

LP - Realizarea unui frotiu sanguin

Sângele reprezintă un tip special de țesut conjunctiv lichid care asigură transportul oxigenului și a altor metaboliți în interiorul organismului la vertebrate. Este alcătuit din plasmă (55%) și celule sanguine (45%, mai sunt denumite elemente figurate). Din categoria celulelor, regăsim majoritar hematii (98%), globule albe (maxim 2%), dar și plachete sanguine (trombocite, fragmente celulare). În funcție de prezența în citoplasmă a unor granule ce conțin substanțe

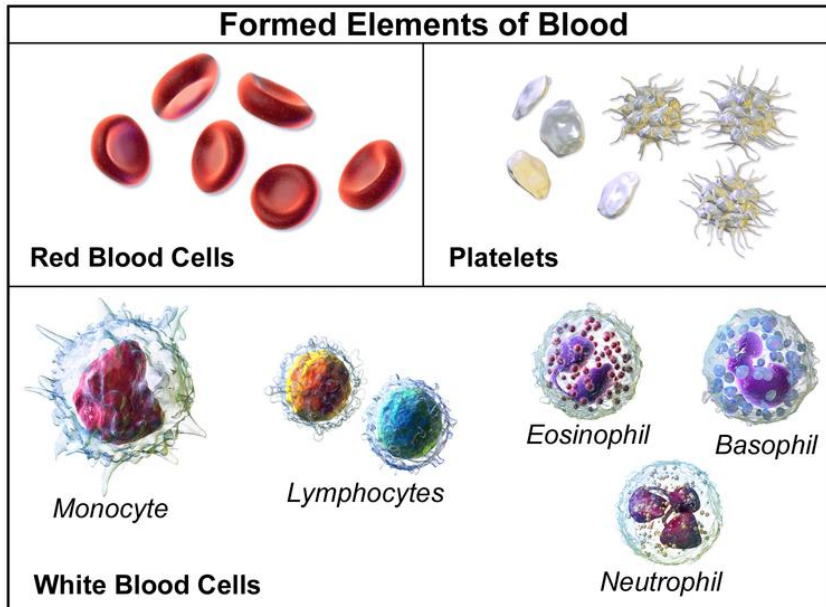


Figura – Tipuri de celule sanguine (elemente figurate), Credit: BruceBlaus, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0425_Formed_Elements.png

active, globulele albe pot fi granulocite (neutrofile 60-70%, eozinofile 2-4% și bazofile 0,5-1%) sau agranulocite (limfocite 20-25% și monocite 3-8%). Dacă plasăm celulele albe în ordinea descendentă a ponderii lor în sângele periferic, reținem acronimul NLMEB pentru a memora ordinea lor (**N**ever **L**et **M**onkeys **E**at **B**ananas – **N**eutrofile, **L**imfocite, **M**onocite, **E**ozinofile, **B**azofile).

În pofida dezvoltării remarcabile a tehnicilor de numărare și identificare a celulelor din probele hematologice (cu ajutorul analizoarelor automate), tehnica examinării

microscopice a unui frotiu sanguin executat în mod manual rămâne o metodă de bază pentru hematologia de diagnostic, permițând identificarea modificărilor morfologice, a hemoparaziților, a celulelor neoplastice etc. Este de asemenea utilizată atunci când analizoarele automate raportează rezultate incerte.

Crearea unui frotiu sanguin de calitate presupune respectarea **câtorva recomandări:**

- sângele trebuie să fie la temperatura camerei, bine amestecat, fără cheaguri, prelevat dintr-un vacutainer cu EDTA (un anticoagulant ce chelatează ionii de Ca^{2+} din sânge și previne inițierea cascadelor de coagulare) sau heparină;
- se poate lucra cu sânge proaspăt periferic, prelevat prin puncție venoasă sau puncție digitală cu ajutorul unei lantete de unică folosință;
- lamele microscopice trebuie să fie de calitate premium, pre-curățate; în cazul în care nu se utilizează lame de calitate premium, cele avute la îndemână trebuie curățate foarte atent, cu alcool etilic sau izopropilic 90%, pentru eliminarea reziduurilor sau a prafului care pot împiedica observarea corectă la microscop;
- amestecarea conținutului vacutainerului se face cu mișcări ușoare, prin înclinări succesive, lente. Nu se agită și nu se întoarce cu capacul în jos!
- de preferat, pentru transferul sângelui pe lamă, se utilizează microtuburi pentru hematocrit; alternativ, se utilizează micropipeta;
- se lucrează cu atenție, iar deșeurile biologice sunt debarasate în mod corespunzător.

Procedura de lucru:

1. se plasează o picătură de sânge cu diametrul de 3-5mm la capătul unei părți a lamei microscopice curate;

2. o a doua lamă curată (de întindere) se va plasa deasupra picăturii, la un unghi de 30-45° față de lama pe care se etalează frotiul, în contact direct cu aceasta pe una din muchiile scurte; imediat în momentul în care picătura de sânge se întinde de-a lungul muchiei de contact, lama de întindere se trage de-a lungul lamei de etalare cu o mișcare lină, constantă și fermă, aplicând o presiune moderată, suficientă să permită contactul dintre cele două lame;

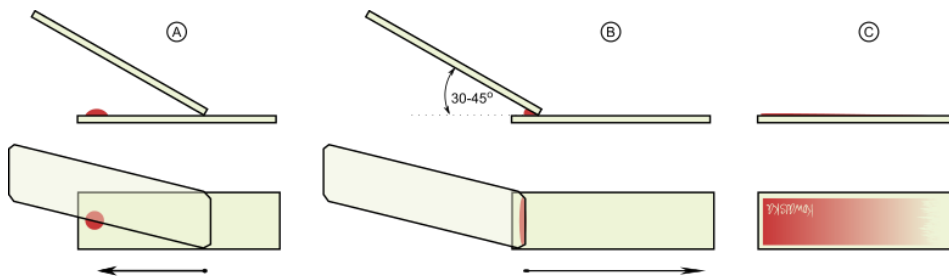


Figura – tehnica realizării frotiului sanguin;
Credit: Reytan
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blood_smear_prep.svg

tragere trebuie să fie destul de mare; presiunea prea mare aplicată va conduce la scurgerea sângelui de pe lamă la capăt, iar o presiune prea mică nu va permite realizarea unui frotiu subțire; dacă sângele este prea fluid, se poate mări unghiul de bătaie dintre cele două lame.

Ulterior realizării etalării, procedăm după următorii pași:

1. Se așteaptă până se usucă preparatul; de preferat preparatul se va fixa folosind metanol pur (30 secunde), pentru conservarea preparatului realizat;

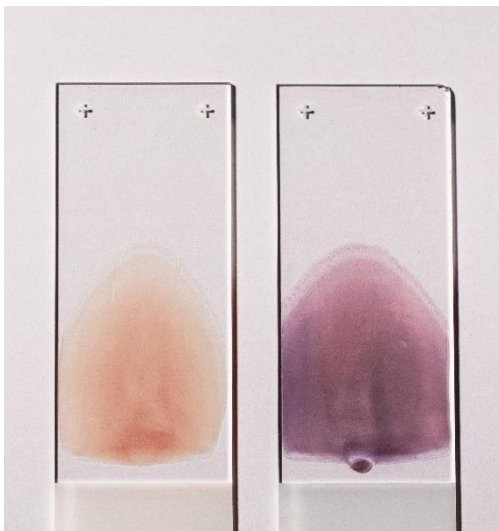


Figura – frotiu sanguin înainte și după colorare cu soluție Wright-Giemsa; Credit: Coimac
https://en.wikipedia.org/wiki/File:Peripheral_blood_smear_-_stained_and_unstained.jpg

2. Se acoperă cu colorantul dorit (câteva picături sunt suficiente). Alternativ, lamele pot fi imersate într-un pahar plin cu colorant. Se lasă 1-5 minute (sau mai mult, în funcție de recomandările producătorului) pentru a permite colorantului să pătrundă în celule;

3. Se diluează colorantul prin aplicarea unei cantități de apă distilată pe lamă;

4. Se clătește cu apă distilată cu ajutorul pisetei;

5. Se usucă la aer;

6. Se vizualizează la microscopul optic, de preferat în ulei de imersie (1000x).

În mod obișnuit, celulele sanguine (ca și alte celule vii) sunt incolore, iar vizualizarea lor la microscop se face cu dificultate. Pentru a permite vizualizarea facilă a lor și identificarea corectă a diferitelor tipuri de celule, se utilizează diferiți coloranți, compuși chimici care aderă la structurile celulare și care absorb în mod specific lumina vizibilă. Coloranții pot fi bazici sau acizi, având afinitate pentru structurile celulare acide,

respectiv baze. De regulă, se utilizează o combinație de doi coloranți (colorație compusă).
Coloranții simpli utilizați în histologie și în hematologie sunt:

-albastrul de metilen, colorează de obicei nucleul, dar poate colora ușor și citoplasma; este un colorant bazic, care se atașează de structurile acide prezente preponderent în nucleu (acizii nucleici ADN și ARN);

-eozina, colorează în general doar citoplasma și membranele celulare în nuanțe de roșu; este un colorant acid cu afinitate pentru structurile bazice (proteinele cu caracter bazic preponderent localizate citoplasmatic)

-hematoxilina, un colorant bazic; conține săruri de aluminiu care acționează ca mordant,

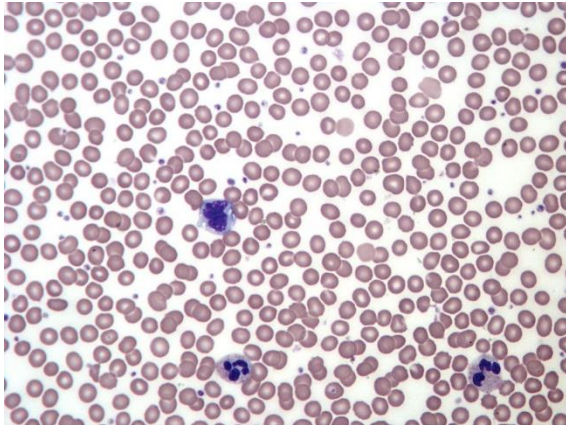


Figura - aspect microscopic normal al frotiului sanguin; se pot observa trei leucocite; Credit Vivrolfe

https://en.wikipedia.org/wiki/File:Normal_Adult_Blood_Smear.JPG

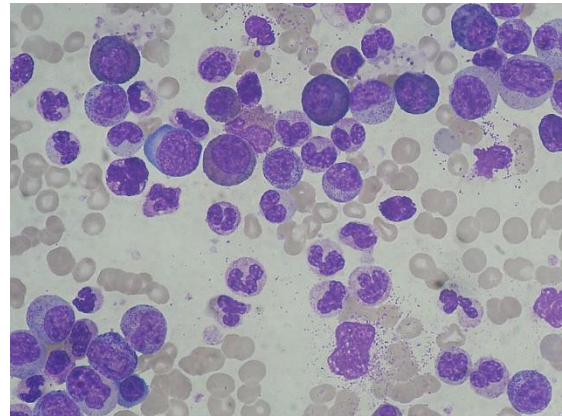


Figura - aspect microscopic al frotiului sanguin la o persoană cu leucemie mieloidă cronică; Credit Paulo Henrique Orlandi Mourao

https://en.wikipedia.org/wiki/File:Chronic_Myeloid_Leukemia_smear_2009-04-09.JPG

favorizând atașarea hemateinei de structurile acide, pe care le colorează în purpuriu.

Coloranții compuși permit obținerea unui contrast bun între citoplasmă și nucleu:

-colorantul Leishman (conține derivați de la albastru de metilen și eozină).

-Giemsa (amestec de albastru de metilen, eozină și Azur B), etapa de colorație durează până la 30 minute; se utilizează o concentrație de 5%; este un colorant ce permite bandarea cromozomilor și colorarea puternică a nucleilor celulelor;

-colorația lui Wright (amestec de eozină și albastru de metilen); permite identificarea celulelor pe frotiuri, asemănător cu Giemsa;

-colorația Wright-Giemsa (amestec de soluție Wright și soluție Giemsa);

-colorația lui Field (pe frotiuri subțiri, pentru identificarea paraziților care cauzează malaria).

Aspectul microscopic al celulelor sanguine

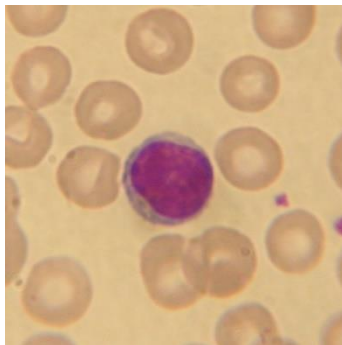
Eritrocitele (globule roșii sau hematii) reprezintă aproximativ 98% din numărul total de elemente figurate ale sângelui. În fiecare secundă, în măduva osoasă se produc 2-3 milioane de eritrocite. Un ml de sânge conține aproximativ 5 miliarde de eritrocite. Funcția eritrocitelor este de a transporta gazele (oxigen și dioxid de carbon) între țesuturile organismului și plămâni. Durata medie de viață este de circa 120 zile, diametrul eritrocitelor este de aproximativ 7,5 μm , având formă biconcavă. Eritrocitele mamiferelor nu prezintă nucleu și nici organite celulare. În schimb, eritrocitele altor grupe de animale sunt nucleate. Eritrocitele se pot observa pe toate preparatele microscopice prezentate în continuare, înconjurând leucocitele.

Leucocitele (celulele albe) sunt celulele sanguine vii, cu formă sferică sau ovoidă, cu rol în procesele de imunitate a organismului.



Neutrofilele sunt cele mai numeroase din leucocite ($4500/\text{mm}^3$). Nucleul lor prezintă 3-5 lobi iar citoplasma lor conține atât granule acidofile, cât și granule bazofile. Neutrofilele atacă agenții patogeni direct, prin fagocitoză. Produc citokine ce mediază activitatea altor celule ale sistemului imunitar. Sunt produse în măduva osoasă într-un număr impresionant de $\sim 10^{11}$ celule pe zi. Se mai numesc polimorfonucleare (PMN).

Figura - neutrofilă, colorația Wright; Credit Lennert B
<https://en.wikipedia.org/wiki/File:PBNeutrophil.jpg>



Limfocitele sunt cele mai răspândite agranulocite ($2500/\text{mm}^3$). Nucleul lor nu prezintă lobi și este supradimensionat. Citoplasma este clară, nu prezintă granule. Limfocitele produc anticorpi (limfocite B) pentru lupta împotriva corpurilor străini și atacă celulele organismului (limfocite T) care sunt canceroase sau infectate cu virusuri.

Figura - limfocit, colorația Wright; Credit Bernanke's Crossbow
[https://en.wikipedia.org/wiki/File:Lymphocyte_\(square\).jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Lymphocyte_(square).jpg)

Monocitele se regăsesc într-un număr de aproximativ $300/\text{mm}^3$ sânge, fiind de asemenea cele mai mari leucocite ($12-18 \mu\text{m}$). Nucleul monocitelor este reniform (formă de potcoavă). Citoplasma este clară fiindcă nu conțin granule. Monocitele joacă roluri importante pro- și anti-inflamatorii în procesele imune. Se pot diferenția în macrofage și celule dendritice, cu roluri tisulare specifice. Monocitele pot fagocita celule străine mari dar și virusuri întregi. Macrofagele înlătură „deșeurile” ce sunt prezente la nivelul țesuturilor, precum particulele străine din plămâni.

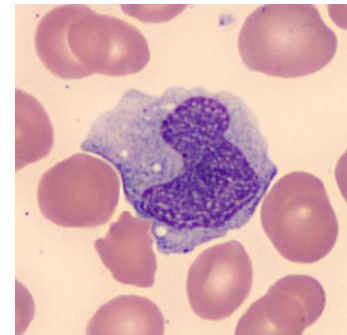
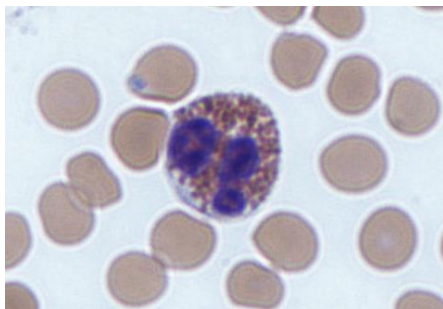


Figura - monocit, colorația Wright; Credit El*Falaf
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hem1Monocyte.jpg>



Eozinofilele sunt granulocite cu rol în fagocitoză, de dimensiuni $12-15 \mu\text{m}$. Granulele lor citoplasmatic se colorează în roșu în prezența eozinei. Principalul lor rol este antiparazitar, cu acțiune la nivelul intestinului, jucând roluri și în coagularea sângelui. Nucleul are 2-3 lobi.

Figura - eozinofilă, colorația Giemsa; Credit Graham Beards
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eosinophil_2.jpg

Figura - bazofilă, colorația Wright; Credit Lennert B
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PBBasophil.jpg>

Bazofilele sunt cele mai rare leucocite ($50/\text{mm}^3$) având dimensiuni relativ reduse ($9-11 \mu\text{m}$). Nucleul prezintă trei lobi, mai rar doi. Atât citoplasma cât și nucleul se colorează în albastru-violet închis. Bazofilele pot detecta și distruge celulele precanceroase. Granulele



bazofilelor conțin histamină, ce este eliminată la exterior în episoadele de reacție alergică sau atacuri astmatice.

Figura de mai jos prezintă etapele principale ale diferențierii elementelor figurate ale sângelui, etape ce se desfășoară în principal în măduva osoasă, dar și în alte țesuturi (exemplu: plasmocite, macrofage).

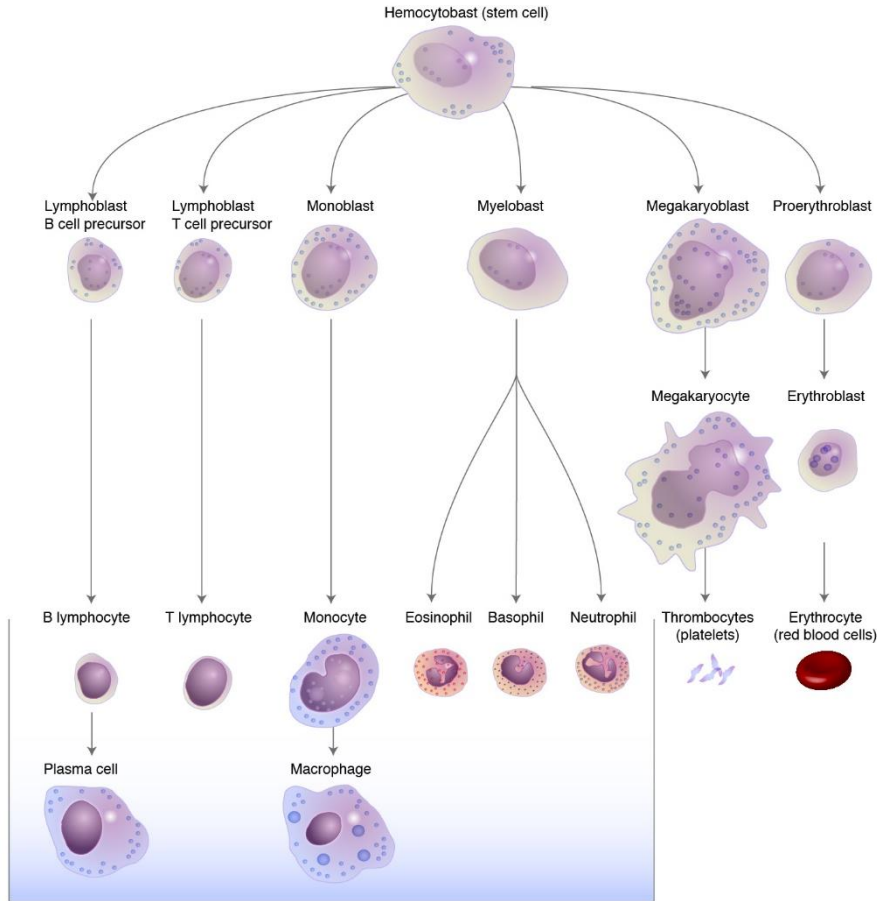


Figura - diferențierea celulelor sanguine; Credit NIH NHGRI <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Lymphocyte>