

Střední odborná škola veterinární, Hradec Králové-Kukleny,
Pražská 68

Předmětová komise odborných veterinárních předmětů

ATLAS HEMATOLOGIE ZVÍŘAT

PROJEKT V RÁMCI SIPVZ
Č. 1934P2006



MVDr. Vilma KAJEROVÁ, Ph.D.
MVDr. Jan RYBÁŘ
RNDr. Petr SKŘIVAN

Hradec Králové 2006

Předmluva

Dostává se Vám do rukou učební text Atlas hematologie zvířat určený pro učitele a studenty SOŠ s veterinárním zaměřením.

Výchovně vzdělávacím cílem tohoto textu je předat základní poznatky o krvi jednotlivých významných druhů hospodářských zvířat, o jejím složení a o základních postupech jejího laboratorního zpracování a vyšetření.

Nedílným doplňkem tohoto textu je databanka fotografií jednotlivých krevních elementů, která umožňuje získat představu o krevních elementech z pohledu jednotlivých živočišných druhů a současně usnadňuje i jejich mezidruhové porovnání.

Vzhledem k důrazu, jaký klade současný proces vzdělávání na využívání informačních technologií, jsme se rozhodli fotografie zpřístupnit v elektronické podobě na adrese <http://projekty.sosvet.cz>. Předpokládáme, že tím umožníme jejich lepší dostupnost pro vlastní výuku i samostudium.

Závěrem bychom také rádi poděkovali MVDr. Lukáši Pavlačíkovi, Ph.D. za pomoc při získávání vzorků krve od exotických zvířat.

kolektiv autorů

Obsah

Předmluva.....	2
Obsah.....	3
Technika přípravy krevních nátěrů	4
Význam krevních nátěrů	5
Stanovení diferenciálního rozpočtu bílých krvinek	5
Pozorování krevních elementů	6
Erythrocyty.....	6
Leukocyty.....	9
Trombocyty	16
Počítání krevních elementů	17
Použitá literatura	19

Technika přípravy krevních nátěrů

Krevní nátěry zhotovujeme z čerstvě odebrané plné krve; pokud nemáme možnost udělat nátěr ihned po odběru, zhotovujeme jej z krve stabilizované antikoagulačními (= protisrážlivými) látkami. Nejvhodnějším antikoagulans pro tento účel je EDTA nebo heparin.

Podložní sklíčko, na které budeme dělat nátěr, by mělo být dokonale čisté, odmaštěné a suché. Jako roztěrové sklíčko je nejlépe použít sklíčko se zabroušenými hranami, které zaručí vhodnou šířku roztěru. Pokud jej nemáme k dispozici, lze použít i krycí sklíčko nebo další podložní sklíčko.

Při roztírání je vhodnější položit sklíčko na stůl. Rukou, kterou budeme sklíčko přidržovat, se snažíme nedotýkat se plochy sklíčka, ale držet ho pouze ze stran. Na kraj podložního sklíčka kápneme přiměřeně velkou kapku krve, přibližně 0,5 - 1 cm od okraje. Pro praváky je lepší udělat kapku na pravém okraji a nátěr táhnout směrem doleva, pro leváky naopak.

Roztěrové sklíčko přiložíme jakoby před kapku (pokud je na pravém okraji, tak sklíčko přikládáme z levé strany kapky), posuneme ho ke kapce až se celá rozlije podél hrany roztěrového sklíčka. Poté sklíčkem roztíráme krev rovnoměrným, plynulým pohybem v postupně více ostrém úhlu od 45° do 30°. Čím je úhel ostřejší (a pomalejší doba roztěru), tím je nátěr tenčí. Nikdy neroztíráme krev před sklíčkem, ale jakoby ji táhneme za roztěrovým sklíčkem. V opačném případě se krevní buňky ničí.

Ideální nátěr je rovnoměrně se ztenčující a přibližně 3 – 6 cm dlouhý. Sklíčko nezapomeneme označit tužkou na zabroušené straně nebo pomocí lepícího štítku.

Nátěr před barvením musíme nechat dokonale uschnout. Zpočátku je vhodné zajistit rychlejší zasychání nátěru (fénem, nad radiátorem, v inkubátoru apod.), aby buňky nezměnily tvar. Citlivé jsou především erytrocyty. Poté několik hodin dosušujeme.

Fixace krevních nátěrů

Krevní nátěry fixujeme methylalkoholem (methanolem). Nátěry můžeme do methanolu vložit na 10 minut nebo je ve vodorovné poloze methanolem pokapat a čekat do odpaření.

Pokud budeme barvit nátěry v krátké době po zhotovení preparátu, není nutné tuto samostatnou fixaci dodržet, neboť používaná barviva mají současně fixační schopnost.

Barvení krevních nátěrů

Standardním barvením pro krevní nátěry je tzv. panoptické barvení podle Pappenheima.

Postup barvení:

1. Celý nátěr na 3 minuty pokryjeme May-Grünwaldovým barvivem .
2. Opatrně přikapáváme destilovanou vodu tak, aby se původní barvivo nesmylo. Cílem je nechat působit takto naředěné barvivo (1:1) další 1 minutu.
3. Barvivo slijeme, sklíčko můžeme opláchnout vodou.
4. Na nátěr naneseeme Giemsa-Romanovského barvivo. Toto barvivo musí být před barvením vždy čerstvě naředěné přibližně 1:9 (na 10 ml destilované vody 10-15 kapek barviva). Necháme působit přibližně 15 minut (10-20 minut).
5. Barvivo slijeme a sklíčko důkladně opláchneme pod tekoucí vodou.
6. Spodní stranu sklíčka očistíme utěrkou.

7. Je vhodné ihned zkontrolovat probarvenost krevních buněk a eventuálně preparát ještě dobarvit.

Význam krevních nátěrů

Krevní nátěry zhotovujeme pro posouzení morfologie jednotlivých krevních elementů, zjištění přítomnosti krevních parazitů a především pro stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých druhů bílých krvinek.

Stanovení diferenciálního rozpočtu bílých krvinek

= stanovení diferenciálního rozpočtu bílých krvinek, diferenciální krevní obraz, leukogram

Bílých krvinek je v krevním nátěru výrazně méně než červených a jejich rozložení v nátěru nemusí být pravidelné. Často jsou větší buňky (neutrofilů, monocytů) více při okrajích. Proto je nutné prohlížet preparát systematicky meandrovitým způsobem po celé šířce nátěru. Odečítat začínáme v místech, kde se již krvinky navzájem nepřekrývají.

Běžně se odečítá 100 leukocytů. Před začátkem odečítání je vhodné si připravit tabulku, do které během počítání zapisujeme získané počty (viz tabulka č.1). Nakonec tedy získáme procentuální zastoupení jednotlivých zástupců bílých krvinek. Na základě změn v tomto zastoupení jsme schopni lépe diagnostikovat eventuální onemocnění či stav organismu.

V tabulce č.2 jsou uvedeny fyziologické hodnoty diferenciálního rozpočtu leukocytů u vybraných druhů zvířat.

Tab. 1. Jeden z možných způsobů zapisování leukogramu

druh leukocytu	zjištěné počty	součet (celkem 100)
neutrofilů segmenty	### ### ### ### ### ### ### ### ### ### /	51
neutrofilů tyčky	////	4
lymfocyty	### ### ### ### ### ### ###	35
monocyty	### //	7
eosinofily	//	2
basofily	/	1

Tab. 2. Poměrné zastoupení jednotlivých typů leukocytů u vybraných druhů zvířat

druh	neutrofilů v %		lymfocyty v %	monocyty v %	eosinofily v %	basofily v %
	segmenty	tyčky				
skot	15-45	0-2	45-75	0-7	1-10	0-2
ovce	10-50	0-1	40-75	0-6	0-10	0-3
prase	10-39	0-7	49-85	0-5	0-6	0-2
kůň	40-78	0-6	16-50	0-10	0-4	0-1
pes	60-77	0-3	10-30	3-10	2-10	0-1
kočka	35-75	0-3	20-55	1-4	2-12	0-1

Pozorování krevních elementů

Krevní nátěry mikroskopujeme při zvětšení objektivu 100x s použitím imerzního oleje. Při použití okuláru 10x je tedy celkové zvětšení 1000x. Další zvětšení může zajistit i binokulární hlavice (často 1,25x).

V krevních nátěrech jsme schopni posoudit morfologii červených krvinek, bílých krvinek a krevních destiček. Absolutní počty těchto elementů se získávají jinými metodami než za použití krevních nátěrů (Bürkerova komůrka, počítačí automaty aj.)

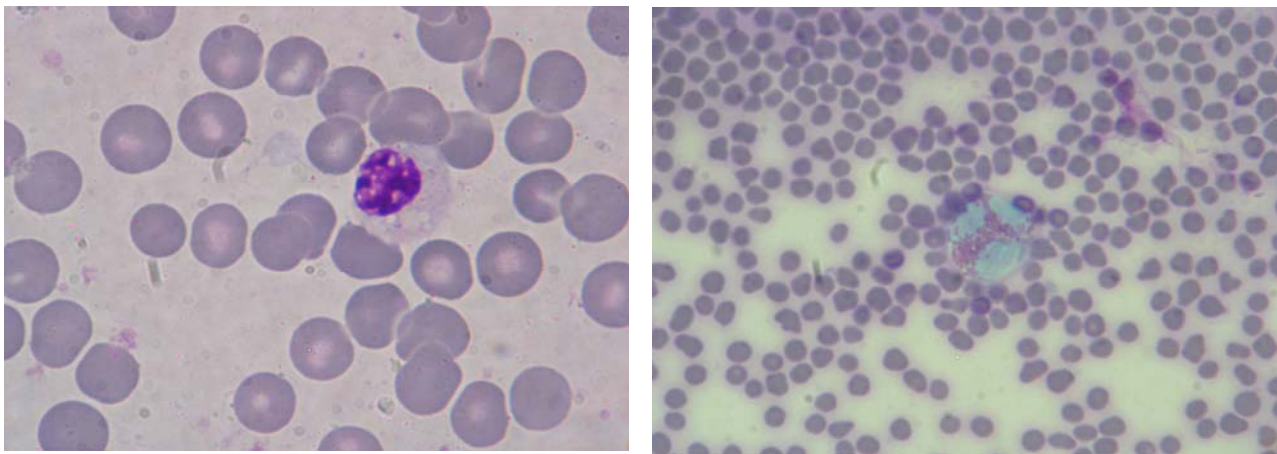
Červené krvinky = erythrocyty

Erythrocyty savců jsou bezjaderné a většinou mají bikonkávní tvar s piškotovitým průřezem. U některých savců mohou být erythrocyty více kulovité, u velbloudovitých dokonce oválné. Velikost se různí dle druhu zvířete a je nepřímo úměrná celkovému počtu erythrocytů v krvi. Jedny z největších erythrocytů má slon (délka 9,1 μ m), ale také jich má malý počet. Z domácích zvířat má nejmenší krvinky koza (4 μ m) (viz obr. 1 a 2).

Velikost buněk by měla být v krevním nátěru stejná nebo jen s malými odchylkami (obr. 3). Změny velikosti a tvaru mohou značit různé poruchy organismu, ale často vznikají i nedokonalým odběrem krve a zpracováním nátěru (obr. 4).

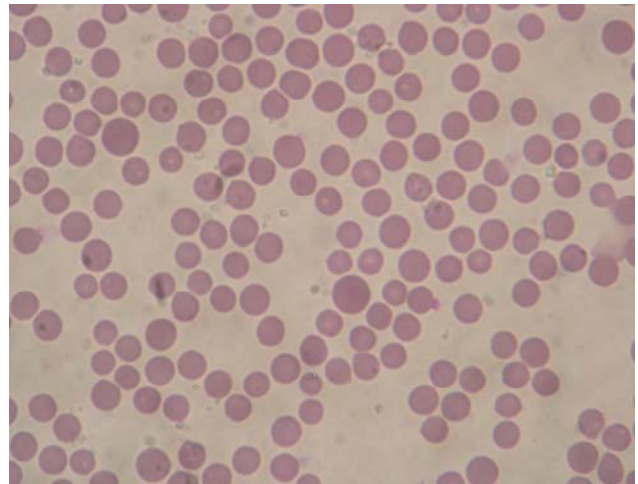
V erythrocytech můžeme dále posoudit přítomnost různých tělísek (často zbytky původního jádra). V nátěrech se současně objevuje i určité procento mladších forem erythrocytů – reticulocyty (obr. 5).

U ptáků, plazů a ryb jsou erythrocyty oválné s vyvinutým jádrem. U plazů a ryb jsou obvykle širší než u ptáků (obr. 6 a7).

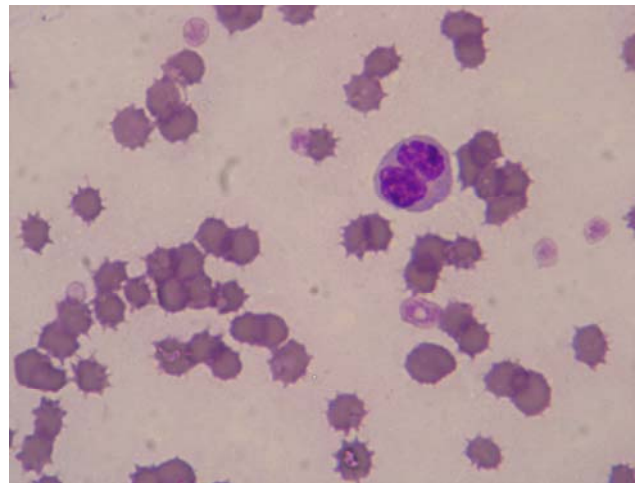


Obr. 1 a 2. Porovnání velikosti erythrocytů v krevním nátěru slona afrického (vlevo) a kozy domácí (vpravo). Pro srovnání lze použít i leukocyty, které jsou přibližně stejně velké. Oba nátěry jsou foceny při stejném zvětšení. U obr.1 jsou zřetelné světlejší středy erythrocytů, které jsou dány tím, že střed je tenčí než okraje krvinky.

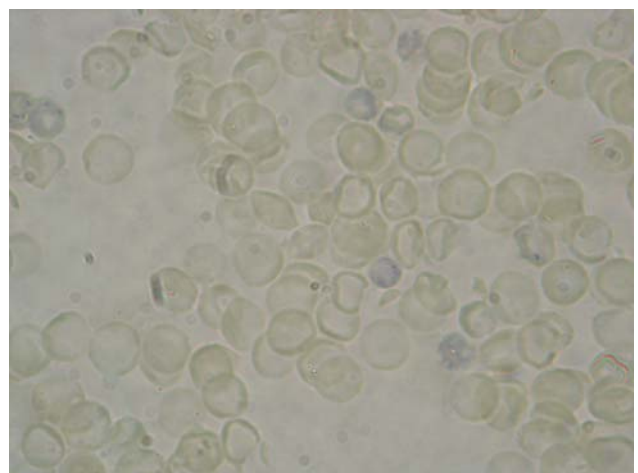
Obr. 3. Erytrocyty většiny zdravých zvířat vykazují mírnou variabilitu ve své velikosti (antilopa vraná).



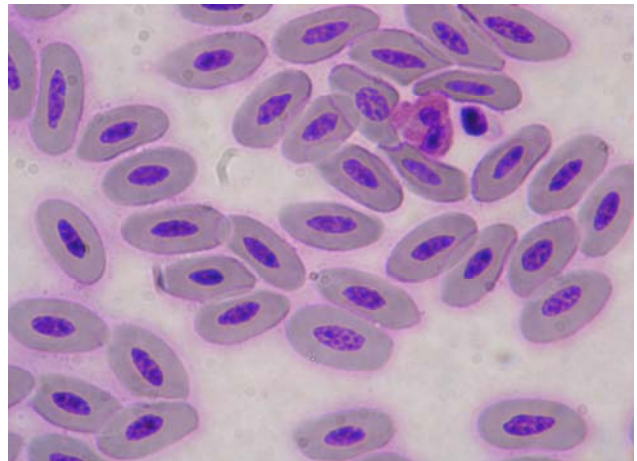
Obr. 4. Deformace erytrocytů způsobená nesprávným zpracováním vzorku krve (kočka domácí).



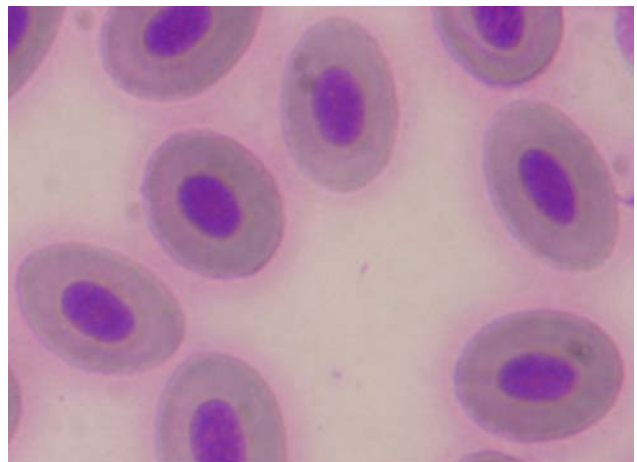
Obr. 5. Retikulocyty (modře zbarvené, barvení na retikulocyty) v krvi fretky.



Obr. 6. Oválné erytrocyty se zřetelným jádrem u ptáků (jeřáb).



Obr. 7. Široce oválné jaderné erytrocyty ryb (kapr obecný).



Bílé krvinky = leukocyty

Rozlišujeme pět základních typů bílých krvinek. V jejich rozlišování nám napomáhá jejich velikost, tvar buněčného jádra, přítomnost granul v cytoplazmě a jejich barva.

Leukocyty se rozdělují podle přítomnosti granul v cytoplazmě na granulocyty, které je mají, a na agranulocyty, které je nemají nebo jich mají velmi málo. Dalším výrazným znakem je rozdíl ve tvaru jádra.

Granulocyty

Společným znakem je tvar jádra. Jádra granulocytů mají různý tvar podle stáří buňky. Mladší formy mají jádra protáhlá, různě zakřivená. Tyto typy se označují jako tyčky (obr. 8, 10). Jádra zralých granulocytů jsou laločnatá nebo segmentovaná a označují se jako segmenty (obr. 9, 11). Podíl tyček a segmentů se určuje především u neutrofilních granulocytů.

Podle afinity granul ke kyselým nebo zásaditým barvivům rozlišujeme tři typy granulocytů, a to granulocyty eosinofilní, basofilní a neutrofilní.

Neutrofilny. Granula neutrofilů se nebarví příliš výrazně ani kyselými, ani zásaditými barvivy a slabě přijímají oba typy barviv. Výsledná barva a zřetelnost granul tedy není zcela zřejmá.

Obdobou neutrofilů jsou u ptáků *heterofily*. Jejich granula jsou více acidofilní a barví se tedy výrazněji. Granula heterofilů mají protáhlý až větvenovitý tvar (obr. 13-15).

Eosinofily. Granula eosinofilů přijímají kyselá barviva (eosin) a jejich výsledná barva je červená. Výrazná granula mají eosinofily např. u koní (obr. 16-18).

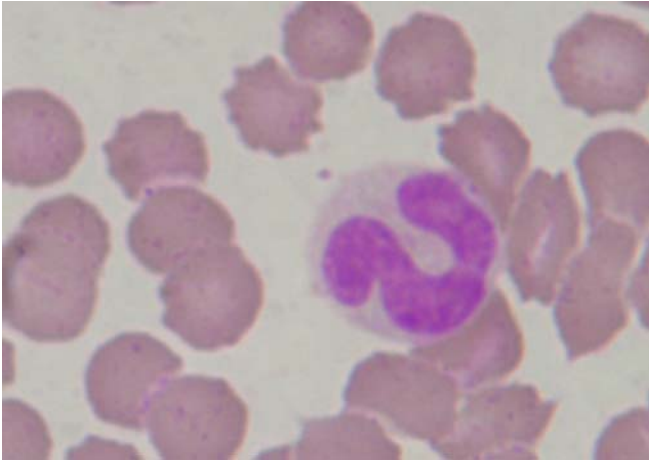
Basofily. Granula basofilů přijímají zásaditá barviva (hematoxylin) a jejich výsledná barva je modrá (obr. 19-21).

Agranulocyty

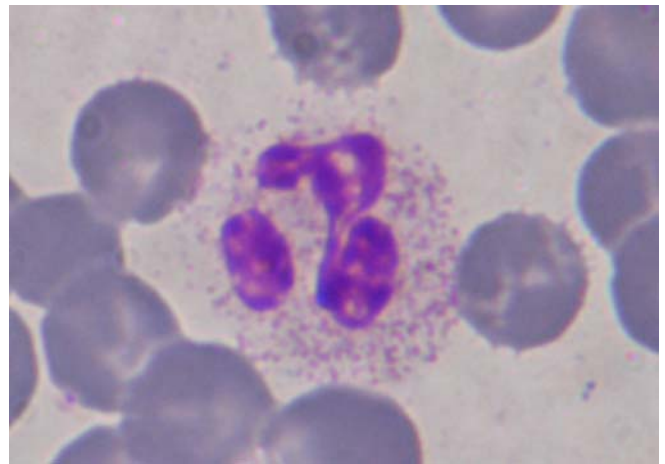
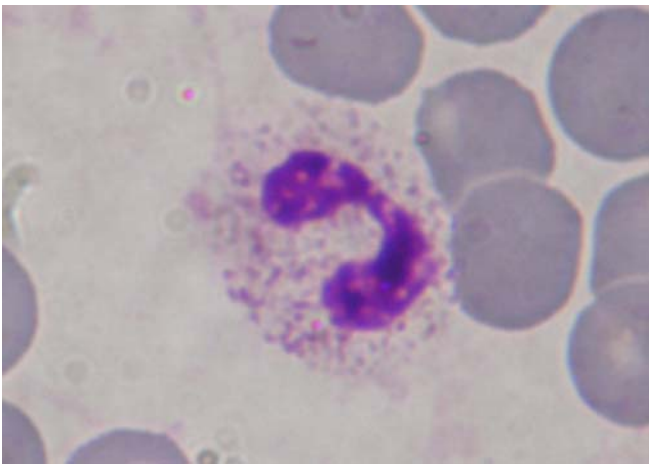
Agranulocyty ve své cytoplazmě granula většinou nemají, výjimečně můžeme nalézt ojedinělá granula. Společným znakem je, podobně jako u granulocytů, tvar jádra. U granulocytů je však jádro velké, kompaktní, většinou kulovité nebo mírně laločnaté. Podle tvaru jádra a množství cytoplazmy rozlišujeme dva typy agranulocytů, a to lymfocyty a monocyty.

Lymfocyty. Lymfocyt je vzhledem k ostatním leukocytům menší velikosti. Má velké kulovité jádro a malé množství světle modře se barvící cytoplazmy. Dle velikosti a množství cytoplazmy lze dále rozlišit lymfocyty na malé a velké (obr. 22-25).

Monocyty. Monocyty jsou velké buňky s výrazným nadbytkem cytoplazmy. V jejich cytoplazmě můžeme vidět vakuoly nebo fagocytované částice. Tvar jádra monocytů je nepravidelný, většinou ledvinovitý nebo mírně laločnatý

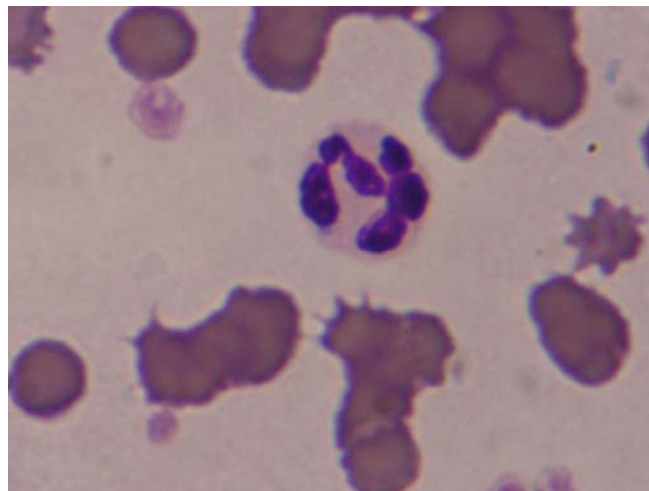


Obr. 8 a 9. Mladý neutrofil – tyčka (vlevo) a zralý neutrofil – segment (vpravo) v krvi psa.

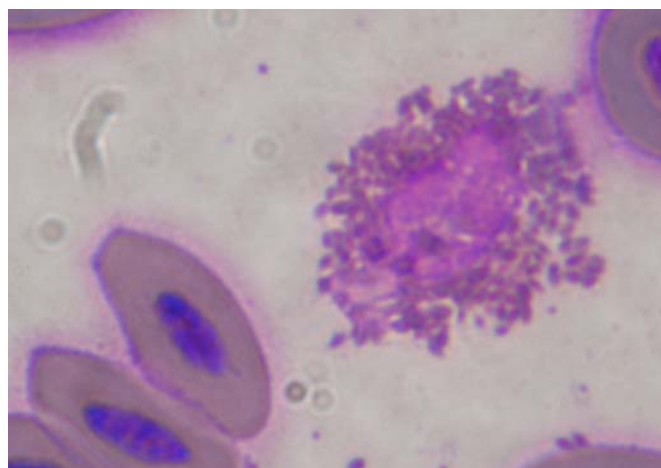
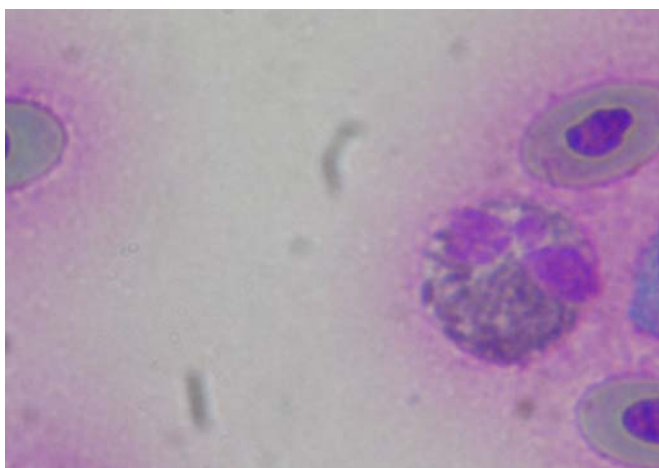
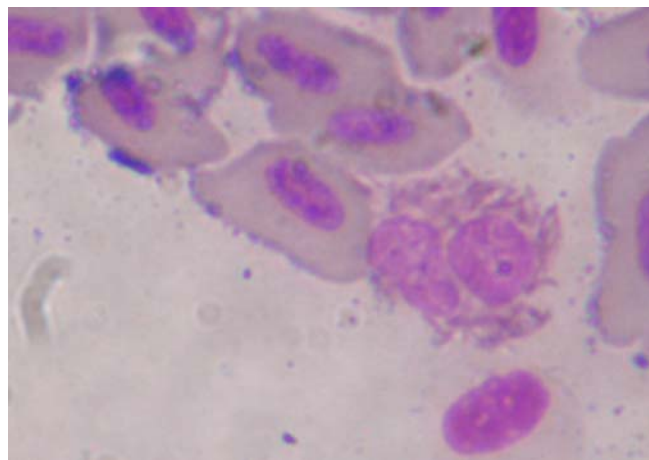


Obr. 10 a 11. Tyčka a segment neutrofilů se zřetelnými granuly v krvi slona afrického.

Obr. 12. Zřetelně segmentované jádro neutrofilu (kočka domácí).

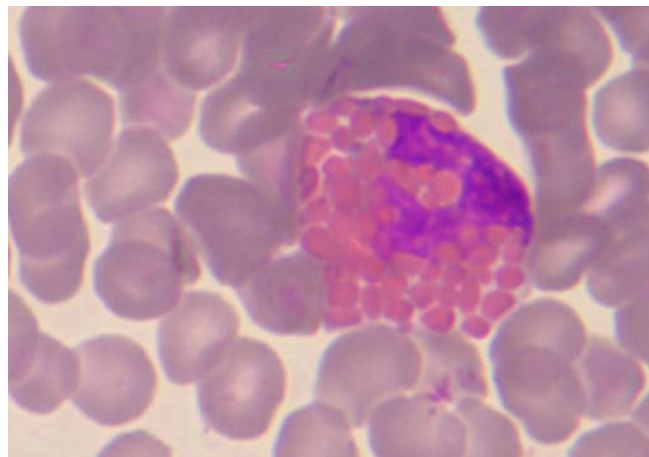


Obr. 13. Heterofil andulky vlnkované má typická větvená granula.

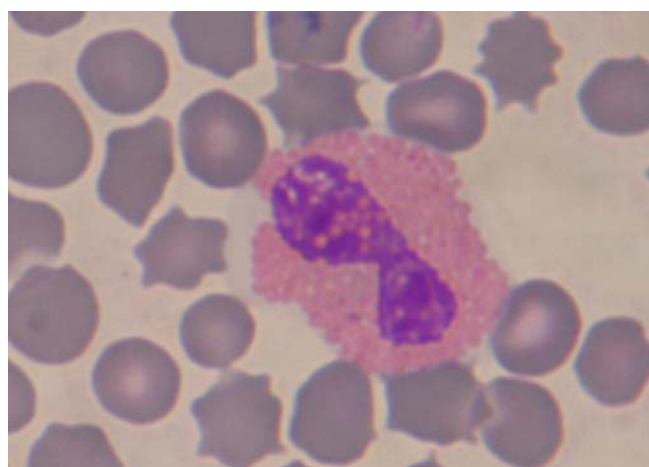


Obr. 14 a 15. Další možnosti vzhledu heterofilů ptáků. Vlevo heterofil kura domácího, vpravo rozpadající se heterofil s více oválnými granuly jeřába.

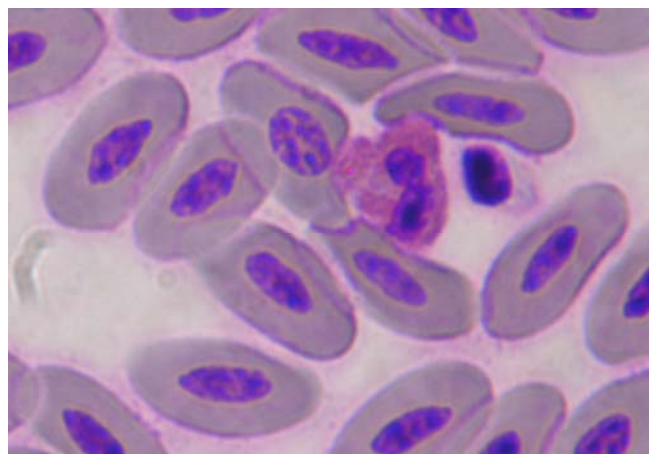
Obr. 16. Eosinofil koně má výrazná granula, která mnohdy překrývají jádro.



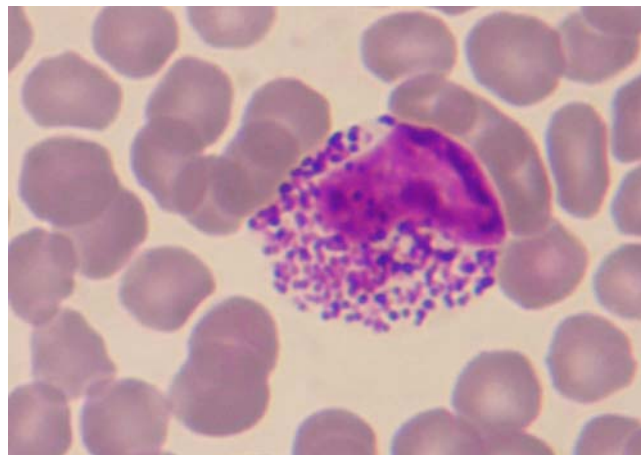
Obr. 17. Eosinofil tygra ussurického. na levém okraji eosinofilu je vidět část volné cytoplazmy (světle modrá).



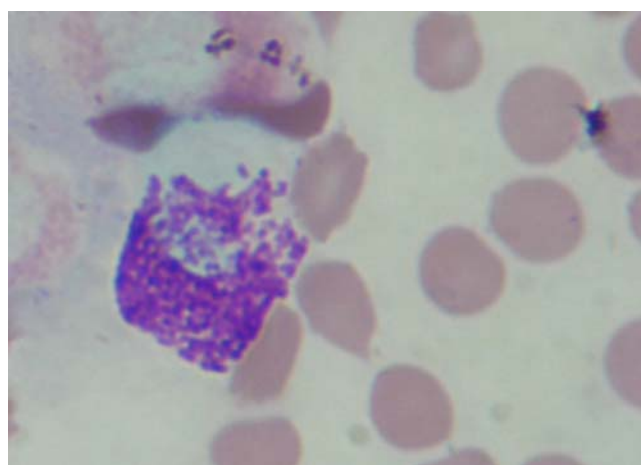
Obr. 18. Jednotlivá granula eosinofilu nemusí být vždy zřetelná a eosinofil určíme pomocí barvy.



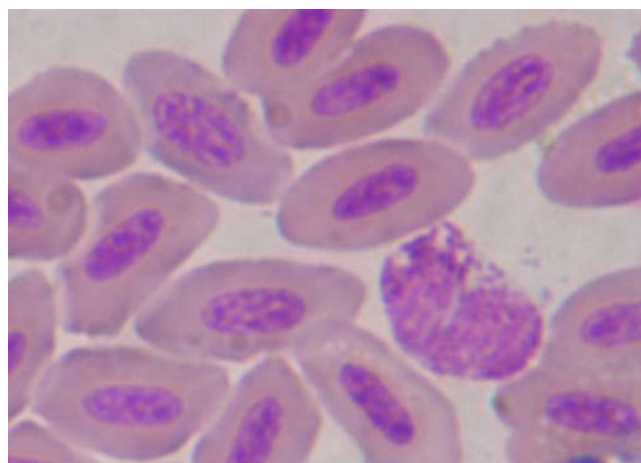
Obr. 19. Basofil koně.



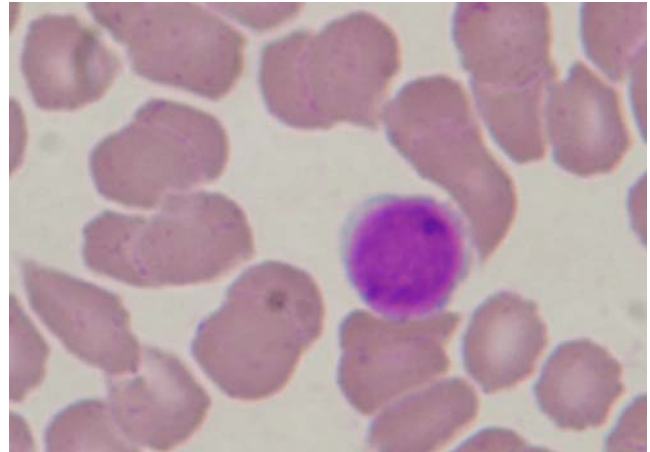
Obr. 20. Basofil skotu domácího s vylitými granuly.



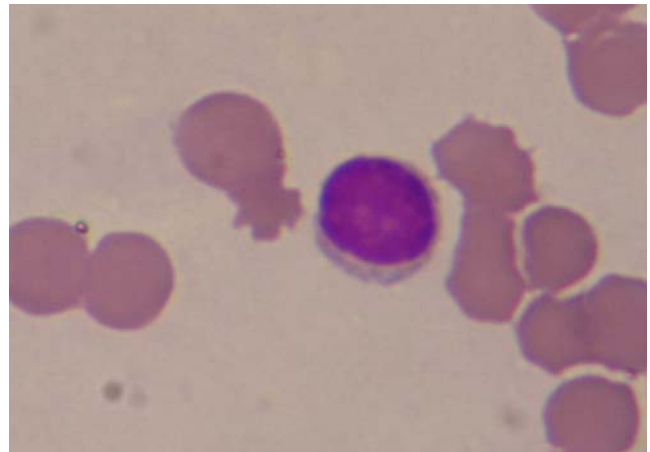
Obr. 21. Basofil andulky vlnkované.



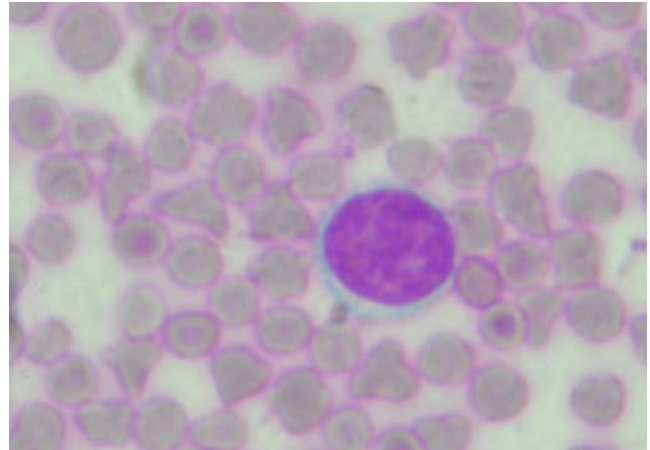
Obr. 22. Typický malý lymfocyt je o málo větší než červené krvinky, má velké kulaté jádro a malé množství světle modré cytoplazmy. Ta je často zřejmá pouze jako srpek cytoplazmy na okraji lymfocytu. Lymfocyt psa.



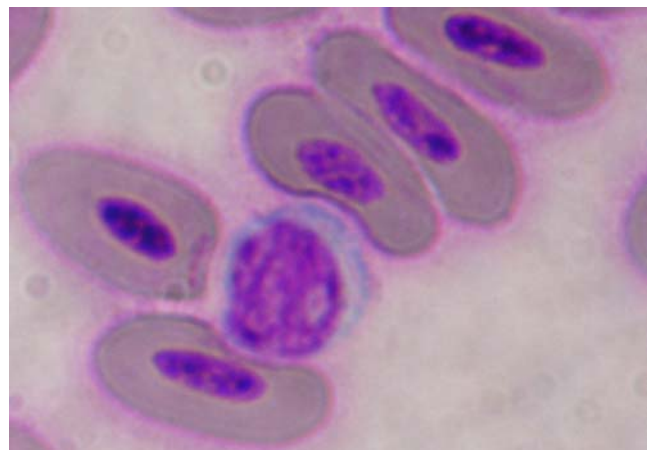
Obr. 23. Typický malý lymfocyt (kočka).



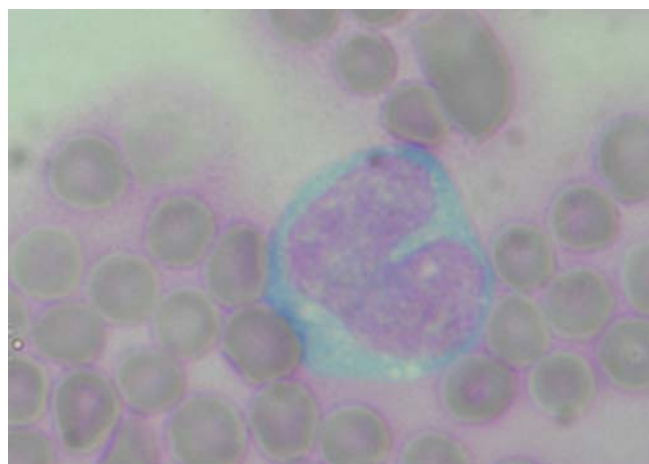
Obr. 24. Lymfocyt kozy domácí s malým prstencem bledě modré cytoplazmy.



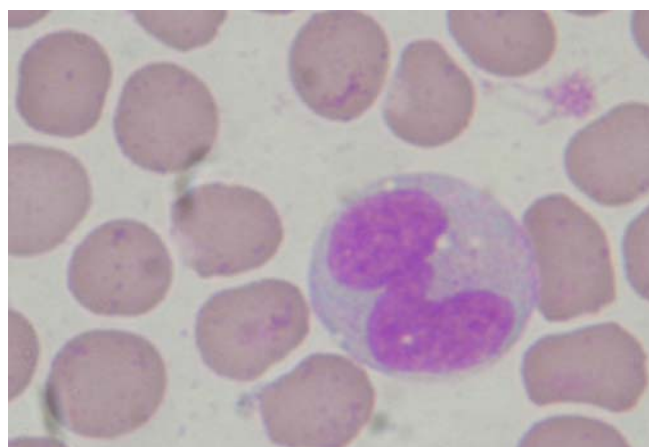
Obr. 25. Ptačí lymfocyty vypadají stejně jako savčí. Lymfocyt jeřába.



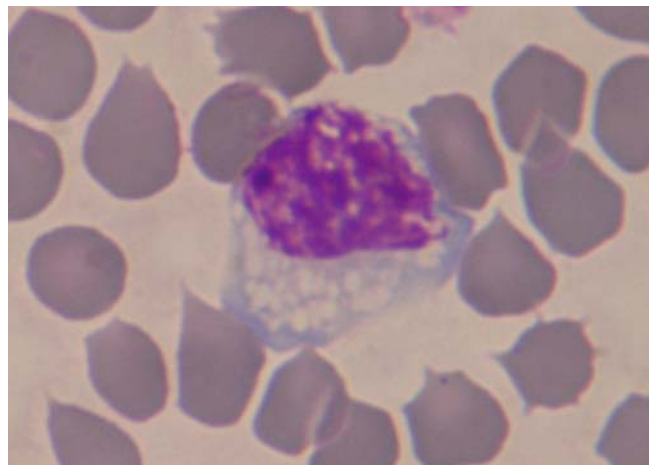
Obr. 26. Monocyt ovce s typickým ledvinovitým jádrem. V bleděmodré cytoplazmě jsou patrné vakuoly.



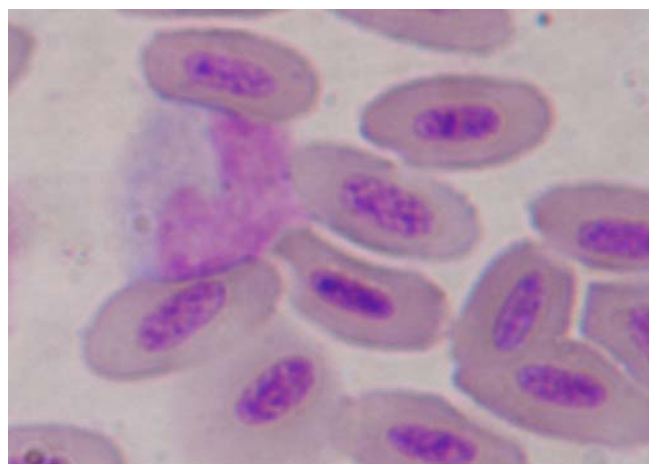
Obr. 27. Monocyt s vícelaločnatým jádrem (kůň).



Obr. 28. Monocyt tygra ussurijského s cytoplasmou s četnými vakuolami.



Obr. 29. Ptačí monocyty (andulka vlnkovaná) vypadají obdobně jako savčí. Velké ledvinovité jádro a velké množství cytoplazmy.

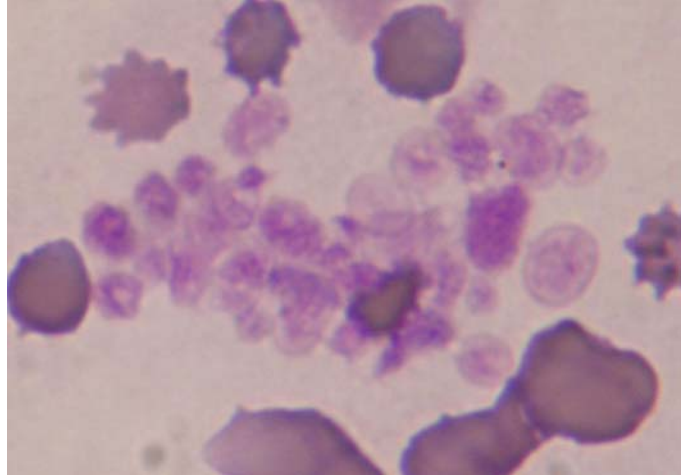


Krevní destičky = trombocyty

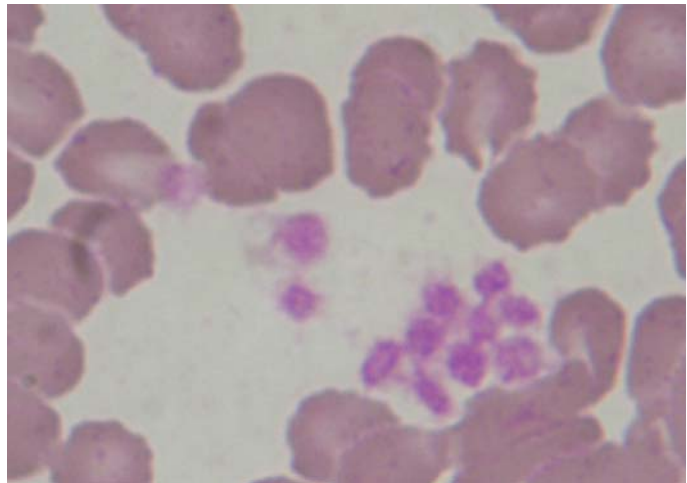
Trombocyty v krvi savců jsou bezjaderné úlomky buněk – megakaryocytů. U různých savců jsou krevní destičky více či méně pozorovatelné. Zřetelné jsou např. u šelem (obr. 30, 31).

U ptáků jsou trombocyty samostatné jaderné buňky (obr. 32)

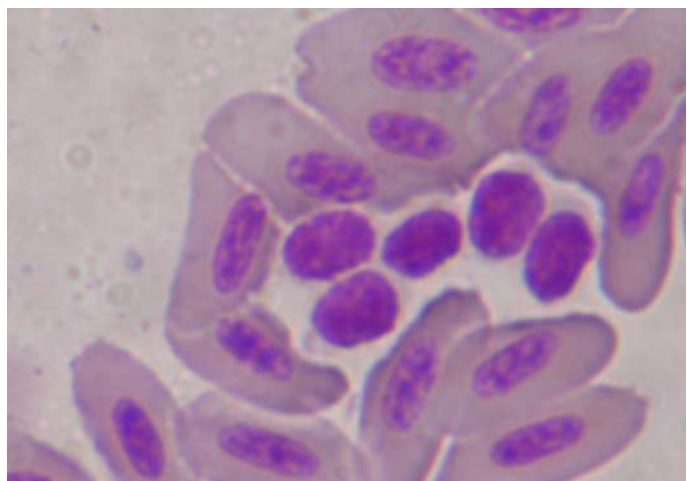
Obr. 30. Shluk trombocytů kočky.



Obr. 31. Trombocyty psa.



Obr. 32. Trombocyty ptáků jsou jaderné. Kolem velkého oválného jádra pozorujeme malé množství světle se barvící cytoplazmy (andulka vlnkovaná).



Počítání krevních elementů

Počet krevních elementů můžeme stanovit mikroskopicky počítáním v počítacích komůrkách nebo pomocí hematologických automatů.

Z počítacích komůrek se nejčastěji používá Bürkerova komůrka. Na této komůrce jsou vyryty dvě počítací mřížky. Každá z nich je rozdělena třemi čarami na devět velkých čtvercových polí, jejichž strana měří 1 mm. Tato pole jsou tvořena středními čtverci o ploše $1/25 \text{ mm}^2$ a v jejich rozích jsou malé čtverce s plochou $1/400 \text{ mm}^2$. Po stranách středních čtverců jsou obdélníky, jejichž plocha se rovná čtyřem malým čtvercům, tedy $1/100 \text{ mm}^2$. Přikrytím ploch s mřížkami krycím sklem vzniká prostor na počítání krvinek vysoký 0,1 mm.

Krev pro toto vyšetření musí být stabilizovaná (s přísadkou antikoagulační látky). Krev před počítáním je nezbytné naředit, a to nejčastěji v baničkách. Od toho má tato metoda počítání název baničková.

Stanovení počtu červených krvinek - baničková metoda

Potřeby: stabilizovaná krev, Hayemův roztok (chlorid rtuťnatý 0,5 g, chlorid sodný 1,0 g, síran sodný 5,0 g a destilovaná voda do 200,0 ml), skleněná banička se zátkou, mikropipeta na krev s obsahem 25 μl , mikropipeta na Hayemův roztok s obsahem 4975 μl , Bürkerova komůrka s krycím sklíčkem, Pasteurova pipeta, mikroskop.

Postup: Do baničky přeneseme 4975 μl Hayemova roztoku. Do něho přidáme mikropipetou 25 μl krve. Je nezbytné dbát na přesnost ředění, a tedy množství roztoku a krve. Proto před vypuštěním krve do Hayemova roztoku otřeme povrch mikropipety gázou, krev vypouštíme na dno baničky do roztoku, aniž bychom potřísnila stěny baničky a mikropipetu ještě několikrát propláchneme Hayemovým roztokem. Poté baničku uzavřeme gumovou zátkou a krouživými pohyby šetrně obsah baničky promícháváme přibližně 3 minuty.

Vzorek nasajeme Pasteurovou pipetou a naplníme mřížku Bürkerovy komůrky. Při plnění je již na mřížce připevněno krycí sklíčko a držíme ji šikmo. Hrot pipety přiložíme ke hraně sklíčka a necháme roztok vtéct do prostoru mřížky. Mřížka by měla být pokrytá celá, bez vzduchových bublin. Je vhodné nechat takto nachystanou komůrku 2-3 minuty nechat stát pro lepší ustálení krvinek. Mezitím si můžeme nachystat mikroskop. Sledujeme pod objektivem 20x nebo 40x.

Erytrocyty počítáme ve 20 obdélnících nebo 80 malých čtvercích. Počítáme všechny krvinky nacházející se uvnitř těchto ploch a dotýkající se jejich dvou stran (do L). Krvinky dotýkající se dvou zbývajících stran nepočítáme. Zvolené strany dodržujeme u všech obdélníků/čtverců stejné. Tomuto pravidlu počítání se říká Bürkerovo pravidlo a zajišťuje zpřesnění a zvýšení objektivnosti počítané plochy. Pro větší objektivnost výsledku je vhodné úhlopříčně spočítat celou plochu mřížky, tedy střední i okrajové části.

Množství spočítaných erytrocytů vynásobíme 10 000 a tím získáme počet erytrocytů v 1 μl krve. V 1 μl krve jsou řádově miliony erytrocytů, tedy uvádíme počet v 10^6 , př. $6,5 \times 10^6 / \mu\text{l}$. Často se počty erytrocytů uvádí na 1 liter krve, musíme tedy počet vynásobit 1000x, celkový počet tedy vychází v 10^{12} , což se uvádí jako T/l (T = tera = 10^{12}).

Zvýšený počet erytrocytů nazýváme polycytémie a snížený počet je erytopenie nebo anemie.

Stanovení počtu bílých krvinek - baničková metoda

Postup stanovení počtu leukocytů je velmi podobný stanovení počtu erytrocytů. Leukocytů je v krvi řádově 1000x méně než erytrocytů, proto používáme menší ředění a také jiný ředící roztok. Ten současně umožní rozrušení červených krvinek.

Potřeby: stabilizovaná krev, Türkův roztok (kyselina octová ledová 3 ml, 10% vodný roztok gentiánové violeti 2 ml, destilovaná voda do 300,0 ml), skleněná banička (menší) se zátkou, mikropipeta na krev s obsahem 25 μl , mikropipeta na Türkův roztok s obsahem 475 μl , Bürkerova komůrka s krycím sklíčkem, Pasteurova pipeta, mikroskop.

Postup: Do baničky přeneseme 475 μl Türkova roztoku. Do něho přidáme mikropipetou přesně 25 μl krve. Baničku uzavřeme zátkou a šetrně obsah baničky promícháváme přibližně 3 minuty.

V Bürkerově komůrce počítáme leukocyty ve velkých čtvercích, přičemž dodržujeme Bürkerovo pravidlo a opět se snažíme spočítat čtverce v celé ploše mřížky. Celkem spočítáme 100 čtverců a výsledný počet násobíme 50x, eventuelně můžeme spočítat 50 čtverců a pak násobit 100x. Takto získáme počet leukocytů v 1 μl krve, hodnoty leukocytů na μl se pohybují řádově v tisících. Tyto hodnoty odpovídají při přepočtu na 1 litr krve hodnotám $10^9/\text{l} = \text{G/l}$ ($\text{G} = \text{giga} = 10^9$).

Zvýšený počet leukocytů nazýváme leukocytóza a snížený počet je leukopenie.

Tab. 3. Hodnoty erytrocytů, leukocytů a trombocytů u vybraných druhů zvířat.

druh	erytrocyty $\times 10^6 / \mu\text{l}$	leukocyty $\times 10^3 / \mu\text{l}$	trombocyty $\times 10^3 / \mu\text{l}$
skot	5,0-10,0	4,0-12,0	200-800
ovce	9,0-15,0	4,0-12,0	-
prase	5,0-8,0	11,0-22,0	175-580
kůň	6,5-12,0	5,0-10,0	100-300
pes	5,5-8,5	6,0-17,0	200-460
kočka	5,0-10,0	5,5-19,5	180-430

Použitá literatura:

- Bock, U. 1994. Směrné hodnoty důležitých laboratorních vyšetření pro domácí zvířata. vydavatel v ČR Vetpres-vydavatelství a.s. Biopharma-VÚBVL, Jílové u Prahy.
- Cowell, R.L., Tyler, R.D., Meinkoth, J.H. 1999. Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. Mosby, Inc., St. Louis.
- Hawkey, C.M., Dennett, T.B. 1989. Comparative Veterinary Haematology. Wolfe Publishing Limited, London.
- Sokolová, J. a kol., 2005. Laboratorná technika I. PROXIMA PRES, Bratislava.

Katalog fotografií naleznete na <http://projekty.sosvet.cz/>

Text neprošel jazykovou úpravou.