
PRIPOROČENI POSTOPKI ZA MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA

**Klementina Berce, Elizabeta Božnar Alič,
Helena Podgornik, Alenka Trampuš Bakija,
Darja Žontar**

SZK \rightarrow MLM

Slovensko združenje za klinično
kemijo in laboratorijsko medicino

1
0

Ta priporočila izdaja in priporoča Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK). Priporočila so v skladu s predpisi Republike Slovenije, priporočili Mednarodnega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (IFCC-”International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine”) in Inštituta za klinične in laboratorijske standarde CLSI (”Clinical and Laboratory Standards Institute”).

Uredniški odbor: Saša Bratož (predsednica)
Pika Meško Brguljan
Evgenija Homšak

PRIPOROČENI POSTOPKI ZA MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA

Priprave: Klementina Berce, Elizabeta Božnar Alič, Helena Podgornik, Alenka Trampuš Bakija, Darja Žontar

Zbirka: Priporočeni postopki, številka 10

Izdalo: Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK)

Recenzentka: Modrica Kobe

Lektorica: Mojca Čakš

Tisk: Birografika Bori d.o.o.

Naklada: 500 izvodov (1. ponatis, februar 2015)

Predstavitev priporočenih postopkov za delo v klinično kemijskih laboratorijih Republike Slovenije ima namen, da se z obvezno uporabo le-teh doseže visoka stopnja kakovosti dela, upoštevajoč sistematizacijo dela, pribora in prostorov.

”Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza“ so namenjeni vsem sodelavcem v klinično kemijskih laboratorijih, zdravstvenim delavcem ter študentom in učencem zdravstvenih šol.

Priporočila je pregledal in odobril Razširjeni strokovni kolegij za laboratorijsko diagnostiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije in se uporabljajo za delo v vseh medicinskih laboratorijih.

Ljubljana, 2012

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

616.15-076(082)

PRIPOROČENI postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza /
Klementina Berce ... [et al.]. - Ljubljana : Slovensko združenje za
klinično kemijo (SZKK), 2012. - (Zbirka Priporočeni postopki ;
št. 10)

ISBN 978-961-92634-8-8

1. Berce, Klementina
259831808

Ta priporočila izdaja in priporoča Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK). Priporočila so v skladu s predpisi Republike Slovenije, priporočili Mednarodnega združenja za klinično kemijo in laboratorijsko medicino (IFCC-”International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine”) in Inštituta za klinične in laboratorijske standarde CLSI (”Clinical and Laboratory Standards Institute”).

Uredniški odbor: Saša Bratož (predsednica)
Pika Meško Brguljan
Evgenija Homšak

PRIPOROČENI POSTOPKI ZA MIKROSKOPSKI PREGLED KRVNEGA RAZMAZA

Priprave: Klementina Berce, Elizabeta Božnar Alič, Helena Podgornik, Alenka Trampuš Bakija, Darja Žontar

Zbirka: Priporočeni postopki, številka 10

Izdalo: Slovensko združenje za klinično kemijo (SZKK)

Recenzentka: Modrica Kobe

Lektorica: Mojca Čakš

Tisk: Birografuka Bori d.o.o.

Naklada: 600 izvodov

Predstavitev priporočenih postopkov za delo v klinično kemijskih laboratorijih Republike Slovenije ima namen, da se z obvezno uporabo le-teh doseže visoka stopnja kakovosti dela, upoštevajoč sistematizacijo dela, pribora in prostorov.

”Priporočeni postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza“ so namenjeni vsem sodelavcem v klinično kemijskih laboratorijih, zdravstvenim delavcem ter študentom in učencem zdravstvenih šol.

Priporočila je pregledal in odobril Razširjeni strokovni kolegij za laboratorijsko diagnostiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije in se uporabljajo za delo v vseh medicinskih laboratorijih.

Ljubljana, 2012

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

616.15-076(082)

PRIPOROČENI postopki za mikroskopski pregled krvnega razmaza /
Klementina Berce ... [et al.]. - Ljubljana : Slovensko združenje za
klinično kemijo (SZKK), 2012. - (Zbirka Priporočeni postopki ;
št. 10)

ISBN 978-961-92634-8-8

1. Berce, Klementina
259831808

PREGOVOR

Mikroskopski pregled krvnega razmaza je preiskava, ki je ključnega pomena pri diagnostiki hematoloških, infekcijskih in nekaterih imunskih obolenj. Preiskava ni avtomatizirana, zato za njeno izvedbo nujno potrebujemo dobro usposobljene ljudi z **izkušnjami** in **stalnostjo** dela. Pri izvajanju preiskave nimamo na voljo kontrol za zagotavljanje kakovosti, ki jih pri vsakodnevnem delu uporabljamo pri večini ostalih laboratorijskih preiskav. Prav tako ni nujno v pomoč večkratni pregled istega preparata, pa čeprav pregleda isti preparat več različnih preiskovalcev. Zanesti se moramo na preiskovalčevo znanje, saj je končna ocena pri zapletenih primerih še vedno stvar subjektivne presoje. Prav zato je toliko pomembnejše, da natančno predpišemo in opišemo vse, kar je pri tej preiskavi mogoče predpisati in določiti.

Odločilna pobuda za nastanek priporočenih postopkov je prišla iz vrst laboratorijskega osebja, ki se v različnih slovenskih medicinskih laboratorijih srečuje s težavami, povezanimi z mikroskopsko diferencialno krvno sliko. K težavam dodatno pripomore pomanjkanje ustreznih slovenske literature. Tudi v shemi slovenske zunanje kontrole kakovosti (SNEQAS) se je pokazalo, da je potrebno uskladiti izrazoslovje. Pri preverjanju trenutnega stanja smo se srečale z izrazito raznolikimi pristopi k preiskavi, tako kar zadeva naročanje in tehnično izvedbo kot tudi izdajo izvida. Avtorice smo zato k oblikovanju pričujočih postopkov pristopile tako, da smo preverile različne načine opisovanja najdb, ki se uporabljajo v vsakodnevni praksi, ter naredile temeljit pregled obstoječe domače in uveljavljene tuje literature. Pri priporočenih rešitvah smo se držale čimbolj enotnega pristopa pri vseh treh celičnih vrstah. Med strokovno ustreznimi rešitvami smo izbrale najenostavnejšo za vsakodnevno delo. Zato se, denimo, nismo odločile za številčne okvirje pri kvalitativnih ocenah (blago, zmerno, izrazito).

Verjetno bodo nekatere predložene rešitve in poimenovanja sprva naleteli na ugovore in terjali dodatna pojasnila. Zato se nam zdi ključno, da bo pisni izdaji priporočenih postopkov sledilo intenzivno izobraževanje izvajalcev in naročnikov preiskave. Z izobraževanjem laboratorijskega osebja smo delno že začeli v okviru stalnih izobraževanj, s katerimi bomo nadaljevali tudi v prihodnje. V sodelovanju s predavatelji Hematologije pa bodo priporočeni postopki vključeni tudi v kurikulum študija laboratorijske biomedicine prve in druge bolonjske stopnje. Verjamemo, da je v interesu laboratorijske stroke kot tudi naročnikov preiskav, da začnemo uporabljati enotne postopke in izrazoslovje.

Že samo soavtorstvo priporočenih postopkov dokazuje, da smo želele predlagati temeljito usklajene rešitve. Rešitve morajo strokovno podpirati povednost laboratorijskega izvida ter ustrezati trenutno veljavni klinični praksi. Zato smo jih dale v pregled tudi naročnikom preiskave. Za skrben pregled, dragocene predloge, mnenja in popravke se iskreno zahvaljujemo zdravnikom specialistom hematologije, pediatrije in infektologije, ki so strokovno najbolj pristojni za področje mikroskopskega pregleda krvnega razmaza, prof.dr. Petru Černelču, prim.dr. Jožetu Pretnarju, doc.dr. Janezu Jazbecu in doc.dr. Matjažu Jerebu.

*Avtorice
Ljubljana, november 2011*

Vsebina

UVOD	3
Kdaj mikroskopsko pregledamo krvni razmaz?	3
PRIPRAVA KRVNEGA RAZMAZA ZA MIKROSKOPSKI PREGLED	4
Vzorec krvi	4
Izdelava krvnega razmaza	4
Barvanje krvnega razmaza	5
Vrednotenje krvnega razmaza	5
ERITROCITNA KRVNA SLIKA	7
Velikost	7
Oblika	7
Obarvanost	8
Vključki	8
Prisotnost mlajših eritrocitov	9
Razporeditev eritrocitov v krvnem razmazu	9
Drugo	10
LEVKOCITNA KRVNA SLIKA	11
Granulociti	11
Nevtrofilni granulociti	11
Razvojne stopnje nevtrofilne granulocitne vrste	11
Morfološke nepravilnosti jedra	12
Morfološke nepravilnosti citoplazme	12
Manj pogoste morfološke nepravilnosti citoplazme	13
Morfološke nepravilnosti nezrelih celic	13
Eozinofilni granulociti	13
Morfološke nepravilnosti jedra	13
Morfološke nepravilnosti citoplazme	13
Bazofilni granulociti	13
Morfološke nepravilnosti citoplazme	13
Monociti	14
Razvojne stopnje monocitne vrste	14
Limfociti	14
Opozorila	15
TROMBOCITNA KRVNA SLIKA	17
Velikost	17
Granuliranost	17
Razporeditev trombocitov	17
Drugo	18
LITERATURA	19
PRILOGA I – Barvanje May-Grünwald/Giemsa	20
Priprava raztopin	20
Postopek barvanja	20

UVOD

Mikroskopski pregled krvnega razmaza (diferencialna krvna slika – DKS) sodi v nabor osnovnih preiskav, ki jih mora izvajati medicinski laboratorij in jih tudi ponuditi naročniku. Če preiskava ni naročena, ima medicinski laboratorij dolžnost in popolno strokovno pristojnost, da preiskavo naredi, ko presodi, da je potrebna. Za to pa je potrebno predpisati jasna, vnaprej postavljena merila, temelječa na izsledku krvne slike iz hematološkega analizatorja.

Kdaj mikroskopsko pregledamo krvni razmaz?

Mikroskopski pregled krvnega razmaza naredimo na osnovi odstopanj številčnih vrednosti ali/in opozoril hematološkega analizatorja ali na željo naročnika. Zaenkrat na tem področju mednarodno veljavnih standardov ni, vendar veljajo okvirna soglasja dobre laboratorijske prakse o naslednjih izhodiščnih vrednostih, ko naj bi razmaze pregledali mikroskopsko:

- številčna koncentracija trombocitov pod $100 \times 10^9/L$ in nad $1000 \times 10^9/L$,
- številčna koncentracija levkocitov pod $3 \times 10^9/L$ in nad $20 \times 10^9/L$,
- številčna koncentracija nevtrofilcev pod $1 \times 10^9/L$ in nad $20 \times 10^9/L$,
- številčna koncentracija limfocitov nad $5 \times 10^9/L$,
- številčna koncentracija monocitov nad $1,5 \times 10^9/L$,
- številčna koncentracija eozinofilcev nad $2 \times 10^9/L$,
- številčna koncentracija bazofilcev nad $0,5 \times 10^9/L$.

Pri morfoloških spremembah naj bi razmaz pregledali ob naslednjih opozorilih hematološkega analizatorja:

- neznačilni ali nezreli levkociti,
- eritroblasti,
- spremenjene morfološke lastnosti eritrocitov,
- agregati ali veliki trombociti.

Obenem je potrebno upoštevati predhodno znane laboratorijske in klinične podatke o bolnikih in jih ustrezno vgraditi v odločanje o mikroskopskem pregledu krvnega razmaza. To so splošno poznani vplivi na spremembe v diferencialni krvni sliki (starost, nosečnost, rasa ...) ter specifični podatki, ki se nanašajo na posameznega bolnika (ali vzorec analiziramo prvič, znane bolezni, vrojene spremembe v morfoloških lastnostih krvnih celic ...).

Izhodišča za pregled krvnega razmaza lahko laboratorij na osnovi utemeljene statistične ocene lastnih podatkov prilagodi zaradi specifičnosti svojega dela. Zlasti v primeru specializiranih laboratorijev je smiselno, da se merila uskladijo z naročniki preiskave. Pri tem je potrebno upoštevati tudi tehnične lastnosti hematoloških analizatorjev, ki se znatno razlikujejo v pogostnosti določenih opozoril.

Še enkrat poudarjamo: pomembno je, da so merila jasna in postavljena vnaprej.

PRIPRAVA KRVNEGA RAZMAZA ZA MIKROSKOPSKI PREGLED

Vzorec krvi

Krvni razmaz lahko pripravimo direktno po vbodu iz kapilarne krvi brez antikoagulantov. Največkrat pa pripravimo razmaz iz krvi, odvzete z antikoagulantom K_3 -EDTA ali K_2 -EDTA (tri- ali dikalijeve sol etilenditiltetraocetne kisline). Kadar uporabimo kri z antikoagulantom, moramo razmaz pripraviti čim prej in najkasneje v štirih urah po odvzemu. Podaljševanje časa po odvzemu krvi vodi do številnih artefaktov, kot so npr. sferocitoza, ehinocitoza in degeneracija nevtrofilcev. Mesta in načini odvzema krvi so podrobno opredeljeni v dveh priporočilih Slovenskega združenja za klinično kemijo (J.M. Kobe: Priporočeni postopki za odvzem kapilarne krvi in M. Piskar: Priporočeni postopki za odvzem venske krvi).

Izdelava krvnega razmaza

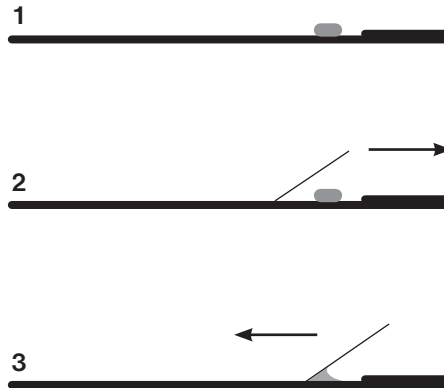
Pravilno izdelan razmaz krvi mora biti primerno tanek, enakomerno razporejen po širini predmetnega stekla in ne sme segati do roba. Končati se mora rahlo zaokroženo (rep razmaza). Pri pretankih razmazih so spremenjene morfološke lastnosti eritrocitov, medtem ko predebeli razmazi niso primerni za prepoznavanje podvrst levkocitov. Debelino razmaza določimo z naklonom stekla, s katerim ga izdelamo.

Razmaze venske krvi pripravimo tako, da malo pred krajšim robom na sredino predmetnega stekla kanemo kapljo krvi (Slika 2). Pri tem si lahko pomagamo z nastavkom za pripravo razmazov, s katerim prebodemo zamašek epruvete z vzorcem krvi, epruveto obrnemo in nastavek pritisnemo ob predmetno steklo, da skozenj priteče kaplja krvi. Ta naj bo tolikšna, da je skupna dolžina razmaza 3-4 cm. S krovnim steklom (ali brušenim), nekoliko ožjim od predmetnega stekla in nagnjenim za 30-45°, se dotaknemo krvne kaplje, da se razpotegne po vsej širini stekelca. Nato kri v nasprotni smeri razpotegnemo vzdolž predmetnega stekla (Slika 1). Gib mora biti hiter in enakomeren, pritisk pa ne premočan, da dobimo razmaz krvi s čim daljšim repom (Slika 2). V tem področju razmaza morajo biti eritrociti porazdeljeni tesno drug ob drugem, ne smejo se prekrivati.

Neposredno po pripravi razmaza predmetno steklo nedvoumno označimo.

Pred barvanjem razmaze posušimo na zraku.

Za izdelavo dobrega razmaza je zelo pomembna izbira ustreznih predmetnih stekel, ki morajo biti čista in brez napak v materialu. Zaradi označevanja je priporočeno, da imajo matiran rob.



Slika 1: Priprava krvnega razmaza za mikroskopski pregled.

Razmaz krvi lahko pripravimo tudi s pomočjo polavtomatske naprave za pripravo krvnih razmazov ali aparata za avtomatizirano pripravo in barvanje krvnih razmazov. V tem primeru se držimo navodil proizvajalca.

Barvanje krvnega razmaza

Za barvanje hematoloških razmazov običajno uporabljamo panoptično barvanje po Pappenheimu. Postopek barvanja krvnega razmaza z raztopinama May-Grünwald in Giemsa vsebuje dva ključna procesa: fiksacijo in barvanje celic. Fiksacijo, ki zagotavlja ohranitev morfoloških lastnosti celic, izvedemo neposredno po pripravi in sušenju razmaza. Preparatov ni priporočljivo puščati nefiksiranih. Fiksacijsko sredstvo je topilo metanol v raztopini May-Grünwald. Po vmesnem barvanju v puferski raztopini May-Grünwalda nato celice obarva še raztopina Giemsa. pH vrednost raztopin mora biti **6,8**, kar zagotovi, da so vse celice krvnega razmaza in njihovi organeli ter vključki ustreznih barv in odtenkov.

Barvanje se izvaja v za to namenjenih kadičkah s pokrovi.

Obstajajo številni recepti za barvanje po Pappenheimu, ki se medsebojno nekoliko razlikujejo (časi, koncentracije). V Prilogi 1 je naveden primer preizkušenih navodil za pripravo raztopin in postopek barvanja.

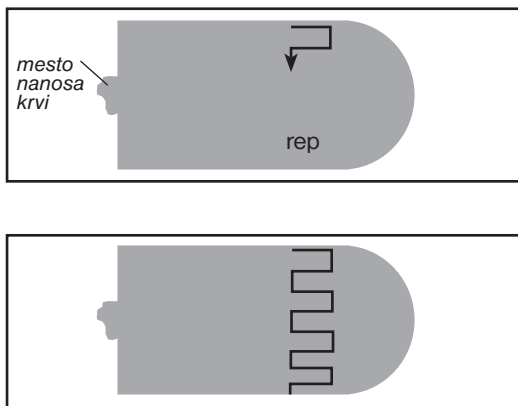
Vrednotenje krvnega razmaza

Vrednotenje obarvanega in posušenega krvnega razmaza mora potekati sistematično. Pomembno je, da nobene stopnje pregleda ne opustimo. Razmaze krvi vedno najprej pregledamo makroskopsko, nato z mikroskopom pri mali povečavi in nazadnje pri veliki povečavi.

Makroskopski pregled služi splošni oceni tehnične ustreznosti preparata.

Pri mali povečavi (100 x) ocenimo splošno kakovost preparata, število, porazdelitev in obarvanje levkocitov, opazimo morebitne aglutinacije, agregate trombocitov ter formacije rulo (rouleaux). Pri tej povečavi izberemo najprimernejše področje za diferenciranje levkocitov.

Končno razmaze pregledamo pri veliki povečavi. Uporabljamo objektivne s 40 do 100-kratno povečavo. Imerzijske objektivne uporabljamo za oceno morfoloških lastnosti eritrocitne, levkocitne in trombocitne vrste ter diferenciranje levkocitov. V repu razmaza, kjer so eritrociti razporejeni drug poleg drugega (se ne prekrivajo), levkocite diferenciramo po sistemu »cik-cak« (Slika 2). Rezultat diferencialne krvne slike je tem bolj zanesljiv, čim več levkocitov pregledamo. Pregledati moramo vsaj 100 levkocitov. Posamezne vrste levkocitov izrazimo v odstotkih. Skupno število pregledanih levkocitov povečamo, kadar med pregledanimi celicami ne najdemo nobenega monocita, limfocita ali nevtrofilca in kadar v razmazu najdemo posamezne nezrele ali neznačilne celice.



Slika 2: Pregled krvnega razmaza s tehniko »cik-cak«.

Ob mikroskopskem pregledu razmaza ponovno preverimo izpis iz hematološkega analizatorja (številčne vrednosti in vsa opozorila).

Pri pregledu krvnega razmaza se moramo zavedati, da se različne vrste krvnih celic neenakomerno razvrščajo po površini. V repu razmaza je več nevtrofilcev in manj limfocitov. Mlajše zrelostne stopnje nevtrofilcev (blasti, promielociti in mielociti) so številčnejše v repu in ob robovih razmaza. Tudi monociti zdrsejo pri izdelavi razmaza ob rob. Navedeni pojavi so izrazitejši pri (pre)tankih razmazih. Z dosledno uporabo pregleda razmaza s tehniko »cik-cak« lahko učinkovito zmanjšamo napake zaradi neenakomernega razporejanja levkocitov.

ERITROCITNA KRVNA SLIKA

Eritrociti so najštevilčnejše celice v krvnem razmazu.

Normalen zrel eritrocit je bikonkavna celica brez jedra. V obarvanem krvnem razmazu (May-Grünwald/Giemsa) je eritrocit rožnate barve. Ima okroglo obliko s svetlejším predelom v sredini (osrednja svetlina).

Morfološki pregled eritrocitne krvne slike mora vsebovati opis in oceno sprememb v:

- velikosti eritrocitov,
- obliki eritrocitov,
- prisotnosti celičnih vključkov,
- prisotnosti mlajših eritrocitov,
- obarvanosti (svetlini) eritrocitov,
- razporejenosti eritrocitov v razmazu.

Pri opisu kakovostnih sprememb v eritrocitni krvni sliki, uporabljamo izključno izraze: **blaga, zmerna, izrazita**. Tako opisujemo anizocitozo, poikilocitozo, obarvanost.

Pri opisu spremembe posameznih oblik eritrocitov, ki jih lahko semi-kvantitativno opišemo, uporabljamo izključno izraze: **posamezni, maloštevilni, številni**. Tako opisujemo različne velikosti, oblike in vključke (npr. mikroцитi, ehinociti, bazofilno punktirani eritrociti ...).

Velikost

Velikost normalnega eritrocita - **normocita** je v premeru od 7 do 9 μm (približno enaka velikosti jedra zrelega limfocita).

Odstopanja v velikosti opisujemo z:

- **mikrociti**: zelo majhni eritrociti, manjši od 7 μm ,
- **makrociti**: veliki eritrociti, večji od 9 μm ,
- **megalociti**: zelo veliki eritrociti, večji od 12 μm .

Anizocitoza označuje spremembe, ko so v krvnem razmazu prisotni eritrociti različnih velikosti.

Oblika

Eritrociti so običajno okrogle oblike in imajo gladek obris. Spremembe v obliki označujejo bolezenski proces.

Poikilocitoza označuje spremembe v obliki eritrocitov. V krvnem razmazu so prisotni eritrociti različnih oblik.

Različne oblike eritrocitov imenujemo:

- **sferociti** ali **sferostomatociti**: okrogli, homogeno močnejše obarvani, brez vidne osrednje svetline, manjši od normalnega eritrocita;
- **eliptociti** ali **ovalociti**: ovalni, elipsasti eritrociti;
- **akantociti**: na površini imajo manj številne (do 10), neenakomerne izrastke različnih velikosti in dolžin in so homogeno obarvani, brez osrednje svetline;
- **ehinociti**: na površini imajo številne (10-30) enakomerno razporejene, enako velike drobne izrastke in ohranjeno osrednjo svetlino;
- **tarčasti eritrociti** ali **kodociti**: v sredini in ob robu intenzivno obarvani, oba obarvana predela pa loči svetlejši del citoplazme;
- **fragmentirani eritrociti** ali **shizociti**: eritrociti z odtrganim delom celice (pogosta oblika razbite jajčne lupine); lahko so povsem nepravilne oblike;
- **keratociti**: eritrociti z izrastki v paru (običajno en ali dva para), po obliki podobni rogovom (pogosta oblika čelade);
- **solzasti eritrociti** ali **dakriociti**: eritrociti z obliko kaplje ali hruške;
- **stomatociti**: osrednja svetlina poteka prečno v obliki ust ali smejočega se obraza;
- **srpasti eritrociti** ali **drepanociti**: eritrociti z obliko ozkega srpa;
- **anulociti**: eritrociti, obarvani samo v ozkem zunanem pasu (videti so kot obročki), po velikosti sodijo običajno med mikrocite.

Obarvanost

Normokromen, normalen eritrocit je rožnato obarvan z osrednjo svetlino, ki zajema približno eno tretjino celice. S pojmom obarvanost označujemo količino in porazdeljenost hemoglobina v eritrocitih.

- **Hipokromija**: eritrociti so obarvani samo ob robu, osrednja svetlina je večja od tretjine celice.
- **Hiperkromija**: eritrociti so močnejše obarvani, brez osrednje svetline (zmanjšan delež svetline).
- **Anizokromija** označuje različno obarvane eritrocite; posamezni eritrociti so svetleje obarvani.
- **Polikromazija**: prisotnost eritrocitov (retikulocitov) z modrikastosivo (vijolično) citoplazmo.

Vključki

V eritrocitih lahko najdemo različne celične vključke, pomembne za posamezna bolezenska stanja.

- **Bazofilne punktacije** so številna, zelo drobna ali groba temnomodra zrnca (agregati ribosomov), različnih velikost in oblik, enakomerno razporejena po eritrocitu.
- **Howell-Jollyeva telesca:** eno ali dve do 1 µm veliki okrogli temnomodrovijolični telesci (ostanki jedra), postavljeni proti robu celice.
- **Cabotovi obroči:** tanke obročaste, elipsaste ali zankaste (oblika osmice) rdečevijolične tvorbe (ostanki delitvenega vretena), običajno ležeče na sredini eritrocita.
- **Heinzova telesca:** večji posamezni ali številčni modrikasti okrogli vključki (oksidiran in denaturiran hemoglobin), ležeči ob robu eritrocitne membrane – vidni samo pri supravitalnem barvanju s kristalnovijoličnim barvilom ali z novim metilenskim modrilom.
- **Pappenheimerjeva telesca:** majhna groba bazofilna maloštevilna svetlomodrovijolična zrnca (vključki, bogati z železom), manjša od Howell-Jollyevih telesc, postavljena periferno v celici; potrdimo jih lahko z barvanjem po Perlšu (prusko modrilo).

Prisotnost mlajših eritrocitov

Eritroblasti so nezrele celice eritrocitne vrste, ki imajo jedro.

Štejemo jih sočasno z diferenciranjem levkocitov in jih ne prištevamo med levkocite.

Kadar poleg 100 diferenciranih levkocitov naštejemo 10 ali več eritroblastov, moramo opraviti korekcijo številčne koncentracije levkocitov s hematološkim analizatorjem (če ta ne izvaja avtomatične korekcije), ker so k izmerjenemu številu levkocitov prišteti tudi eritroblasti:

$$\text{korigirano število levkocitov (x10}^9\text{/L)} = \frac{\text{število levkocitov (analizator) (x10}^9\text{/L)}}{100 + \text{število eritroblastov}} \times 100$$

Če imamo hematološki analizator, ki izvaja avtomatično korekcijo, moramo pri mikroskopskem diferenciranju pri izračunu upoštevati nekorigirano številčno koncentracijo levkocitov.

V izvidu navedemo **število eritroblastov na 100 diferenciranih levkocitov**.

Razporeditev eritrocitov v krvnem razmazu

Eritrociti se običajno v krvnem razmazu razporedijo enakomerno. Zlepljanje ali nenormalne razporeditve so znak bolezenskega stanja.

- **Formacije rulo (rouleaux):** eritrociti so razvrščeni v ravnih nizih, tako kot delno prekrivajoči kovanci.
- **Aglutinacija eritrocitov:** eritrociti se zlepijo v nepravilno oblikovane skupke.

V opisu rdeče krvne slike navedemo prisotnost *eritrocitnih formacij rulo (rouleaux)* ali *aglutinacije eritrocitov*.

Drugo

- **Retikulociti** so rahlo večji mladi eritrociti, katerih citoplazma vsebuje ostanke RNA in DNA v obliki mreže ali zrnč. Ti ostanki se obarvajo temnomodro v nefiksiranih eritrocitih z novim metilenskim modrilom. V posušenem in obarvanem razmazu venske krvi preštejemo retikulocite med 1000 eritrociti. Njihovo številčno koncentracijo izrazimo kot absolutno vrednost.

Večina sodobnih hematoloških analizatorjev omogoča avtomatizirano določanje številčne koncentracije retikulocitov. Pri tem uporabljajo različna barvila, ki se vežejo na retikulocitno RNA.

- **Število fragmentiranih eritrocitov (shizociti):** fragmentirane eritrocite preštejemo med 1000 eritrociti. Rezultat izrazimo v odstotkih (%).
- V utemeljenih primerih lahko izdamo kvantitativni izsledek za število **bazofilno punktiranih eritrocitov** in **akantocitov**. Tako bazofilno punktirane eritrocite kot akantocite preštejemo med 1000 eritrocitii in rezultat izrazimo v odstotkih (%).
- **Paraziti v eritrocitih:** najdemo lahko naslednje parazite v različnih razvojnih stopnjah:
 - a) praživali iz rodu **Plasmodium** (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium falciparum* in *Plasmodium malariae*),
 - b) praživali iz rodu **Babesia**.
- **Paraziti v krvi:**
 - a) praživali iz rodu **Leishmania**,
 - b) praživali iz rodu **Trypanosoma**.

Prisotnost parazitov zapišemo v opombe. Pri malariji lahko zapišemo tudi *razvojno obliko* parazita (trofozoiti, shizonti in gametociti) in v primeru številčnejših parazitov tudi delež okuženih eritrocitov (preštejemo med 1000 eritrociti). Rezultat izrazimo v odstotkih (%).

LEVKOCITNA KRVNA SLIKA

Levkociti so v krvnem razmazu, obarvanem z May-Grünwald/Giemso, največje celice in imajo jedro. Posamezne vrste prepoznavamo na osnovi velikosti, oblike in obarvanosti jedra (gostote in zgradbe kromatina) ter obarvanosti in prisotnosti citoplazme in citoplazemskih vključkov. Morfološka ocena posameznih celičnih vrst je temelj za pravilno količinsko razvrstitev posameznih celic v ključni podskupini levkocitov normalnega krvnega razmaza:

- polimorfonuklearni levkociti: granulociti (nevtrofilni, bazofilni, eozinofilni),
- mononuklearni levkociti: monociti in limfociti.

Določitev relativnega deleža posameznih vrst levkocitov je podlaga za preračun absolutnih vrednosti s pomočjo skupnega števila levkocitov, določenega s hematološkim analizatorjem.

V **izvid** se morfološke nepravilnosti posamezne vrste levkocitov zapisujejo kot:

- **pri posameznih** (manj kot 1/3),
- **pri nekaj** (več kot 1/3 in manj kot 2/3),
- **pri večini** (pri več kot 2/3) nevtrofilnih/eozinofilnih/bazofilnih granulocitov.

Primer: hipersegmentacija jeder pri nekaj nevtrofilnih granulocitih

Granulociti

NEVTROFILNI GRANULOCITI

Razvojne stopnje nevtrofilne granulocitne vrste

- **Mieloblast:** velikost celice je 12 do 20 μm , jedro je okroglo ali ovalno, razmerje med jedrom in citoplazmo je v korist jedra, saj jedro zavzema večino celice. V jedru je 1 do 5 jedrc (najpogosteje 2 ali 3), struktura kromatina je rahla. Barva citoplazme je svetlomodra, granulacije v citoplazmi običajno niso prisotne.
- **Promielocit** je večji od mieloblasta, v premeru meri od 15 do 25 μm . V primerjavi z mieloblastom je razmerje med jedrom in citoplazmo manjše, citoplazma je bolj bazofilna. Jedrni kromatin je rahlo zgoščen, prisotnih je do pet jedrc (najpogosteje 2 ali 3). Jedro je ovalno in na enem delu zažeto. Citoplazma promielocitov vsebuje številne različno velike primarne ali azurofilne granulacije.
- **Mielocit** je manjši od promielocita, v premeru meri od 10 do 20 μm . Jedro je ovalno, včasih na eni strani tudi zažeto, kromatin je zmerno (srednje) zgoščen. Citoplazma je bolj acidofilna kot pri promielocitu. V citoplazmi prevladujejo nevtrofilne granulacije, azurofilnih je malo.
- **Metamielocit** v premeru meri 10 do 12 μm , kromatin je grudast, jedro je jasno zažeto, ledvičasto, ali oblikovano kot črka U. Citoplazma je acidofilna, v citoplazmi prevladujejo nevtrofilne granulacije.

- **Paličasti nevtrofilni granulocit:** jedro je paličaste oblike, lahko je zakrivljeno, zavito ali delno zažeto. Kadar je jedro iz dveh segmentov, sta segmenta povezana z delom, ki je širši od tretjine širine jedra.
- **Nevtrofilni granulocit:** velikost celice je 12 do 15 μm , jedrni kromatin je grudast, jedro je segmentirano, s 3 do 5 segmenti. Najbolj pogosto so segmenti trije. Segmenti so običajno med sabo povezani s tanko kromatinsko nitko. Citoplazma je acidofilna (rožnato-oranžne barve), v citoplazmi so prisotne številne drobne granulacije.

Morfološke nepravilnosti jedra

- **Hipersegmentacija jedra:** šest ali več segmentov jedra.
- **Hiposegmentacija:** manj kot trije segmenti jedra. Hiposegmentacija je lahko dedna ali pridobljena sprememba, vendar z morfološkim pregledom pod mikroskopom ne moremo ločiti vzroka za pojav. Pri opisu navajamo le hiposegmentacijo. Pri diferenciranju moramo biti pozorni na zrelost jedra (gostota kromatina), da hiposegmentiranih nevtrofilcev z enim samim segmentom (okroglo jedro z grobo grudastim kromatinom) ne uvrstimo med nezrele granulocite (paličasti, metamielocite ali mielocite), ampak med segmentirane nevtrofilce.

a) Pelger-Huëtova nepravilnost (prirojeno stanje): jedro večine nevtrofilcev ima dva enaka segmenta, jedrni kromatin je grobo grudast. Ostali nevtrofilci imajo jedro v obliki arašida, največ 4% nevtrofilcev pa ima nesegmentirano okroglo jedro. Pri redkih homozigotih ima večina nevtrofilcev okroglo do ovalno jedro.

b) Psevdo-Pelger-Huëtova nepravilnost (pridobljeno stanje): spremembe v obliki jedra so podobne kot pri prirojeni obliki, značilne so za akutno mieloično levkemijo (AML) in mielodisplastični sindrom (MDS). Pri pridobljeni nepravilnosti je odstotek nevtrofilcev s spremenjenim jedrom manjši, pogosto je pridružena nevtropenija in hipogranulacija nevtrofilcev.

Morfološke nepravilnosti citoplazme

- **Toksične granulacije:** povečano število in intenziteta obarvanosti granulacij v citoplazmi.
- **Hipogranulacija citoplazme:** zmanjšana intenziteta obarvanosti in števila granulacij v citoplazmi.
- **Vakuolizacija citoplazme:** prisotne številne drobne ali maloštevilne velike vakuole.
- **Neskladnost v dozorevanju jedra in citoplazme:** citoplazma zaostaja v dozorevanju za jedrom, je bolj bazofilna, kot naj bi bila glede na zrelost jedra.
- **Döhlejeva telesca:** okrogli ali ovalni svetlosivomodri vključki (ribosomi, endoplazmatski retikulum, zrna glikogena), v premeru običajno veliki 1 do 2 μm , lahko tudi do 5 μm .
- **Prisotnost bakterij:** fagocitirane različne bakterije v citoplazmi.

- **Prisotnost morul:** modri vključki, ki predstavljajo skupke bakterij erlihija (do 40) znotraj fagosomov.

Manj pogoste morfološke nepravilnosti citoplazme

- **Chediak-Higashijev sindrom:** temnovijoličasti okrogli vključki v citoplazmi (neobičajno veliki lizosomi, ki vsebujejo kislino fosfatazo).
- **May-Hegglinova nepravilnost:** svetlomodri okrogli ali podolgovati, razvejani vključki v citoplazmi (vsebujejo RNA), podobni so Döhlejevemu telescu.
- **Alder-Reillyeva nepravilnost:** posamezne debele temnovijolične granule v citoplazmi (kompleks beljakovin in polisaharidov), ki lahko prekrivajo tudi jedro.

Naštete morfološke nepravilnosti opazimo tudi pri limfocitih in monocitih.

Morfološke nepravilnosti nezrelih celic

- **Auerjeve paličice:** zlitje azurofilnih granul v paličice. Najdemo jih v citoplazmi levkemičnih celic mieloidne vrste, najpogosteje v mieloblastih in promielocitih. V citoplazmi promielocitov so lahko številna in tvorijo t.i. **Sultanina telesca**.

EOZINOFILNI GRANULOCITI

- **Eozinofilni granulociti:** velikost celice je 12 do 17 μm , jedro je običajno iz dveh segmentov, v citoplazmi so prisotne značilne okrogle oranžne granule.

Morfološke nepravilnosti jedra

- **Hipersegmentacija jedra:** jedro ima več kot dva segmenta.

Morfološke nepravilnosti citoplazme

- **Vakuolizacija citoplazme:** prisotne so številne drobne ali maloštevilne velike vakuole.
- **Hipogranulacija citoplazme:** zmanjšana je intenziteta obarvanosti in število granulacij v citoplazmi.

BAZOFILNI GRANULOCITI

- **Bazofilni granulociti:** velikost celice je 10 do 14 μm , segmenti jedra se pogosto prekrivajo in tvorijo gosto, čvrsto strukturo. V citoplazmi so različno velike temnomodre do vijolične granulacije, pogosto prekrivajo tudi jedro.

Morfološke nepravilnosti citoplazme

- **Hipogranulacija citoplazme:** zmanjšana je intenziteta obarvanosti in število granulacij v citoplazmi.

Monociti

Razvojne stopnje monocitne vrste

- **Monoblast (blast):** celica je velika od 16 do 22 μm . Jedro je okroglo, včasih blago zažeto, v celici postavljeno proti robu, z dvema do pet jedrci. Kromatin je rahel, mrežast. Rob citoplazme je dokaj širok, citoplazma je sivomodra, srednje močno obarvana, brez granulacij.
- **Promonocit:** velikost celice je od 10 do 20 μm . Pogosta je ovalna oblika jedra z bolj ali manj izraženo zažetostjo (upognenostjo). Lahko so še vidna jedrca. Kromatinska struktura je rahla. Citoplazma je na eni strani celice zelo široka, sivomodre barve, nehomogena, kosmičasta, z redkimi azurofilnimi granulacijami.
- **Monocit** je največja krvna celica. Običajno je velik od 14 do 20 μm , veliki pa lahko tudi do 40 μm . Jedro je veliko in leži v sredini ali ob robu celice. Je nepravilne oblike (redko okroglo ali ovalno), ledvičasto upognjeno (zažeto) ali segmentirano (dva do trije segmenti). Struktura kromatina je rahla, brez grud. Citoplazma je sivomodra, obilna, s številnimi zelo drobnimi azurofilnimi granulacijami ter pogosto tudi vakuolami.

Morebitne spremembe v morfoloških lastnostih monocitov (npr. neskladje v dozorevanju) ali fagocitozo lahko zapišemo v opombe.

Limfociti

Pri diferenciranju se praviloma uporablja delitev na spodaj navedene skupine. Podrobnejša delitev na specifične podvrste naj se uporablja le tam, kjer je osebje usposobljeno za natančnejše diferenciranje celic.

- **Limfoblast (blast)** je 9 – 20 μm velika celica z enim ali več jedrci. Jedro je včasih zažeto, prepognjeno ali nepravilno. Kromatin je drobno granuliran. Citoplazma je pičla, modra, agranulirana.
- **Prolimfocit** je nekoliko večji od zrelih limfocitov (12 – 20 μm) z izrazitim jedrcem, ki je običajno v središču jedra. Modra citoplazma je obilnejša kot pri limfoblastu, jedrni kromatin je kondenziran. Prolimfociti ne sodijo med običajne najdbe v venski krvi, zato jih lahko uvrščamo tudi med atipične limfocite.
- **Limfocit:** zreli limfociti se v krvnih razmazih pojavljajo v dveh morfoloških oblikah:
 - mali:** manjše celice z ozkim robom svetlomodre citoplazme in velikostjo jedra 7- 12 μm . Jedrni kromatin je gost, homogen, s posameznimi izboklinami, jedrce večinoma ni vidno;
 - veliki:** limfociti, velikosti 9-15 μm , z obilno, svetlomodro, prosojno citoplazmo in posameznimi azurofilnimi granulami (5-15 na celico). Lahko vsebujejo posamezne vakuole. Normalno jih je okrog 10% (0 – 15%). Njihovo število je povečano ob okužbah (veliki granulirani limfociti).

- **Reaktivni limfocit:** to je morfološko heterogena skupina celic, kamor uvrščamo spremenjene (transformirane) limfocite, imunoblaste, plazmacitoidne limfocite (Türkove celice). So večje celice z obilnejšo, izrazito bazofilno citoplazmo. Sem uvrščamo tudi reaktivne limfocite pri virusnih okužbah (virociti). To so večje celice z obilno, prosojno citoplazmo, ki je na zunanjem robu bazofilna. Jedro je nepravilno. Najznačilnejši so pri infekcijski mononukleozii.
- **Atipični (neznačilni) limfocit:** to so maligne limfoidne celice, ki imajo lahko zelo raznolike morfološke lastnosti in velikost. Najznačilnejše morfološke spremembe jedra in citoplazme pri teh celicah vidimo kot:
 - limfocite, večje od malega limfocita, z izrazitimi jedrci,
 - limfocite z nepravilnimi, lobuliranimi, zažetimi ali prepognjenimi jedri,
 - večje limfocite z lasastimi ali dlakastimi citoplazemskimi izrastki.

Zaradi velikih razlik v velikosti in morfoloških značilnostih atipičnih limfocitov lahko spremembe podrobno opišemo v opombah.

- **Plazmatka:** normalne zrele plazmatke so celice, ki jih v krvnem razmazu običajno ne najdemo. Velike so 8 -20 μm , z okroglim jedrom, potisnjениm na rob citoplazme. Kromatin je gost, granuliran, kolesaste strukture. Obilna citoplazma je sivomodra ali temnomodra, lahko vsebuje vakuole ali vključke. Nezrele plazmatke se pojavijo v krvi zaradi malignega obolenja (plazmablasti, plazmocitomske celice). Lahko so nekoliko večje, bolj nezrele, pogosto je vidno jedrce. Citoplazma je lahko bolj rožnata, vidna je perinuklearna svetlina. Pojavljajo se dvojedrne ali večjedrne celice.

Opozorila

Pri diferenciranju moramo biti pozorni na naslednja dejstva, ki jih upoštevamo pri izdajanju izvidov.

- **Gumprechtove sence** so posledica mehanske poškodbe levkocitov pri pripravi krvnega razmaza. Najbolj dovzetni zanje so krhki limfociti. Posamezne sence lahko vidimo ob vsaki krvni bolezni in tudi v razmazu normalne krvi. Njihovo povečano število je zelo značilno za kronično limfocitno levkemijo (KLL). Če so Gumprechtove sence v razmazu številne, njihov izvor pa nedvoumno lahko povežemo z eno celično vrsto (npr. limfocitno), jih mikroskopsko diferenciramo kot svojo skupino celic in jih vključimo v izvid mikroskopske DKS.
- **Blast** je izraz, ki se enotno uporablja za najmlajšo razvojno stopnjo limfatične in mieloidne celične vrste. Tudi kadar jih na osnovi morfološke ocene celice lahko nedvoumno uvrstimo med mieloblaste, jih diferenciramo kot blaste in opažanja zabeležimo v opombo.
- Pri majhni **številčni koncentraciji levkocitov** (pod $1 \times 10^9/\text{L}$ celic) težko najdemo 100 celic za diferenciranje. Kljub temu moramo krvni razmaz pregledati po predpisanem postopku in opisati morebitne spremembe oziroma najdbe. Kadar

diferenciramo med 50 in 100 levkociti, izdamo izvid v odstotkih posameznih celic. Če je število pregledanih levkocitov manjše od 50, navedemo število diferenciranih celic in posameznih vrst v opombe. V izvidu vedno navedemo skupno število diferenciranih celic.

- Izračun **absolutnih vrednosti**: pri mikroskopskem pregledu krvne slike z diferenciranjem dobimo relativne vrednosti posameznih podvrst levkocitov. Iz teh vrednosti nato s številčno vrednostjo za levkocite, ki jo dobimo s hematološkim analizatorjem, izračunamo absolutne vrednosti. V skladu z mednarodnimi priporočili moramo kot rezultat diferenciranja izdati tudi absolutne vrednosti. V dogovoru z naročniki preiskave rezultate diferenciranja lahko izdamo ločeno poleg absolutnih vrednosti, ki jih določi hematološki analizator, ali pa vrednosti analizatorja popravimo.
- V izvidih moramo navajati **referenčne vrednosti za absolutno število** posameznih podvrst levkocitov, ki jih normalno najdemo v krvi (nevtrofilci, eozinofilci, bazofilci, monociti, limfociti).
- V razmazih **ne diferenciramo** mehansko poškodovanih celic, ki jim ne moremo določiti izvora, golih jeder, endotelijskih in apoptotičnih celic.

TROMBOCITNA KRVNA SLIKA

Trombociti so brez jedra, okrogle ali ovalne oblike. V krvnem razmazu, obarvanem z May-Grünwald/Giemso, so v njih vidne azurofilne granulacije, ki so razporejene po celotni citoplazmi ali zgoščene v sredini trombocita.

Morfološka ocena trombocitov vsebuje opis in oceno:

- velikosti,
- granuliranosti,
- razporeditve trombocitov v razmazu.

Za opis kakovostnih sprememb v trombocitni krvni sliki, uporabljamo izključno izraze: **blaga, zmerna, izrazita** (npr. anizocitoza trombocitov ...).

Za opis sprememb posameznih pojavnih oblik trombocitov, ki jih lahko semi-kvantitativno opišemo, uporabljamo izključno izraze: **posamezni, maloštevilni, številni** (npr. gigantski, hipogranulirani ...).

Velikost

Normalni trombociti imajo premer 1-3 μm .

Veliki trombociti imajo dvakratni premer normalnega trombocita.

Gigantski trombociti imajo večji premer kot veliki trombociti, oz. ustrezajo velikosti eritrocita.

Anizocitoza trombocitov je prisotnost trombocitov različnih velikosti.

Granuliranost

V primeru manjšega števila ali odsotnosti granulacij v trombocitih vidimo v krvnem razmazu le sivo ali svetlomodro citoplazmo.

Hipogranulirani trombociti – trombociti z manj granulacijami.

Agranulirani trombociti – trombociti brez granulacij.

Razporeditev trombocitov

V normalnem razmazu krvi, odvzete s K_3 -EDTA ali K_2 -EDTA, so trombociti razporejeni posamezno in enakomerno.

V redkih primerih ugotovimo prisotnost skupkov trombocitov ali satelitskih trombocitov. Oba pojava sta posledica *in-vitro* dogajanj in nista povezana s spremembo funkcije trombocitov.

Skupke (agregate) trombocitov opišemo v primeru njihove prisotnosti. Če je številčna koncentracija trombocitov manjša kot $100 \times 10^9/\text{L}$ ali če analizator opozori

na morebitno prisotnost skupkov, je potrebno pripraviti razmaz in ga pregledati mikroskopsko. Če gre za lažno trombocitopenijo (psevdotrombocitopenijo) zaradi aktivacije avtoprotiteles v vzorcu krvi, odvzete s K_3 -EDTA ali K_2 -EDTA, so skupki trombocitov običajno prisotni v celotnem razmazu. V tem primeru je potrebna določitev številčne koncentracije trombocitov v krvi odvzeti z Na-citratom (epruveta za preiskave hemostaze) ali Li-heparinom. Naročniku sporočimo, da zaradi suma na lažno trombocitopenijo priporočamo ponovni odvzem krvi v epruveto z Na-citratom. Ponovno izmerimo številčno koncentracijo trombocitov s hematološkim analizatorjem. Zaradi razmerja med volumnom antikoagulant in krvi v takšni epruveti je potrebno številčni rezultat množiti s faktorjem redčenja (pri razmerju 1:9 je faktor 1,1). V primeru prisotnih skupkov vrednosti številčne koncentracije trombocitov iz epruvete s K_3 -EDTA ali K_2 -EDTA ne oddamo, ugotovitev pa zabeležimo v komentar izvida.

Če so skupki še vedno prisotni, lahko poskusimo trombocite prešteti v Bürker-Türkovi številni komori, če to metodo obvladamo in imamo na razpolago ustrezno opremo (fazno-kontrastni mikroskop). Način določitve števila trombocitov zabeležimo.

Satelitski trombociti so trombociti, vezani na membrano nevtrofilnih granulocitov. Tudi ta pojav lahko lažno zmanjša številčno koncentracijo trombocitov v krvi.

Psevdotrombocitopenija je lahko tudi posledica aglutinacije trombocitov na hladnem. V tem primeru moramo vzorce krvi analizirati neposredno po odvzemu ali pa jih segreti pol ure pri 37°C v termostatu ali vodni kopeli in ogreto kri nemudoma analizirati.

Drugo

Mikromegakariociti so manjši megakariociti, ki jih redko najdemo v periferni krvi.

Štejemo jih sočasno z diferenciranjem levkocitov in jih ne prištevamo med levkocite. V izvidu navedemo *število mikromegakariocitov na 100 diferenciranih levkocitov*.

Literatura

- Bain BJ, Huhn D: Roche Grundkurs Haematologische Morphologie. Blackwell Wissenschafts- Verlag Berlin, Wien, 1997.
- Bain BJ: Blood cells. A practical guide. 4th ed, Blackwell, Malden, 2006.
- Barnes PW, McFaden SL, Machin SJ, Simson E: The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 2005; 11: 83-90.
- Bohinjec J: Temelji klinične hematologije. Univerzum, Ljubljana, 1983.
- Gulati G, Caro J: Blood Cells. American Society for Clinical Pathology Press, Singapore, 2007.
- Hoffbrand AV, Pettit JE: Sandoz Atlas of Clinical Haematology. 2nd ed, Mosby-Wolfe, Barcelona, 1994.
- International Council for Standardisation in Haematology: Expert Panel on Cytometry (1995). Recommendation of the International Council for Standardisation in Haematology on reporting differential leucocyte counts. *Clin Lab Haematol* 1995, 17, 113.
- Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, et al. Williams Hematology, 8th Ed., McGraw Hill, New York, 2010.
- Kobe JM: Priporočeni postopki za odvzem kapilarne krvi. Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 1999.
- Kocjančič A, Mravje F, Štajer D: Interna medicina. DZS, Ljubljana, 2005.
- Lewis SM, Bain BJ, Bates I: Dacie and Lewis Practical haematology. 10th ed, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2006.
- Marolt-Gomišček M, Radšel-Medvešček A: Infekcijske bolezni. Tangram, Ljubljana, 2002.
- Moreno A, Menke D: Assessment of platelet numbers and morphology in the peripheral blood smear. *Clin Lab Med* 2002, 22: 193-213.
- NCCLS: Reference leukocyte differential count (Proportional) and Evaluation of instrumental methods; Approved Standard, H20-A, 1992.
- Piskar M: Priporočeni postopki za odvzem venske krvi. Slovensko združenje za klinično kemijo, Ljubljana, 1999.
- Theml H, Diem H, Haferlach T: Color Atlas of Hematology, Practical Microscopic and Clinical Diagnosis. 2nd ed, Thieme Stuttgart, 2004.
- Žemva M: Laboratorijska hematologija. DZS, Ljubljana, 1968.

PRILOGA I – Barvanje May-Grünwald/Giemsa

Priprava raztopin

Raztopina po May-Grünwaldu (eozin in metilensko modrilo v metanolu)

Raztopina Giemse (eozin in dva derivata metilenskega modrila-azur I in azur II v metanolu)

Fosfatni pufer za pripravo Giemse

Matična raztopina (pH=6,6):

raztopina A: 9,1 g/L KH_2PO_4

raztopina B: 9,5 g/L Na_2HPO_4 ali 11,9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Vzamemo 630 mL raztopine A in 370 ml raztopine B, uravnamo pH vrednost na 6,6.

Delovna raztopina:

V 1000 mL bučki razredčimo 50 mL matične raztopine in dopolnimo z destilirano vodo do oznake. Končna pH vrednost mora biti 6,8.

Delovna raztopina Giemse v fosfatnem pufru (1:10)

V merilnem valju odmerimo 10 mL Giemse in z delovno raztopino fosfatnega pufra dopolnimo do 100 mL.

Postopek barvanja

1. Posušene razmaze zložimo v stojalo in potopimo v kadičko z May-Grünwaldovo raztopino za **5** minut.
2. Razmaze brez vmesnega spiranja potopimo za **1** minuto v drugo kadičko, napolnjeno z May-Grünwaldovo raztopino in fosfatnim pufrom v razmerju 1:1.
3. Z raztopino Giemse v fosfatnem pufru (1:10) barvamo razmaze **20** minut, jih speremo v fosfatnem pufru in posušimo.

ISBN 978-961-92634-8-8



9 789619 263488