogoče, naj bi se koncentracija izražala v mol/L, oziroma tisočkrat nižji vrednosti (mmol, μmol , nmol), kar imenujemo snovna koncentracija. Po SI so lahko številčne vrednosti samo tisočkratniki določenega števila, kot na primer 10^3 , 10^6 , 10^9 , 10^{12} , 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} , 10^{-15} itd, ne smemo pa uporabljati vrednosti, kot so 10^2 , 10^4 , 10^7 , 10^8 itd.

Mnoge države po svetu in tudi marsikje v državah nekdanje Jugoslavije še vedno uporabljajo »stare enote«. Tudi pri nas se nekatere osebe »stare šole« ne morejo navaditi na SI enote, ki so že desetletja prisotne na laboratorijskih izvidih.

Tako nekateri številčno koncentracijo levkocitov še vedno izražajo v več tisočih na mm^3 , številčno koncentracijo eritrocitov v milijonih na μl ali na mm^3 , masno koncentracijo hemoglobina pa v g/dl. Za koncentracijo glukoze še vedno, tudi v sodobni literaturi, zasledimo enoto g/dl, krvni tlak se najpogosteje izraža v mm Hg, ne pa v pascalih, na marsikaterih spektrometrih pa piše namesto kratice za absorbanco (A) kratica za ekstinkcijo (E).

Zaradi spremenjenih enot so tudi stare številčne vrednosti preiskav popolnoma drugačne od novjših SI vrednosti in posledice so napačne interpretacije rezultatov.

Da se ne bi dogajale pomote v komunikaciji, bi morali laboratorijski tehniki poznati stare in nove enote in biti sposobni preračunati ene v druge.

$$\begin{aligned} 1000 \text{ L} &= 1 \text{ m}^3 \\ 1 \text{ L} &= 1 \text{ dm}^3, \\ 1 \text{ dm}^3 &= 1000 \text{ cm}^3 = 10^3 \text{ cm}^3 \\ 1 \text{ mL} &= 1 \text{ cm}^3, 1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3 = 10^3 \text{ mm}^3 \\ 1 \mu\text{L} &= 1 \text{ mm}^3 \\ 1 \text{ L} &= 10^6 \mu\text{L} = 10^6 \text{ mm}^3 \end{aligned}$$

Tabela 1. Primeri starih enot in novih (SI) enot.

ime preiskave	stare enote	SI enote
hematokrit	%	enota od ena (1/1)
št. konc. eritrocitov	št. x 10^6 Erci/ mm^3 (μl)	št. x 10^{12} Erci /L
št. konc. levkocitov	št. x 10^3 Lkci/ mm^3 (μl)	št. x 10^9 Lkci /L
št. konc. trombocitov	št. x 10^3 Trci/ mm^3 (μl)	št. x 10^9 Trci /L
masna konc. Hb	g/100 ml ali g/dl	g/L
MCV	μm^3	fL
krvni tlak	mm Hg	pascal (Pa)

Naloge

1. Koncentracija hemoglobina je 110 g/L, številčna koncentracija eritrocitov pa $4 \times 10^{12}/L$. Izračunajte vrednosti teh dveh parametrov v starih enotah.

Izračuni:

$$110 \text{ g/L} = \dots\dots\dots \text{ g/100 ml}$$

$$4 \times 10^{12}/L = \dots\dots\dots 10^6/\text{mm}^3$$

2. V nekem laboratoriju v Madridu so izdali spodaj navedene rezultate. Preračunajte vrednosti v rezultate, kot velewa stroka, in jih dopišite v tabelo.

ime preiskave	rezultati madridskega laboratorija	rezultati v SI enotah
koncentracija hemoglobina	9 g/dl	
številčna konc. Trei	$300 \times 10^3/\mu\text{l}$	
trombokrit	5 %	
MCHC	30 g/dl	
MCV	$80 \mu\text{m}^3$	
številčna konc. Erci	$4,1 \times 10^6/\mu\text{l}$	

Izračuni:

3. Preračunaj snovno koncentracijo v g/100 mL in obratno. $M_r = 60$.

$$5 \text{ mmol/L} = \dots\dots\dots$$

$$5 \text{ g/100 ml} = \dots\dots\dots$$

$$0,6 \text{ mol/L} = \dots\dots\dots$$

4. 100 mL raztopine s koncentracijo 9 g/L dolijemo 200 ml vode. Kolikšna bo koncentracija po razredčitvi in kolikšna bo razredčitev?

Izračuni:

Koncentracija po razredčitvi bo

Razredčitev bo

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

19 MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE LEVKOCITOV V VENSKI KRVİ S KOMORICO

Teoretične osnove

Podobno kot za štetje eritrocitov, je tudi za štetje levkocitov v komorici treba kri predhodno razredčiti. Za redčenje krvi uporabljamo hipotonično raztopino (Türkova raztopina²), ki hemolizira eritrocite in obarva jedra levkocitov temno modro. Razredčitev je desetkrat manjša kot pri štetju eritrocitov, ker je levkocitov v krvi normalno do tisočkrat manj. Iz tega razloga štejemo levkocite v večji površini komorice (v površini 4 mm²) pri dvestokratni povečavi. Uporabljamo lahko Neubauerjevo, Bürker-Türkovo ali katero drugo komorico, ki ima kvadrate s površino po 1 mm² in globino 0,1 mm.

Referenčne vrednosti: 4–10 x 10⁹/L

Pribor in material:

- premešana venska kri, rokavice za enkratno uporabo,
- avtomatske pipete (475 µL in 25 µL),
- Türkova raztopina,
- epruveta, čaše, pipetor in kapilare,
- komorica za štetje krvnih celic (Neubauerjeva komorica, Bürker-Türkova komorica idr.), brušeno krovno steklo,
- vata, staničevina, alkoholni flomaster, stojalo za epruvete, destilirana voda.

Številka vzorca:

Postopek

V epruveto pipetiramo 475 µL raztopine Türkovega reagenta in 25 µL premešane venske krvi.

Türkov reagent	venska kri
475 µL	25 µL

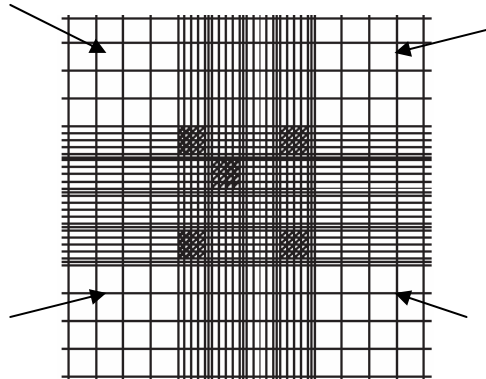
Zmes dobro premešamo in napolnimo komorico tako, da ni v njej zračnih mehurčkov. Počakamo 3 minute, da se celice umirijo in pričnemo s štetjem.

Štetje levkocitov

Preštejemo levkocite pri 200-kratni povečavi v vseh štirih vogalnih kvadratih mrežice na površini 4 mm². Štejemo v obeh mrežicah. Levkocite, ki ležijo na mejni črti posameznega kvadrata (1 mm²), štejemo tako, da upoštevamo le tiste, ki ležijo na dveh stranicah, npr. na

² Türkova raztopina je ocetnokisla raztopina barvila gentianaviolet in azura B.

spodnji in na levi, levkocitov na drugih dveh mejnih stranicah kvadrata pa ne upoštevamo. Levkocite, ki so na mejnih črtah znotraj posameznega kvadrata, moramo seveda prešteti.



Slika 18. Prikaz štirih zunanjih kvadratov mrežice Neubauerjeve komorice, kjer štejemo levkocite.

Preštejemo levkocite v obeh mrežicah. Če se števili prešteti celic v obeh mrežicah razlikujeta za več kot 15 %, moramo polnjenje komorice in štetje celic ponoviti.

$$\% \text{ odstopanja med mrežicama} = \frac{\text{razlika med obema mrežicama}}{\text{število Lkci v eni od mrežic}} \cdot 100$$

Izračun številčne koncentracije levkocitov:

$$\text{Št. konc. Lkci} = \frac{\text{število Lkci v 4 kvadratih (4 mm}^2\text{)}}{20}$$

Formulo za izračun številčne koncentracije levkocitov dobimo tako, da upoštevamo površino prešteti kvadratkov, globino komorice in razredčitev, vse skupaj pa preračunamo na liter krvi.

Razredčitev = 1 : 20

faktor = 20

Globina komorice = 1/10 mm

faktor = 10

Površina prešteti kvadratkov = 4 mm²

faktor = 1/4

Število Lkci x **20 · 10 · 1/4** = število Lkci x **50** / mm³

Število levkocitov je treba preračunati na liter krvi.

1 liter vsebuje 10⁶ µL ali 10⁶ mm³, zato moramo 50 pomnožiti z 10⁶ = št Lkci x 5 x 10⁷.

Da bi dobili enoto 10⁹, ker 10⁷ ni SI enota, moramo rezultat deliti in množiti s 100. 5 in 100 se pokrajšata in dobimo število Lkci, deljeno z 20.

Rezultat je povprečna številčna koncentracija levkocitov, prešteti v obeh mrežicah.

$$\text{Povprečna št. konc. Lkci.} = \frac{\text{št.konc. Lkci v prvi mrežici} + \text{št.konc. Lkci v drugi mrežici}}{2}$$

Dobljeni rezultat primerjamo z vrednostjo, dobljeno s hematološkim analizatorjem oziroma s »pravo« vrednostjo, ki se ne sme razlikovati za več kot 15 %.

$$\% \text{ odstopanja} = \frac{\text{dobljena vrednost (rezultat)} - \text{prava vrednost}}{\text{prava vrednost}} \cdot 100$$

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
2. Na komorico namestite brušeno krovno steklo in pod mikroskopom preverite čistost komorice oz. stekla.
3. Pipetirajte Türkovo raztopino in premešano vensko kri, premešajte, napolnite komorico in pustite, da se celice umirijo.
4. Pod mikroskopom poiščite mrežico in preštejte levkocite v skladu z navodilom.
5. Izračunajte % odstopanja med mrežicama in povprečno številčno koncentracijo levkocitov, če se vrednosti obeh mrežic razlikujeta za manj kot 15 %.
6. Primerjajte dobljeno vrednost z vrednostjo, dobljeno s hematološkim analizatorjem in izračunajte % napake.
7. Izračunajte povprečno vrednost meritev istega vzorca in % odstopanja povprečne vrednosti od prave vrednosti.
8. Obrazložite rezultat.

Dobljene vrednosti in računi

št. Lkci v kvadratih prve mrežice	št. Lkci v kvadratih druge mrežice
I. kvadrat:	I. kvadrat:
II. kvadrat:	II. kvadrat:
III. kvadrat:	III. kvadrat:
IV. kvadrat:	IV. kvadrat:
skupaj =	skupaj =

% odstopanja med mrežicama =

Št. konc. Lkci. v prvi mrežici =

Št. konc. Lkci. v drugi mrežici =

Rezultat: povprečna št. konc. Lkci obeh mrežic =

Število ponovitev istega vzorca =

Povprečna vrednost vseh meritev ali $\bar{X} = \dots\dots\dots$

Prava vrednost št. konc. Lkci, dobljena s hematološkim analizatorjem = $\dots\dots\dots$

% odstopanja (% napake) = $\frac{\text{dobljena vrednost (rezultat)} - \text{prava vrednost}}{\text{prava vrednost}} \cdot 100 = \dots\dots\dots$

% odstopanja od $\bar{X} = \frac{\text{prava vrednost} - \bar{X}}{\text{prava vrednost}} \cdot 100 = \dots\dots\dots$

Obrazložitev rezultata

Kaj bi bili možni vzroki za napačen rezultat, če rezultat odstopa za več kot $\pm 15\%$? Kako si razlagate razliko med pravo vrednostjo in povprečno vrednostjo vseh meritev?

.....
.....
.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

20 MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE LEVKOCITOV V KAPILARNI KRVI S KOMORICO

Teoretične osnove

Tudi pri štetju levkocitov so številčne koncentracije le-teh v venski in kapilarni krvi primerljive. Metoda je dokaj specifična, vendar podobno kot pri hematološkem analizatorju, tudi v komorici ne moremo ločiti med levkociti in normoblasti. V primeru prisotnosti normoblastov v krvi moramo narediti krvni razmaz, ga pobarvati po Pappenheimu, diferencirati in iz dobljenega razmerja med normoblasti in levkociti izračunati številčno koncentracijo levkocitov.

Pribor in material:

- pribor za odvzem kapilarne krvi, rokavice za enkratno uporabo,
- Neubauerjeva komorica ali Bürker-Türkova komorica, brušeno krovno steklo,
- vata, staničevina, destilirana voda,
- epruveta, čaše, stojalo za epruvete,
- Türkova raztopina.

Priimek in ime ali številka vzorca:

Postopek

V epruveto pipetiramo 475 μL raztopine Türkovega reagenta in 25 μL kapilarne krvi ter premešamo.

Türkovi reagent	kapilarna kri
475 μL	25 μL

Na komorico namestimo brušeno krovno steklo in preizkusimo, ali je dobro pritrjeno. Pod mikroskopom pri mali povečavi pogledamo, ali je komorica čista in ne vsebuje vodnih kapljic. Zmes reagenta in krvi še enkrat dobro premešamo in napolnimo komorico tako, da ni v njej zračnih mehurčkov. Počakamo 3 minute, da se celice umirijo.

Levkocite štejemo enako kot pri predhodni vaji tako, da preštejemo levkocite pri dvestokratni povečavi v obeh mrežicah v vseh štirih vogalnih kvadratih.

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
2. Na komorico namestite brušeno krovno steklo in pod mikroskopom preverite čistost komorice oz. stekla.
3. Pipetirajte Türkovo raztopino.

4. Odvzemite kapilarno kri v skladu z navodili in jo pipetirajte v Türkovo raztopino.
5. Napolnite komorico in pustite, da se celice umirijo.
6. Preštejte levkocite v obeh mrežicah in izračunajte % odstopanja med mrežicama.
7. Izračunajte povprečno številčno koncentracijo levkocitov.
8. Izračunajte srednjo vrednost meritev istega vzorca in odstotek odstopanja vašega rezultata od srednje vrednosti.
9. Obrazložite rezultat.

Dobljene vrednosti in računi

št. Lkci v kvadratih prve mrežice	št. Lkci v kvadratih druge mrežice
I. kvadrat:	I. kvadrat:
II. kvadrat:	II. kvadrat:
III. kvadrat:	III. kvadrat:
IV. kvadrat:	IV. kvadrat:
skupaj =	skupaj =

% odstopanja med mrežicama =

Št. konc. Lkci. v prvi mrežici =

Št. konc. Lkci. v drugi mrežici =

Rezultat: povprečna št. konc. Lkci obeh mrežic =

Število ponovitev istega vzorca =

Povprečna vrednost vseh meritev ali \bar{X} =

% odstopanja od \bar{X} = $\frac{\text{dobljena vrednost (rezultat)} - \bar{X}}{\bar{X}} \cdot 100 = \dots\dots\dots$

Obrazložitev rezultata

Kaj bi bili možni vzroki za odstopanje rezultata od normalne ali srednje vrednosti?

.....

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:



Domača naloga

1. Kolikšna je referenčna vrednost številčne koncentracije levkocitov za odrasle?
.....
2. Kolikšna je razredčitev krvi za merjenje številčne koncentracije levkocitov v komorici?
.....
3. Zakaj mora biti raztopina za redčenje krvi hipotonična?
.....
4. Kakšno vlogo ima barvilo gentianaviolet v Türkovem reagentu?
.....
5. V katerih kvadratih štejemo levkocite? Kolikšna je površina posameznih kvadratov?
.....
.....
6. Kaj pomeni izraz levkopenija?
7. Kaj pomeni izraz levkocitoza?
8. Pri katerih infekcijskih boleznih je pogostejša levkopenija?
.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

21 OGLED MORFOLOŠKO NEPRAVILNIH GRANULOCITOV

Teoretične osnove

Nekateri morfološko nepravilni levkociti (večjedrne celice, hipersegmentirani granulociti) so lahko v manjšem številu prisotni tudi pri zdravih osebah, še pogosteje pa so znak bolezenskega stanja. Morfološko spremenjenih levkocitov hematološki analizator ne prepozna, zato je toliko bolj pomembno, da jih pozna laboratorijski tehnik.

Morfološke nepravilnosti levkocitov niso strogo specifične, kljub temu pa so lahko dober pripomoček pri diagnostiki. Zlasti pomembno je ločevanje Pelger-Hüetove anomalije od pojava visokega števila paličastih nevtrofilnih granulocitov, ki so posledica hude infekcije. V nasprotnem bi lahko zdravnik po nepotrebnem predpisal antibiotik. Prav tako je pomembno, da poznamo pelgeroidno obliko jeder, ki je lahko posledica malignih obolenj krvotvornih organov.

Morfološke nepravilnosti granulocitov moramo napisati pod opombe diferencialne krvne slike.

Primer:

Opombe: hipersegmentirani nevtrofilni granulociti, paličasti velikani, asinhronizem, toksične granulacije, pelgeroidna oblika jeder itd.

Pribor in material:

- mikroskop in pribor za mikroskopiranje, barvice,
- preparati z morfološko nepravilnimi granulociti.

Delo

1. Opišite morfologijo normalnega nevtrofilca in morfoloških nepravilnosti granulocitov.
 2. V posameznem krvnem razmazu pod imerzijsko povečavo poiščite pravo gostoto krvnih celic.
 3. Poiščite normalne segmentirane nevtrofilne granulocite (nevtrofilce) in jih narišite.
 4. Poiščite morfološko spremenjene granulocite in jih narišite.
Zaradi primerjave velikosti narišite zraven patološkega granulocita še eritrocit.
-

Rezultati

Opis normalnega nevtrofilca:	Risba normalnih nevtrofilcev in eritrocita.
Opis nevtrofilca s toksičnimi granulacijami:	Risba nevtrofilcev s toksičnimi granulacijami in eritrocita.
Opis Alderjeve anomalije:	Risba nevtrofilca z Alderjevo anomalijo in eritrocita.
Opis Doehlejevih telesc:	Risba nevtrofilca z Doehlejevimi telesci in eritrocita.

<p>Opis asinhronizma v dozorevanju citoplazme nevtrofilcev:</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	<p>Risba nevtrofilca z asinhronizmom v dozorevanju citoplazme in eritrocita.</p>
<p>Opis heterozigotne Pelger-Hüetove anomalije:</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	<p>Risba nevtrofilca s heterozigotno Pelger-Hüetovo anomalijo in eritrocita.</p>
<p>Opis hipersegmentiranega nevtrofilca:</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	<p>Risba hipersegmentiranega nevtrofilca in eritrocita.</p>
<p>Opis Chediak-Higashijeve anomalije:</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	<p>Risba Chediak-Higashijeve anomalije in eritrocita.</p>

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:



Domača naloga

1. V čem je razlika med Pelger-Hüetovo anomalijo in pelgeroidno obliko jeder?

.....
.....

2. Pri katerih bolezenskih stanjih se pojavljajo toksične granulacije?

.....

3. Kaj pomeni beseda asinhronizem?

4. Kaj pomeni beseda hiper? Navedite katero od izpeljank predpone hiper, ki jo uporabljamo v vsakdanjem življenju ali v medicini.

.....
.....

5. Kaj pomeni beseda hipo? Navedite katero od izpeljank predpone hipo, ki jo uporabljamo v vsakdanjem življenju ali v medicini.

.....
.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

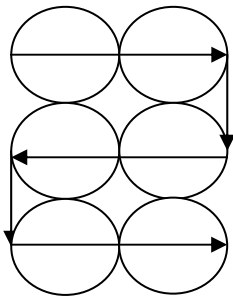
Datum: _____

22 UČENJE TEHNIKE DIFERENCIRANJA OBARVANEGA KRVNEGA RAZMAZA PO CIKCAK SISTEMU - I

Teoretične osnove

Metoda diferenciranja sestoji iz štetja krvnih celic in vpisa morfoloških nepravilnosti krvnih celic pod opombe. Štejemo vse celice, ki imajo jedro (levkocite in normoblaste). Ker nas zanima razmerje med levkociti, moramo normoblaste šteti posebej.

Pod mikroskopom praviloma preštejemo 200 celic. Manj kot 200 celic lahko preštejemo, če je razmaz pregost ali pa je številčna koncentracija levkocitov v krvi nizka. V tem primeru moramo prešteti vsaj 100 celic. Celice štejemo pod mikroskopom s cikcak tehniko.



Slika 19. [Prikaz cikcak tehnike mikroskopiranja.](#)

Šteti moramo prav vse celice z jedrom, od blasta do zrele celice. Kot rezultat štetja (diferenciranja) napišemo relativne deleže vseh prešteti celic. Večino morfološko spremenjenih celic štejemo kot da so normalne celice, pojav njihovih morfoloških sprememb pa zapišemo pod opombe. Npr. hipersegmentirane nevtrofilce štejemo pod nevtrofilce, pod opombe pa napišemo hipersegmentirani nevtrofilci. Izjema so atipični limfociti, ki jih ne pišemo pod opombe, ampak jih preštejemo pod svojim imenom.

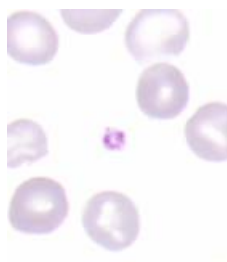
Pod opombe vpisujemo tudi druge morfološko spremenjene celice, ki jih sicer ne štejemo (eritrocite in trombocite).

Primeri morfološko spremenjenih trombocitov, ki jih pišemo pod opombe:
trombociti velikani, anizocitoza trombocitov.

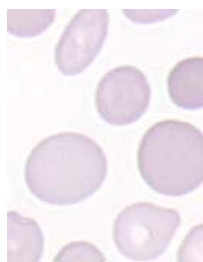
Primeri morfološko spremenjenih granulocitov, ki jih pišemo pod opombe:
paličasti velikani, asinhronizem, Pelger-Hüetova anomalija, toksične granulacije, hipersegmentirani nevtrofilni granulociti.

Primeri morfološko spremenjenih eritrocitov, ki jih pišemo pod opombe:
anizocitoza, poikilocitoza, anulocitoza, posamezni tarčasti eritrociti, mikrocitoza, Howell-Jollyjeva telesca, bazofilno punktirani eritrociti.

Ker diferencialna krvna slika pove, kolikšno je razmerje med levkociti, jo lahko imenujemo tudi diferencialna bela krvna slika.



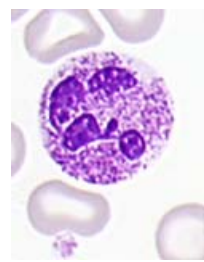
trombocit



anizocitoza



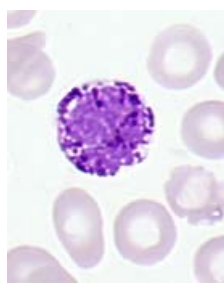
nevtrofilec



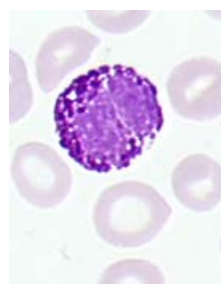
neutr. s toks. gran.



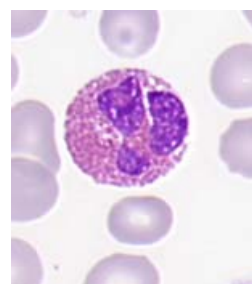
eozinofilec



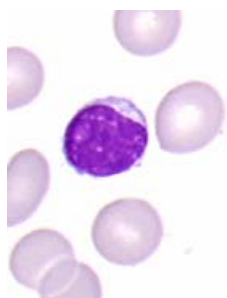
bazofilec



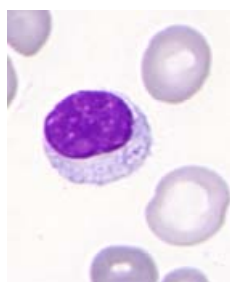
bazofilec



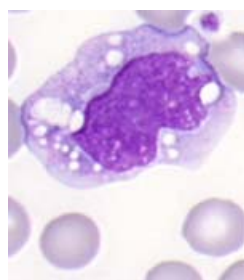
eozinofilec



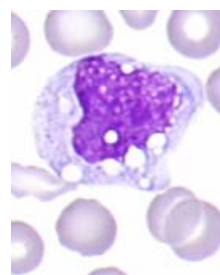
limfocit (mali)



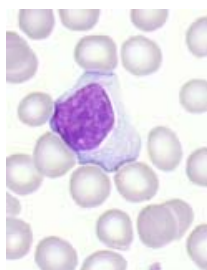
limfocit (veliki)



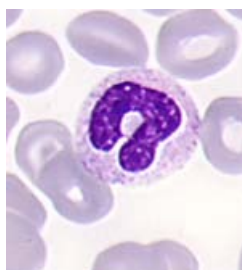
monocit



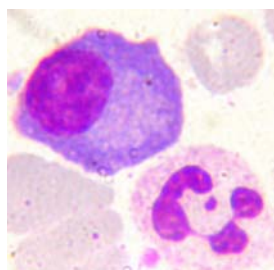
monocit



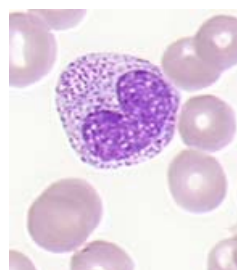
atipični limfocit



paličasti nevtr.gran.



plazmatka in nevtrofilec



metamielocit

Slika 20. Celice, ki so običajno prisotne v normalnem in patološkem krvnem razmazu.

Zmotno je mnenje posameznih dijakov, da štejemo le zrele celice, saj so za odkritje bolezenskega stanja izjemnega pomena nezrele celice, kot so blasti, mielociti, metamielociti, normoblasti itd.

Kadar za štetje krvnih celic ne uporabljamo elektronskih števecv (denominatorjev), si pomagamo tako, da za vsako prešteto celico narišemo črtico, peta črtica pa je vodoravna.

Primer: limfociti 

Hematološki analizator prešteje več tisoč celic z jedrom in na osnovi števila prešteti celic izračuna relativne deleže. Zaradi velikega števila prešteti celic so rezultati, dobljeni s hematološkim analizatorjem, točnejši. Nekaterih celic hematološki analizator ne prepozna in v tem primeru je potrebno krvno sliko pogledati pod mikroskopom.

Pribor in material:

- obarvan krvni razmaz,
- mikroskop in pribor za mikroskopiranje.

Številka razmaza:

Delo

1. Kanite imerzijsko olje na najtanjši del krvnega razmaza. Olja ne sme biti niti premalo niti preveč.
 2. Poiščite pravo gostoto celic.
 3. Vadite cikcak tehniko diferenciranja.
 4. Opazujte posebnosti rdeče vrste, trombocitov in granulocitov ter jih zapišite pod opombe.
 5. Med mikroskopiranjem si s črticami beležite število posameznih levkocitov.
 6. Izračunajte relativne deleže posameznih levkocitov glede na število prešteti celic in jih vpišite v tabelo.
-

Rezultati

Opombe (posebnosti eritrocitov, granulocitov in trombocitov):

Rezultat diferenciranja

ime celic	število prešteti celic	rel. delež	ref. vrednosti
pal. nevt. granulociti			0–0,05
nevtrofilci			0,40–0,70
limfociti			0,20–0,50
monociti			0,02–0,10
eozinofilci			0,01–0,06
bazofilci			0–0,01
skupaj			

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:

Domača naloga

1. Kaj pomeni beseda diferenca, iz katere izhaja beseda diferenciranje?
2. Katere celice pri diferenciranju štejemo, katere pa le opisujemo?
3. Ali moramo šteti tudi normoblaste? Razložite odgovor.
4. Opišite cikcak tehniko diferenciranja. Kakšen namen ima ta tehnika?
5. Koliko celic moramo prešteti pri diferenciranju?

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

23 UČENJE TEHNIKE DIFERENCIRANJA OBARVANEGA KRVNEGA RAZMAZA PO CIKCAK SISTEMU - II

Teoretične osnove

Najpogostejše je namen diferenciranja ugotoviti razmerje med granulociti in celicami z nesegmentiranim jedrom. Med celice z nesegmentiranim jedrom, imenovane s skupnim imenom mononuklearne celice, spadajo limfociti, monociti in plazmatke. Plazmatke so redko prisotne v krvi. Monociti fagocitirajo, plazmatke izločajo protitelesa, limfociti pa sodelujejo v celični in humoralni imunosti. Število limfocitov je običajno povišano pri virusnih infekcijah, število granulocitov pa pri bakterijskih infekcijah. Na podlagi izvida hematoloških preiskav in če niso bile opravljene bakteriološke analize, se zdravnik odloči, ali bo bolniku predpisal antibiotik.

Pribor in material:

- obarvan krvni razmaz,
- mikroskop in pribor za mikroskopiranje.

Številka razmaza:

Delo

1. Kanite imerzijsko olje na najtanjši del krvnega razmaza od začetka razmaza do konca po njegovi širini. Olja ne sme biti niti premalo niti preveč.
 2. Poiščite pravo gostoto celic.
 3. Vadite cikcak tehniko diferenciranja.
 4. Mikroskopirajte po cikcak sistemu in si pod opombe zapišite morfološke posebnosti eritrocitov, trombocitov in granulocitov.
 5. Med mikroskopiranjem s črticami beležite število posameznih levkocitov. Preštajte najmanj 100 in največ 200 levkocitov.
 6. Izračunajte relativne deleže posameznih levkocitov glede na število prešteti celic in jih vpišite v tabelo.
 7. Izračunajte razmerje med granulociti in mononuklearnimi celicami (limfociti, plazmatkami in monociti).
 8. Izračunajte številčno koncentracijo prešteti celic v primeru, da je številčna koncentracija levkocitov $8 \times 10^9/L$.
 9. Razložite dobljeni rezultat diferenciranja.
-

Rezultati

Opombe (posebnosti eritrocitov, granulocitov in trombocitov):

Rezultat diferenciranja

ime celic	število prešteti celic	rel. delež	št. konc.
pal. nevt. granulociti			
nevtrofilci			
limfociti			
monociti			
eozinofilci			
bazofilci			
plazmatke			
atipični limfociti			
skupaj			

Seštevek granulocitov =

Seštevek mononuklearnih celic =

Razmerje med granulociti in mononuklearnimi celicami =

Obrazložitev rezultata diferenciranja

Ali so relativni deleži posameznih levkocitov v mejah referenčnih vrednosti? Za katero bolezen bi lahko šlo, če upoštevamo le rezultate diferenciranja in razmerje med granulociti in mononuklearnimi celicami?

.....

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:



Domača naloga

1. V čem je razlika med relativnim deležem in absolutnim številom krvnih celic?

.....

.....

2. Kolikšne so referenčne vrednosti relativnih deležev posameznih levkocitov?

Nevtrofilci:

Pal. nevtr. gran.:

Limfociti:

Monociti:

Eozinofilci:

Bazofilci:

3. Obrazilo -penija uporabljamo pri pojavu

.....

4. Obrazilo -citoza uporabljamo pri pojavu

5. Obrazilo -filija uporabljamo pri pojavu

6. Primeri -penije:

.....

7. Primeri -citoze:

.....

8. Primeri -filije:



Razmislite

Ali veste, koliko celic prešteje hematološki analizator?

Pregledal/a: _____

Opombe:

<p>Opis polikromatskega normoblasta:</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	<p>Risba polikromatskega normoblasta in eritrocita.</p>
<p>Opis plazmatke:</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>	<p>Risba plazmatke in eritrocita.</p>

Izkušnje pri delu

1. S katero krvno celico oziroma krvnimi celicami bi lahko ali ste zamenjali megakariocit pod malo povečavo? Razložite odgovor.

.....

.....

.....

2. Kako prepoznamo megakariocit pod malo povečavo?

.....

.....

3. Kako ločimo normoblaste od levkocitov?

.....

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:



Domača naloga

1. Kakšna je razlika med normoblastom in eritroblastom? Razložite odgovor.

.....

.....

2. Iz katere celice nastane plazmatka? Po katerih značilnostih jo spoznamo?

.....

.....

.....

3. Na katero krvno celico vas spominja polikromatski normoblast? Primerjajte ju med seboj.

.....

.....

.....



Razmislite in odgovorite

Kaj dobesedno pomeni beseda megakariocit?.....

.....

Kaj dobesedno pomeni beseda polikromatski in kaj v prenesenem pomenu?

.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

25 MIKROSKOPIRANJE KOSTNEGA MOZGA II - CELICE RDEČE VRSTE

Teoretične osnove

V kostnem mozgu najdemo vse razvojne stopnje normoblastov. V primeru povečane proizvodnje eritrocitov (povečane eritropoeze) je razmerje med normoblasti in granulociti porušeno (normalno je to razmerje 1 : 3), poleg tega pa se normoblasti pojavljajo tudi v krvi. Skoraj nikoli ne najdemo v krvi pronormoblasta in le redko, samo pri zelo hudi anemiji, najdemo bazofilni normoblast.

Pribor in material:

- mikroskop in pribor za mikroskopiranje, barvice,
- obarvan razmaz ali odtisnjenec kostnega mozga.

Številka razmaza ali odtisnjenca:

Delo

1. Samostojno poiščite megakariocit pri mali povečavo, nato pa si ga natančno ogledajte pod imerzijsko povečavo. Narišite ga.
 2. Opišite celice rdeče vrste in limfocit.
 3. Pod imerzijsko povečavo si ogledajte celice rdeče vrste in limfocit ter jih narišite.
 4. Primerjajte mali limfocit s polikromatskim normoblastom.
 5. Zraven vseh celic zaradi primerjave velikosti narišite tudi eritrocit.
-

Rezultati

Risba megakariocita in eritrocita.

Opis pronormoblasta:	Risba pronormoblasta in eritrocita.
Opis bazofilnega normoblasta:	Risba bazofilnega normoblasta in eritrocita.
Opis primerjave med polikromatskim normoblastom in limfocitom:	Risba polikromatskega normoblasta in limfocita.
Opis ortokromatskega normoblasta:	Risba ortokromatskega normoblasta in eritrocita.

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

26 DIFERENCIRANJE NEVTROFILIJE

Teoretične osnove

Obrazilo -filija uporabljamo za prikaz povečanega števila posameznih granulocitov v krvi. Nevtrofilcev je v krvi največ v primerjavi z drugimi levkociti. Lahko dosežajo celo dvotretjinski delež vseh levkocitov, pa še vedno govorimo o njihovem normalnem relativnem deležu. O povečanem deležu nevtrofilcev govorimo šele, ko jih je več kot 3/4. Večja številčna koncentracija nevtrofilcev je pogosto povezana z bakterijsko infekcijo in s povečano številčno koncentracijo vseh levkocitov.

Nevtrofilce spoznamo po številnih drobnih nevtrofilnih granulacijah, ki so le malo temnejše od barve citoplazme. Vakuole so v citoplazmi nevtrofilcev redke. Pogosteje najdemo vakuole v citoplazmi monocitov, in ker le-teh v nevtrofilcih ne pričakujemo, moramo biti pozorni, da vakuoliziranih nevtrofilcev ne zamenjamo z monociti.

Jedro nevtrofilca je goste strukture in segmentirano, vsebuje pa od dva do pet segmentov.

Številčno koncentracijo nevtrofilcev lahko izračunamo le, če poznamo številčno koncentracijo levkocitov in relativni delež nevtrofilcev.

Št. konc. nevtrofilcev = relativni delež nevtrofilcev · št. konc. levkocitov

Pribor in material:

- mikroskop in pribor za mikroskopiranje z imerzijsko povečavo,
- obarvan krvni razmaz z zvišanim številom nevtrofilcev.

Številka razmaza:

Št. konc. Lkci =

Delo

1. Kanite imerzijsko olje na najtanjši del razmaza.
 2. Poiščite pravo gostoto celic v krvnem razmazu.
 3. Mikroskopirajte po cikcak tehniki in si zapisujte število posameznih levkocitov.
 4. Opazujte posebnosti eritrocitov, trombocitov in granulocitov ter jih zapišite pod opombe.
 5. Preštejte in diferencirajte od 100 do 200 levkocitov ter izračunajte relativne deleže posameznih.
 6. Izračunajte številčno koncentracijo nevtrofilcev.
 7. Ovrednotite dobljeni rezultat.
-

RezultatiRezultat diferenciranja

ime celic	število celic	rel. delež
pal. nevt. gran.		
seg. nevt. gran.		
limfociti		
monociti		
eozinofilci		
bazofilci		
skupaj		

Opombe (posebnosti eritrocitov, granulocitov in trombocitov):

Številčna koncentracija nevtrofilcev =

Vrednotenje rezultata diferenciranja

Za kateri pojav gre v krvi glede na dobljeni rezultat? (relativno nevtrofilijo, eozinofilijo ...)

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

27 DIFERENCIRANJE EOZINOFILIJE

Teoretične osnove

Eozinofilce spoznamo po njihovih značilnih oranžnih ali rdečih specifičnih granulacijah, ki so večje kot pri nevtrofilcih (premer granulacij je od 0,5 do 1,5 μm), jedra pa imajo pogosto samo dva segmenta. Izraz eozinofilija pomeni zvišan relativni delež in/ali zvišana številčna koncentracija eozinofilcev v krvi. V primeru eozinofilije so lahko granulacije eozinofilcev nezrele (obarvane so rjavkasto ali modrikasto) kot pri eozinofilnem promielocitu. Eozinofilija se pogosteje pojavlja pri preobčutljivostnih reakcijah in pri okužbi s paraziti.

Številčno koncentracijo eozinofilcev lahko izračunamo le, če poznamo številčno koncentracijo levkocitov in relativni delež eozinofilcev.

Št. konc. eozinofilcev = relativni delež eozinofilcev · št. konc. levkocitov

Pribor in material:

- mikroskop in pribor za mikroskopiranje z imerzijsko povečavo,
- obarvan krvni razmaz z zvišanim številom eozinofilcev.

Številka razmaza:

Št. konc. Lkci =

Delo

1. Kanite imerzijsko olje na najtanjši del razmaza.
 2. Poiščite v krvnem razmazu pravo gostoto celic.
 3. Mikroskopirajte po cikcak tehniki in si zapisujte število posameznih levkocitov.
 4. Opazujte posebnosti rdeče vrste, trombocitov in granulocitov ter jih zapišite pod opombe.
 5. Preštejte in diferencirajte od 100 do 200 levkocitov ter izračunajte relativne deleže posameznih.
 6. Izračunajte številčno koncentracijo eozinofilcev.
 7. Vrednotite dobljeni rezultat.
-

RezultatiRezultat diferenciranja

ime celic	število celic	rel. delež
pal. nevt. gran.		
seg. nevt. gran.		
limfociti		
monociti		
eozinofilci		
bazofilci		
atipični limfociti		
skupaj		

Opombe (posebnosti eritrocitov, granulocitov in trombocitov):

Vrednotenje rezultata diferenciranja

Za kateri pojav gre v krvi glede na dobljeni rezultat? (relativno nevtrofilijo, eozinofilijo ...)

Številčna konc. eozinofilcev =

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

28 MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE TROMBOCITOV V VENSKE KRVİ S KOMORICO

Teoretične osnove

Pomanjkljivost štetja trombocitov v komorici je v tem, da je postopek dolgotrajen, poleg tega pa bi za točnejši rezultat potrebovali, namesto običajnega, fazno kontrastni mikroskop. Prednost štetja trombocitov v komorici je, da mikrocitov ne moremo zamenjati s trombociti (z analizatorji jih lahko), ker so hemolizirani, in da opazimo, če so trombociti aglutinirani. V obeh primerih hematološki analizator izmeri napačne vrednosti.

Referenčne vrednosti: $140\text{--}340 \times 10^9/\text{L}$

Pribor in material:

- premešana venska kri, prokainski reagent,
- Bürkerjeva ali Neubaurjeva komorica, brušeno krovno steklo,
- vata, krpicice za brisanje komoric,
- 70–80 % etanol, destilirana voda,
- rokavice za enkratno uporabo, alkoholni flomaster,
- petrijeva posodica, filtrirni papir, škarje,
- avtomatske pipete ($475 \mu\text{L}$ in $25 \mu\text{L}$), pipetor, kapilare,
- epruveta, stojalo za epruvete, čaše.

Številka vzorca:

Vrednost št. konc. Trci, dobljena s hematološkim analizatorjem =

Postopek

Kri razredčimo s hipotonično raztopino prokainskega reagenta v razmerju 1 : 20.

prokainski reagent	venska kri
$475 \mu\text{L}$	$25 \mu\text{L}$

Zmes pustimo stati določen čas (od 15 do 30 minut), da eritrociti hemolizirajo. Ko napolnimo komorico, jo pustimo določen čas (od 15 do 30 minut) v vlažnem prostoru, da se trombociti sesedejo (lahko uporabimo petrijevo posodo, ki ima dno pokrito z vlažnim filtrirnim papirjem). Vlaga je potrebna zato, da se komorica ne izsuši.

Štetje trombocitov

Trombocite štejemo v petih sredinskih kvadratih podobno kot eritrocite, seštevek trombocitov pa že pomeni številčno koncentracijo trombocitov.

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
2. Kri razredčite po predpisanem postopku in zmes pustite stati predpisan čas.
3. Pokrijte komorico z brušenim krovnim steklom, jo napolnite, postavite v vlažen prostor in po predpisanem času preštajte trombocite pri 400-kratni povečavi mikroskopa v obeh mrežicah. Spodnji del komorice pred štetjem obrišite.
4. Izračunajte % odstopanja med mrežicama, povprečno številčno koncentracijo trombocitov in % napake. Obrazložite rezultat.

Dobljene vrednosti in računi

št. Trci v kvadratih prve mrežice	št. Trci v kvadratih druge mrežice
I. kvadrant:	I. kvadrant:
II. kvadrant:	II. kvadrant:
III. kvadrant:	III. kvadrant:
IV. kvadrant:	IV. kvadrant:
V. kvadrant:	V. kvadrant:
skupaj =	skupaj =

% odstopanja med mrežicama =

Št. konc. Trci. v prvi mrežici =

Št. konc. Trci. v drugi mrežici =

Rezultat: povprečna št. konc. Trci =

% odstopanja od prave vrednosti (% napake) =

Obrazložitev rezultata

Kaj bi bili možni vzroki za napačni rezultat, če je odstopanje večje od $\pm 10 \%$?

.....

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

29 INDIREKTNO MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE TROMBOCITOV V VENSKI KRVI - I

Teoretične osnove

Ker je bilo štetje trombocitov v komorici zamudno in dolgotrajno, so jih včasih, ko še niso imeli izpopolnjenih hematoloških analizatorjev, ki bi merili tudi številčno koncentracijo trombocitov, raje šteli indirektno. Metoda indirektne štetja trombocitov temelji na štetju trombocitov v krvnem razmazu, obarvanem po Pappenheimu. Prešteti je treba vse trombocite na 1000 eritrocitov.

Metoda je le orientacijska, ker je število prešteti trombocitov odvisno od številčne koncentracije eritrocitov in tudi od razporeditve trombocitov v krvnem razmazu.

Referenčne vrednosti: $140\text{--}340 \times 10^9/\text{L}$

29.1 PRIPRAVA KRVNIH RAZMAZOV

Pribor in material:

- razmaščena objektna stekla, brušeno objektno ali krovno steklo,
- staničevina, vata, 70–80 % etanol,
- mikropipetor in kapilare,
- venska kri, stojalo za epruvete,
- rokavice za enkratno uporabo, svinčnik za oznako razmazov,
- plinski gorilnik.

Številka vzorca

Postopek

Krvne razmaze, ki jih kasneje barvamo in indirektno štejemo trombocite, naredimo enako kot za DKS.

Delo

1. Pripravite ves pribor in razmastite objektna stekla z alkoholom (po večkratni uporabi stekla razmastite tudi v plamenu plinskega gorilnika).
2. Premešajte kri in pipetirajte po eno kapljico krvi volumna cca. $10 \mu\text{L}$ na več objektnih stekel.
3. Izdelajte razmaze pod kotom, izberite dva najboljša razmaza, ju posušite in preverite pod suho povečavo mikroskopa gostoto celic. Če noben od izdelanih razmazov ni primeren, nadaljujte izdelavo krvnih razmazov in po potrebi zamenjajte brušena razmazna stekla.

4. Dva najboljša krvna razmaza označite in do barvanja shranite na suhem prostoru, zaščitena pred prahom.
-

Rezultat

Ocena gostote najboljšega razmaza, mikroskopiranega pri 100-kratni povečavi, če pregledamo vsaj dva pasova vidnih polj po širini razmaza (obkrožite primeren odgovor):

- a. razmaz ima dovolj širok del prave gostote
- b. razmaz je pregost
- c. razmaz prehitro prehaja iz redkega dela v pregosti del
- d. razmaz je stopničast

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:

Računske naloge

1. MCV je 85 fL, Ht je 0,40. Kolikšna je številčna koncentracija eritrocitov?

2. MCH je 30 pg, številčna koncentracija eritrocitov pa je $5,0 \times 10^{12}/L$. Kolikšna je masna koncentracija hemoglobina?

3. Masna koncentracija hemoglobina je 140 g/L, MCHC je 320 g/L. Kolikšna je vrednost hematokrita?

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

30 INDIREKTNO MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE TROMBOCITOV V VENSKI KRVI - II

30.1 BARVANJE KRVNIH RAZMAZOV PO PAPPENHEIMU

Teoretične osnove so napisane v predhodni vaji.

Postopek

Krvne razmaze barvamo enako kot za DKS, vendar s to razliko, da jih moramo pustiti v razredčenem reagentu po Giemsi najmanj 30 minut.

Pribor in material:

- krvni razmazi, izdelani v predhodni vaji, staničevina,
- posodice z nosilnimi stojali in pokrovi za barvanje krvnih razmazov,
- May-Grünwaldov reagent, reagent po Giemsi, koncentrirani fosfatni pufer s pH 6,8,
- čaše, merilni valji, pipete (od 1 do 5 mL),
- destilirana voda, vodovodna voda.

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
 2. Pripravite preračunan volumen razredčenega fosfatnega pufera in razredčene raztopine po Giemsi.
 3. V vsako od posodic nalijte: May-Grünwaldov reagent, razredčen fosfatni pufer in razredčen reagent po Giemsi.
 4. Barvajte na enak način kot za diferencialno krvno sliko (7. vaja), le da morate pustiti razmaze v razredčenem reagentu po Giemsi vsaj 30 minut.
 5. Razmaze sperite pod tekočo vodo, posušite na zraku in pospravite.
-

Aktivnosti pri vaji

Med vajo sem opravil/a naslednja dela:

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

31 INDIREKTNO MERJENJE ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE TROMBOCITOV V VENSKI KRVI - III

31.1 ŠTETJE TROMBOCITOV IN IZRAČUN ŠTEVILČNE KONCENTRACIJE

Teoretične osnove

Trombocite in eritrocite štejemo pod imerzijsko povečavo s cikcak tehniko. Če nam mikroskop to omogoča, v okular vstavimo okence iz papirja, ki nam omeji vidno polje. Pred tem določimo vodilno oko in vstavimo okence na tisto stran, na kateri imamo vodilno oko.

$$\text{Relativni delež Trci} = \frac{\text{število Trci}}{1000 \text{ Erci}}$$

$$\text{Št. konc. Trci} = \text{relativni delež Trci} \cdot \text{št. konc. Erci}.$$

Če ne uspemo prešteti 1000 eritrocitov ali je število prešteti eritrocitov višje od 1000, se upošteva število prešteti trombocitov na število prešteti eritrocitov in izračunani kvocient množi s številčno koncentracijo eritrocitov.

Primer

Prešteli smo 55 trombocitov na 895 eritrocitov. Št. konc. Erci = $5,0 \times 10^{12}/L$

$$\text{Relativni delež Trci} = \frac{55}{895} = 0,06145$$

$$\text{Št. konc. Trci} = 0,06145 \cdot 5,0 \cdot 10^{12}/L = 307 \times 10^9/L$$

Pribor in material:

- mikroskop in pribor za mikroskopiranje z imerzijsko povečavo, papirnata okenca,
- po Pappenheimu obarvan krvni razmaz, ki se je v Giemsi barval vsaj 30 minut.

Številka vzorca:

Št. konc. Erci =

Delo

1. Določite vodilno oko in če vam mikroskop to omogoča, vstavite okence v enega od okularjev.
2. Pod imerzijsko povečavo preštajte vse trombocite na ~1000 eritrocitov in izračunajte relativni delež, nato pa še številčno koncentracijo trombocitov.
3. Izračunajte % odstopanja od prave vrednosti in obrazložite rezultat.

Dobljene vrednosti in računiŠtevilo prešteti eritrocitov in trombocitov

	število eritrocitov	število trombocitov	Erci + Trci
skupaj			

Relativni delež Trci =

Rezultat: št. konc. Trci =

Odstopanje rezultata od prave vrednosti

Prava vrednost, dobljena s hematološkim analizatorjem =

$$\% \text{ odstopanja od prave vrednosti} = \frac{\text{dobljena vrednost} - \text{prava vrednost}}{\text{prava vrednost}} \cdot 100 = \dots\dots\dots$$

Obrazložitev rezultata

Opišite kvaliteto narejenega razmaza in ovrednotite rezultat štetja. Kaj je lahko vzrok za neustrezen krvni razmaz in morebitno napačno vrednost številčne koncentracije trombocitov?

.....

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:



Domača naloga

1. Rezultat katere od obeh preiskav: štetje trombocitov v komorici ali štetje trombocitov iz krvnega razmaza, je točnejši in zakaj?

.....
.....

2. Zakaj se pri štetju trombocitov v komorici za redčenje krvi uporablja hipotonična raztopina?

.....

3. Navedite referenčno vrednost za številčno koncentracijo trombocitov v krvi za odrasle.

.....

4. Kolikšen je normalni premer trombocitov? Primerjajte ga z velikostjo eritrocitov.

.....

5. Zakaj moramo za indirektno štetje trombocitov pustiti razmaze v razredčeni raztopini po Giemsi vsaj 30 minut?

.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

32 OGLED CELIC GRANULOCITNE VRSTE IN DIFERENCIRANJE POMIKA V LEVO

Teoretične osnove

Skupna značilnost celic granulocitne vrste je prisotnost granulacij v citoplazmi. Le prva razvojna stopnja celic granulocitne vrste (mieloblast) ne vsebuje granulacij, medtem ko jih v manjšem številu vsebujejo nekateri levkemični mieloblasti.

Pomik v levo pomeni prisotnost nezrelih celic granulocitne vrste v krvi. Pojavlja se pri infekcijah, boleznih krvotvornih organov in tudi pri nekaterih anemijah. Pogosto je poleg pomika v levo v krvnih razmazih prisoten tudi pojav normoblastov, kar s skupnim izrazom imenujemo **levkoeritroblastna krvna slika** ali **levkoeritroblastoza**. Večji ko je pomik v levo, več nezrelih celic granulocitne vrste je v krvi in bolj so te celice nezrele. Prisotnost blastov v krvi lahko pomeni tudi levkemijo.

Pomik v levo kot tudi levkoeritroblastoza se ne vpisujeta pod opombe, ampak je to razvidno že iz rezultatov diferenciranja.

Pribor in material:

- mikroskop in pribor za mikroskopiranje z imerzijsko povečavo,
- krvni razmazi z zvišanim relativnim deležem celic nevtrofilne vrste oziroma z levkoeritroblastozo, barvice.

Številka razmaza:

Delo

1. Kanite imerzijsko olje na najtanjši del krvnega razmaza in poiščite pravo gostoto celic.
 2. Poiščite blast (mieloblast), promielocit, mielocit in metamielocit, te celice opišite in narišite ter jih primerjajte s fotografijami. Zraven za primerjavo velikosti narišite še eritrocit.
 3. Opišite in narišite eozinofilec in bazofilec.
 4. Opazujte posebnosti rdeče vrste, trombocitov in granulocitov ter jih zapišite pod opombe.
 5. Razmaz diferencirajte po cikcak tehniki.
-

Rezultati

Opombe (posebnosti eritrocitov, granulocitov in trombocitov):

Opis in risbe posameznih celic

Opis blasta ali mieloblasta:	Risba blasta in eritrocita.
Opis promielocita:	Risba promielocita in eritrocita.
Opis mielocita:	Risba mielocita in eritrocita.

Opis metamielocita:	Risba metamielocita in eritrocita.
Opis eozinofilca:	Risba eozinofilca in eritrocita.
Opis bazofilca:	Risba bazofilca in eritrocita.

Rezultat diferenciranja

ime celic	število celic	rel. delež
blasti		
promielociti		
mielociti		
metamielociti		
pal. nevt. gran.		
seg. nevt. gran.		
limfociti		
monociti		
eozinofilci		
bazofilci		
skupaj (vsi levkociti)		1,00
polikr. normoblasti		
ortokr. normoblasti		

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:

Domača naloga

- Kakšna je barva primarnih granulacij in kakšna je barva specifičnih granulacij?
.....
.....
- Kaj pomenita izraza primaren in specifičen v primeru granulacij in tudi na splošno?
.....
.....
- Kaj pomeni pojem pomik v levo?
- Pri katerih boleznih se pojavlja pomik v levo?
- Kako se spreminjajo celice granulocitne vrste z dozorevanjem glede na strukturo jedra, obliko jedra in pojav jedrc?

.....

.....

.....

6. Kako se spreminja citoplazma celic granulocitne vrste, ko celice dozorevajo?

.....

.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum:

33 OGLED MONONUKLEARNIH CELIC IN DIFERENCIRANJE

Teoretične osnove

Izraz mononukleoza dobesedno pomeni prisotnost večjega števila enojedrnih celic v krvi, v prenesenem pomenu pa prisotnost večjega števila celic z nesegmentiranim jedrom. V hematologiji pomeni izraz mononukleoza povečanje števila krvnih celic, ki nimajo segmentiranega jedra (limfocitov, atipičnih limfocitov, plazmatk in monocitov).

Večje število mononuklearnih celic je značilnost različnih virusnih obolenj. Pri oslovskem kašlju ali pertussisu, ki ga povzroča bakterija *Bordetella pertussis*, opazimo v krvi večje število limfocitov z zažetim jedrom, ki jih imenujejo Riederjeva oblika jedra. Pri virusni bolezni, imenovani infekcijska mononukleoza, se v krvi pojavlja povišano število celokupnih limfocitov, zelo veliko število neobičajnih (atipičnih) limfocitov, zmerno zvišano število monocitov in posamezne plazmatke. Infekcijsko mononukleozo lahko potrdimo že z diferenciranjem krvnega razmaza.

Pribor in material:

- mikroskop in pribor za mikroskopiranje z imerzijsko povečavo, barvice,
- krvni razmaz z zvišanim številom mononuklearnih celic (infekcijska mononukleoza).

Številka razmaza:

Delo

1. Poiščite pravo gostoto celic v krvnem razmazu.
 2. Poiščite mali in veliki limfocit, atipični limfocit in monocit ter opišite razlike med velikim limfocitom, atipičnim limfocitom in monocitom.
 3. Narišite nekaj atipičnih limfocitov.
 4. Preštejte in diferencirajte 100 ali 200 levkocitov.
 5. Izračunajte relativne deleže in jih vpišite v tabelo, pod opombe pa vpišite nepravilnosti eritrocitov, trombocitov in levkocitov.
-

Rezultati

Risba večjega števila atipičnih limfocitov in eritrocita.

Opis posameznih celic, značilnih za mononukleozo

značilnosti	veliki limfocit	atipični limfocit	monocit
<u>jedro:</u>			
gostota
oblika
jedrca
<u>citoplazma:</u>			
barva
granulacije
premer celice			
<u>razmerje</u>			
jedro/citoplazma

Rezultat diferenciranja

Opombe (posebnosti eritrocitov, granulocitov in trombocitov):

ime celic	število celic	rel. delež
pal. nevt. gran.		
seg. nevt. gran.		
limfociti		
monociti		
eozinofilci		
bazofilci		
atipični limfociti		
plazmatke		
skupaj		

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:



Domača naloga

1. Kaj dobesedno pomeni izraz mononuklearna celica in kaj v prenesenem pomenu?

.....

2. Poimenujte mononuklearne celice.

3. Vloga limfocitov je

4. Vloga monocitov je

5. Vloga plazmocitov je

6. Opišite morfološke razlike med limfociti in monociti.

.....

7. Kako ločimo veliki limfocit od atipičnega limfocita? Po čem prepoznamo, da sta oba limfocita?

.....

8. Kako ločimo monocit od atipičnega limfocita in v čem sta si podobna?

.....

.....

.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum:

34 MIKROSKOPIRANJE ODTISNJENCA KOSTNEGA MOZGA

34.1 OGLED MEGAKARIOCITOV, BLASTOV IN CELIC RHS V KOSTNEM MOZGU

Teoretične osnove

Največja celica v kostnem mozgu je megakariocit. Najlažje ga poiščemo, če pregledamo kostni mozeg pod malo povečavo. Najpogosteje ga najdemo na obrobju v najredkejšem delu ali pa v gostejšem delu razmaza kostnega mozga. Poleg krvnih celic so v kostnem mozgu tudi druge celice, ki jih ne uvrščamo med krvne celice. To so pitanke, osteoblasti, osteoklasti, maščobne celice, makrofagi idr. Nekrvne celice v kostnem mozgu, ki imajo večinoma obrambno funkcijo, imenujemo celice RHS (retikulohistiocitnega sistema). Značilnost teh celic je, da so dokaj velike, citoplazma je nejasno omejena, jedro pa je pogosto zelo rahle strukture in vsebuje jasno vidna jedrca.

Pribor in material:

- mikroskop in pribor za mikroskopiranje z imerzijsko povečavo,
- odtisnjenec kostnega mozga, barvice.

Številka odtisnjenca:

Delo

1. Poiščite megakariocit pod malo povečavo, nato pa si ga oglejte pod imerzijsko povečavo. Opišite in narišite ga.
 2. Poiščite in si oglejte celice RHS pod imerzijsko povečavo ter opišite in narišite tisto celico RHS, ki ste jo prepoznali.
 3. Poiščite nekaj blastov in jih tudi narišite.
-

Rezultati

Opis megakariocita:	Risba megakariocita in eritrocita.
Opis celice RHS:	Risba celice RHS in eritrocita.
Opis blasta:	Risba blastov in eritrocita.

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum:

35 TESTNA VAJA: DIFERENCIRANJE

Teoretične osnove

Pri diferenciranju je pomembno, da obvladamo tehniko diferenciranja in stoodstotno poznavanje krvnih celic. Če nismo prepričani, za katero celico gre, si moramo zaradi primerjave pogledati še nekaj sosednjih celic. V pomoč nam bo slikovno gradivo in teoretično znanje. Pri velikosti celic se orientiramo na eritrocit, katerega premer je od 7 do 8 μm . Celice moramo gledati kompleksno: velikost, razmerje med jedrom in citoplazmo, oblika in struktura jedra, barva citoplazme in v njej prisotni vključki, npr. barva granulacij, vakuole idr. Napačno je, da na osnovi ene same lastnosti sklepamo, za katero celico gre. Npr: ekscentrično jedro ni značilno samo za plazmatko.

Pribor in material:

- mikroskop in pribor za mikroskopiranje z imerzijsko povečavo,
- obarvan krvni razmaz.

Številka razmaza:

Delo

1. Pod imerzijsko povečavo poiščite pravo gostoto celic v krvnem razmazu.
 2. Mikroskopirajte po cikcak tehniki in si zapisujte število posameznih levkocitov.
 3. Preštejte in diferencirajte 100 ali 200 levkocitov ter izračunajte relativni delež posameznih.
 4. Med štetjem celic opazujte posebnosti rdeče vrste, trombocitov in granulocitov ter jih na koncu zapišite pod opombe.
 5. Izračunajte relativne deleže posameznih levkocitov in jih vpišite v tabelo.
-

Rezultati

Opombe (posebnosti eritrocitov, granulocitov in trombocitov):

Rezultat diferenciranja

ime celic	število celic	rel. delež	pravilne vrednosti
pal. nevt. gran.			
seg. nevt. gran.			
limfociti			
monociti			
eozinofilci			
bazofilci			
atipični limfociti			
plazmatke			
skupaj			

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

36 MERJENJE ČASA KAPILARNE KRVAVITVE PO DUKEJU

Teoretične osnove

S časom kapilarne krvavitve testiramo žilnotrombocitno obdobje hemostaze. Najpogosteje se preiskava izvaja pred operacijami.

S testom časa kapilarne krvavitve po Dukeju ugotavljamo, po kolikšnem času se bo ustavila krvavitev iz ušesne mečice, če le-to vbodemo z lanceto.

Pribor in material:

- filtrirni papir, škarje,
- lancete, sterilna gaza ali vata, razkužilo (70–80 % etanol),
- merilni uri (štoparici).

Priimek in ime preiskovanca:

Postopek

Ušesno mečico zmasiramo, da povečamo prekrvavitev, napnemo in razkužimo. Nato vbodemo z lanceto, vklopimo merilno uro in izločeno kapljico krvi previdno popivnemo z vogalom filtrirnega papirja.

Kri pivnemo vsakih 15 do 20 sekund, dokler na filtrirnem papirju ni več sledi krvi. Takrat izklopimo merilno uro. Čas kapilarne krvavitve izmerimo na obeh ušesih in izračunamo povprečje obeh meritev.

Paziti moramo, da med pivnanjem ne odstranimo trombocitnega zamaška.

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
 2. Narežite več koščkov filtrirnega papirja.
 3. Izvedite meritev po predpisanem postopku in zapišite rezultat kot povprečno vrednost dveh meritev.
 4. Obrazložite rezultat.
-

Meritve in rezultat

Prva meritev:

Druga meritev:

Povprečna vrednost obeh meritev ali čas krvavitve je

Obrazložitev rezultata

Kaj vam pove dobljeni rezultat?

.....

.....

.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:



Domača naloga

1. Poimenujte teste prvega obdobja hemostaze?

.....

.....

.....

2. Kaj nam pove čas krvavitve?

.....

.....

.....

3. Pri katerih bolezenskih stanjih se čas krvavitve podaljša?

.....

.....

.....

4. Zakaj je čas krvavitve po Ivyju natančnejši?

.....

.....

.....

Pregledal/a:

Opombe:

Datum: _____

37 MERJENJE AKTIVIRANEGA REKALCIFIKACIJSKEGA ČASA

Teoretične osnove

Pri koagulaciji krvi sodelujejo vsi faktorji koagulacije, ki so prisotni v plazmi, vključno s kalcijevimi ioni (faktor IV). Citratna kri vsebuje antikoagulant natrijev citrat, ki veže ioniziran kalcij v kompleks in zato koagulacija ne more potekati.

Če hočemo iz krvi dobiti plazmo, bogato s trombociti, moramo kri centrifugirati pri nizkem številu vrtljajev. Po dodatku prebitka kalcijevih ionov bo plazma koagulirala, koagulacijo pa pospeši kontaktni aktivator (suspenzija celita ali kaolina), ki igra vlogo hrapave površine. Prebitek kalcijevih ionov veže preostali del prostega antikoagulanta, ostane pa še dovolj ioniziranega kalcija, da sproži koagulacijo.

Rekalcifikacijski čas je test hemostaze, s katerim so včasih testirali notranjo pot koagulacije in aktivnost trombocitov. Izvajali so ga v vodni kopeli pri 37 °C, zaradi subjektivnih napak in nestabilnosti trombocitov pa je danes v laboratorijski praksi opuščena. Subjektivne napake so posledica slabšega vida preiskovanca in njegovih manjših ročnih spretnosti.

Zaradi enostavnosti, poceni reagentov in učenja dela v vodni kopeli je izvedba testa primerna za učenje enega od testov koagulacije v vodni kopeli in za opazovanje, kaj se bo zgodilo po dodatku prebitka kalcijevih ionov v plazmo.

Rekalcifikacijski čas moramo, tako kot druge teste koagulacije, izvajati v paraleli.

Referenčne vrednosti: 32–48 sekund.

Pribor in material:

- vodna raztopina celita ali kaolina (10 g/L), vodna raztopina CaCl_2 (25 mmol/L),
- pipete (100 μL), epruvete, čaše, alkoholni flomaster,
- vzorec (citratna plazma), kontrolna plazma z rekalcifikacijskim časom v mejnih vrednostih,
- vodna kopel, merilne ure.

Številka vzorca:

Postopek

Kot vzorec uporabljamo citratno plazmo, dobljeno s centrifugiranjem krvi (15 minut pri 400 x g = cca. 800 vrt./min).

V vodni kopeli segrejemo raztopino CaCl_2 na temperaturo 37 °C.

V dve stekleni epruveti (centrifugirki) vnesemo po 0,1 mL plazme in 0,1 mL suspenzije celita ali kaolina.

plazma	suspenzija celita (kaolina)
100 μL	100 μL

Zmes plazme in celita segrevamo najmanj 6 minut pri temperaturi 37 °C.

Segreti zmesi plazme in celita dodamo 0,1 mL segrete vodne raztopine CaCl_2 in sprožimo merilno uro (štoparico). Po dodatku CaCl_2 zmes med segrevanjem ves čas mešamo in opazujemo, kdaj se bodo pojavile prve fibrinske nitke. Takrat izklopimo merilno uro in si zapišemo čas v sekundah.

Izmerimo rekalcifikacijski čas obeh paralel in izračunamo povprečje meritev.

Po istem postopku izvedemo rekalcifikacijski čas kontrolne plazme.

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
 2. Segrejte vodno kopel na temperaturo 37 °C.
 3. V epruveto nalijte raztopino CaCl_2 in jo segrejte v vodni kopeli na temperaturo 37 °C.
 4. Izvedite meritvi po predpisanem postopku in vpišite rezultat.
 5. Obrazložite rezultat.
-

Meritve in rezultat

Prva meritev =

Druga meritev =

Povprečna vrednost obeh meritev =

Obrazložitev rezultata

Kaj vam pove dobljeni rezultat?

.....
.....
.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:



Domača naloga

1. Katere dejavnike hemostaze testiramo z rekalcifikacijskim časom?
.....
2. Zakaj dodatek prebitka kalcijevih ionov k plazmi povzroči njeno koagulacijo?
.....
.....
3. Kaj vpliva na rezultat meritve rekalcifikacijskega časa?.....
.....
.....
4. Zakaj je za izvedbo testa potrebna temperatura 37 °C?
.....
5. Zakaj je za pridobivanje plazme pri izvajanju rekalcifikacijskega časa potrebno majhno število vrtljajev na minuto pri centrifugiranju?
.....
6. Kakšno vlogo ima pri izvedbi rekalcifikacijskega časa celit ali kaolin, ki ga dodamo plazmi?
.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

38 MERJENJE PROTROMBINSKEGA ČASA S KOAGULOMETROM

Teoretične osnove

Protrombinski čas (PČ) ali Quickov test, za katerega bi bilo ustrežnejše ime tromboplastinski čas, je hiter in enostaven test za ugotavljanje napak v zunanji in skupni poti koagulacije. Izvajamo ga s koagulometri različnega tipa, ki delujejo pri temperaturi 37 °C. Enako kot druge teste koagulacije, tudi protrombinski čas izvajamo v paraleli in upoštevamo povprečno vrednost obeh meritev.

Rezultat testa je izračunana vrednost INR. Pri izračunu je upoštevana aktivnost tkivnega tromboplastina (faktorja III), ki ga dodajamo skupno s kalcijevimi ioni v plazmo preiskovanca. Test so včasih izvajali v vodni kopeli, danes pa se uporablja natančnejši in zanesljivejši koagulometer.

Princip testa

Princip testa je pri delu na vseh koagulometrih enak. Plazmi dodamo mešanico tkivnega tromboplastina in kalcijevih ionov ter merimo čas nastanka fibrinskega strdka ali koaguluma. V koagulometer vnesemo vrednosti normalne (kontrolne) plazme in ISI, iz česar nam na osnovi izmerjenega protrombinskega časa (PČ) preiskovane plazme izračuna INR. Instrument namreč primerja čas nastanka koaguluma preiskovane plazme s protrombinskim časom normalne (kontrolne) plazme tako, da izračuna razmerje med njima in kvocient potencira z ISI. Protrombinski čas normalne plazme določi vsak laboratorij posebej iz plazme številnih zdravih ljudi. Razlika med delom na posameznih koagulometrih je v tem, da pri enih uporabljamo kot startni reagent plazmo, pri drugih pa reagent (pri merjenju protrombinskega časa je to mešanica faktorja III in kalcijevih ionov).

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{PČ preiskovane plazme}}{\text{PČ kontrolne plazme}} \right)^{\text{ISI}}$$

ISI = »International Sensitivity Index« ali mednarodni kazalec občutljivosti (v prostem prevodu pomeni aktivnost faktorja III)

INR = International Normalized Ratio ali mednarodno umerjeno razmerje

Referenčne vrednosti za INR: 0,7–1,2

Pribor in material:

- citratna plazma, dobljena s centrifugiranjem krvi pri 2000 x g,
- komercialna zmes tromboplastina in kalcijevega klorida,
- pipeti (100 µL in 200 µL),
- merilne kivete in mešalčki,
- koagulometer HUMACLOT.

Številka vzorca:

Humaclo – navodilo za delo

1. Vključitev aparata – zadaj. Počakamo, da se segreje – lučka sveti.
2. Izbira programa (PČ preiskava): **0** in potrdimo z **ENTER**.
3. Odtipkamo datum: **dan** in **ENTER**, **mesec** in **ENTER**, **leto** in **ENTER** – za dan, mesec in leto vtipkamo po dve številki.
4. Inkubiramo prazne kivete z mešalčki pri temperaturi 37 °C.
5. V kivete pipetiramo po 200 µL reagenta točno na sredino, vstavimo v prazen prostor aparata in termostatiramo 5 minut na sledeč način: **RESET 5 • 00 START/STOP**. Aparat začne odšteti 5-minutni čas inkubacije.
6. Vpis identifikacijske številke (št. vzorca) pred testiranjem vzorca:
• **1 (št. vzorca) ENTER RESET**.
7. V merilni prostor vstavimo napipetiran reagent in odtipkamo **RESET**, pokaže se vrednost **0,0**.
8. V reagent pipetiramo 100 µL vzorca.

Sproži se koagulacija, vklopi se merilna ura in instrument po končani reakciji koagulacije pokaže na zaslonu vrednost PČ v sekundah ter izpiše ostale rezultate (INR, relativni delež, aktivnost).

Če želimo, da instrument natisne programirane vrednosti, vtipkamo:

0 ENTER 99 ENTER START/STOP.

Umerjanje instrumenta na 25-odstotno in 100-odstotno kontrolno plazmo, na vrednost ISI in minimalni varnostni čas meritev (0,1, 2, 7)

1. Če je protrombinski čas koagulacije 25-odstotne kontrolne plazme 28,0 sekund, to vrednost vnesemo takole: **0 28 • 0 ENTER**.
2. Če je protrombinski čas koagulacije 100-odstotne kontrolne plazme 11,2 sekund, to vrednost vnesemo takole: **1 11 • 2 ENTER**.
3. Če je ISI za določen reagent 1,10, to vrednost vnesemo takole: **2 1 • 10 ENTER**.
4. Če je minimalni čas meritve 5 sekund, to vrednost vnesemo takole: **7 5 • 00 ENTER**.

Nove vrednosti shranimo s pritiskom na **START/STOP**.

Delo

1. Iz mešanice plazme zdravih pacientov določite protrombinski čas ali pa uporabite komercialno kontrolno plazmo.
 2. Izvedite meritev vzorca plazme v paraleli po navodilih za HEMACLOT.
 3. Izračunajte povprečje obeh meritev v sekundah in zapišite rezultat kot povprečno vrednost INR.
 4. Obrazložite rezultat.
-

Meritve in rezultat

Prva meritev v sekundah =

Druga meritev v sekundah =

Povprečna vrednost obeh meritev v sekundah =

INR prve meritve =

INR druge meritve =

Povprečna vrednost INR =

Obrazložitev rezultata

Kaj vam pove dobljeni rezultat?

.....
.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:



Domača naloga

1. Katere dejavnike (faktorje) hemostaze testiramo s protrombinskim časom?

.....

.....

2. Kaj vpliva na točnost rezultata meritve protrombinskega časa?

.....

3. Opišite princip in postopek merjenja protrombinskega časa.

.....

.....

.....

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

39 MERJENJE APTČ S KOAGULOMETROM

Teoretične osnove

Z aktiviranim parcialnim tromboplastinskim časom (APTČ) ugotavljamo motnje v notranji in skupni poti koagulacije. Tudi ta test izvajamo s koagulometri pri temperaturi 37 °C v paraleli. Rezultat testa je čas v sekundah. Kot pri drugih testih koagulacije, mora tudi pri tej preiskavi vsak laboratorij izdelati svoje referenčne vrednosti.

Princip testa

Princip merjenja APTČ je pri delu na vseh koagulometrih enak. Plazmi dodamo mešanico parcialnega tromboplastina in kontaktnega aktivatorja, nato pa še prebitek kalcijevih ionov ter merimo čas nastanka koaguluma.

HumacLOT – navodilo za delo

1. Vključitev aparata – zadaj. Počakamo, da se segreje – lučka sveti.
2. Izbira programa (APTČ preiskava): **1** in potrdimo z **ENTER**.
3. Odtipkamo datum: **dan** in **ENTER**, **mesec** in **ENTER**, **leto** in **ENTER** – za dan, mesec in leto tipkamo po dve številk.
4. Inkubiramo prazne kivete z mešalčki in raztopino CaCl_2 pri temperaturi 37 °C.
5. V merilne kivete pipetiramo po 100 μL APTČ reagenta³ točno na sredino, vstavimo v prazen prostor koagulometra in inkubiramo pri temperaturi 37 °C eno minuto takole:
RESET 1 · 00 START/STOP.
Aparat začne odšteti enominutni čas inkubacije.
6. Vpis identifikacijske številke (št. vzorca) pred testiranjem vzorca:
• **1 (št. vzorca) ENTER RESET**.
7. Previdno dodamo 100 μL plazme (kontrolne ali vzorca) in pri tem pazimo, da se ne tvorijo mehurčki, ter ponovno inkubiramo 3 minute.
8. Merilno kiveto z zmesjo narahlo pretresemo, vstavimo v merilni prostor in pokrijemo s pokrovom.
9. V zmes pipetiramo 100 μL predhodno segrete raztopine CaCl_2 , sproži se potek koagulacije in istočasno se vklopi merilna ura.
10. Ko nastane koagulum, se ura ustavi in na zaslonu se izpiše rezultat v sekundah.

³ APTČ reagent je zmes parcialnega tromboplastina in kontaktnega aktivatorja.

Pribor in material:

- citratna plazma, dobljena s centrifugiranjem krvi na 2000 x g,
- APTČ reagent, raztopina CaCl_2 ,
- merilne kivete in mešalčki,
- pipete (100 μL),
- koagulometer HUMACLOT.

Številka vzorca:

Delo

1. Iz mešanice plazme zdravih ljudi določite APTČ ali pa uporabite komercialno kontrolno plazmo.
 2. Izvedite meritev vzorca plazme v paraleli po navodilih za HEMACLOT.
 3. Izračunajte povprečje obeh meritev v sekundah in zapišite rezultat kot povprečno vrednost.
 4. Obrazložite rezultat.
-

Meritve in rezultat

Prva meritev v sekundah =

Druga meritev v sekundah =

Povprečna vrednost obeh meritev v sekundah =

Obrazložitev rezultata

Kaj vam pove dobljeni rezultat?

.....
.....

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a: _____

Opombe:

Datum: _____

40 FIBRINOLIZA EVGLOBULINSKEGA STRDKA

Teoretične osnove

Test fibrinoliza evglobulinskega strdka spada v skupino testov fibrinolize. V plazmi so prisotni vsi faktorji koagulacije, razen faktorja III. Poleg njih plazma vsebuje tudi plazminogen in njegove aktivatorje. Vsi faktorji so v neaktivni obliki. V tako imenovanih evglobulinih, ki jih dobimo z nakisanjem razredčene plazme pri 4 °C, so faktorji koagulacije in fibrinolize, ni pa zaviralcev fibrinolitičnega sistema.

Če raztopini evglobulinskega precipitata pri temperaturi 37 °C dodamo prebitek kalcijevih ionov, se sproži koagulacija. Takoj ko nastane fibrinski strdek (koagulum), se začne fibrinoliza. Pri testu fibrinolize evglobulinskega strdka merimo čas, ki je potreben za raztopitev nastalega strdka. Rezultat testa se po SI izraža v kilosekundah (ks).

Referenčne vrednosti: 4,2–13,5 ks.

Pribor in material:

- citratna kri (razmerje med krvjo in natrijevim citratom je 1 : 10) ali citratna plazma,
- vodna raztopina očetne kisline (10,5 g/L), destilirana voda,
- raztopina Owrenovega pufra s pH 7,35 (barbituratni puffer),
- vodna raztopina CaCl₂, (25 mmol/L),
- čaša, centrifugirke, steklene palčke,
- avtomatske pipete (7 mL, 0,5 mL, 0,25 mL),
- merilna ura,
- centrifuga, vodna kopel, hladilnik.

Postopek

Vzorec citratne krvi centrifugiramo 15 minut pri 2000 x g ali uporabimo že centrifugirano in odlito plazmo.

V hladilnik postavimo čašo z destilirano vodo, da dobimo ledenomrzlo vodo. Vodo lahko postavimo tudi za kratek čas v zamrzovalnik.

V dve epruveti pipetiramo po 0,5 mL plazme in dodamo po 7 mL ledeno mrzle vode (4 °C).

V vsako epruveto dodamo po 2 kapljici razredčene vodne raztopine očetne kisline s konc. 10,5 g/L.

plazma	ledeno mrzla voda	razr. očetna kisl.
0,5 mL	7 mL	2 kapljici

Epruveti postavimo v hladilnik za 10 minut, da se evglobulini oborijo.

Centrifugiramo 10 minut pri 2000 x g in tekočino nad oborino odlijemo.

Oborini dodamo 0,5 mL Owrenovega pufra in jo raztopimo z rahlim mešanjem s stekleno palčko. Ko se oborina raztopi, zmesi dodamo 0,25 mL vodne raztopine CaCl₂.

Epruveti postavimo v vodno kopel na 37 °C in sprožimo merilni uri.

Izmerimo čas, v katerem se evglobulinski precipitat popolnoma raztopi (lizira), in izračunamo povprečni čas obeh meritev. Posamezni meritvi se ne smeta razlikovati za več kot $\pm 10 \%$. Rezultat izrazimo v kilosekundah (ks).

Številka vzorca:

Delo

1. Pripravite ves pribor in material.
 2. Izvedite analizo po predpisanem postopku.
 3. Po nekaj urah si oglejte rezultat in ga izrazite v urah in minutah, le-tega pa spremenite v kilosekunde. Obrazložite rezultat.
-

Rezultat

Prva meritev =

Druga meritev =

Povprečna vrednost obeh meritev =

Obrazložitev rezultata

Kaj vam pove dobljeni rezultat?

.....



Domača naloga

1. Kakšen pomen ima za organizem fibrinoliza?
2. Na kaj razgradi plazmin molekulo fibrina?
3. Kateri so načini ugotavljanja aktivnosti fibrinolitičnega sistema?
4. Kako imenujemo neaktivno obliko plazmina?
5. Kaj vsebuje precipitat evglobulinov?

Vaja je opravljena: da ne

Pregledal/a:

Opombe:

LITERATURA

1. M. Žemva, Laboratorijska diagnostika, DZS, Ljubljana, 1968.
2. B. J. Bain, Blood cells, A practical guide Talstadt, Problems in microscopic and automatic cell differentiation of blood cell suspensions, Scandinavian Journal of Clinical Haematology, 26, 398-406, 1981.
3. Hematological Laboratory Methods, 3rd Edition, Diagnostica Merck, Darmstadt, 1984.
4. N. Jesenovec idr., Izabrani postupci analiza u kliničko biokemijskim laboratorijama, Društvo medicinskih biokemičara Jugoslavije, 1987.
5. M. Kobe, M. Potočnik, Vaje iz hematologije – učbenik, SŠFZ, Ljubljana, 1989.
6. E. C. Besa in sod., Hematology, Harwal Publishing, 1992.
7. J. B. Henry, M. D., Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 19th edition, W. B. Saunders company, New York, 1996.
8. Veliki splošni leksikon, DZS, Ljubljana, 1997.
9. J. M. Kobe, Priporočeni postopek za odvzem kapilarne krvi, Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 1999.
10. M. Piskar, Priporočeni postopek za odvzem venske krvi, Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 1999.
11. B. Pivk, Analizna kemija - instrumentalne analize, SŠFKZ, Ljubljana, 2001.
12. B. Pivk, Analizna kemija - vaje, delovni zvezek, Elanda, Ljubljana, 2003.
13. B. Pivk, Laboratorijska hematologija, Elanda, Ljubljana, 2003.
14. A. Ferlan, F. Vrečer, Metode amorfizacije zdravilnih učinkovin, Farm. vest. 11–21, 2004.