

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

**Porovnání přístrojového a mikroskopického stanovení diferenciálního
rozpočtu leukocytů**

Bakalářská práce

Autor: Veronika Netrefová

Vedoucí práce: MUDr. Ivan Vonke

Datum odevzdání: 6. 5. 2010

Comparison of devices and microscopical assesment differential count of leukocytes

Abstract

This thesis deals with methods of determination of differential count of leukocytes and their positives and negatives. No wonder that nowadays modern haematology analyzers have been used for determination of differential count of leukocytes due to technical progress, however manual assesment by microscope keep still being a basic element of good work in a haematology laboratory.

In the practical part I will describe single work procedures and these methods will be then compared according to the observed results. The Coulter LH 750 analyzer by Beckman Coulter Inc. based on the principle of electric impedance has been used in Nemocnice České Budějovice a.s. for automatic assesment of differential count of leukocytes. In case of the microscopic assesment a blood film is made which is then stained by Pappenheim method with May - Grünwald and Giemsa - Romanovsky colours. Then I will try to suggest an optimization for current investigation of the complete blood picture.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Porovnání přístrojového a mikroskopického stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které uvádím v příložené bibliografii.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích

.....

Podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala především svému školiteli MUDr. Ivanu Vonkemu, za odborné vedení a poskytnutí důležitých informací k psaní mé bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala laborantkám z oddělení Klinické hematologie Nemocnice České Budějovice a.s. za jejich spolupráci.

Obsah

Úvod	6
1. Současný stav	7
1.1 Vývoj, morfologie a funkce leukocytů	7
1.2 Krevní obraz	9
1.2.1 Nenádorové změny v počtu leukocytů	9
1.3 Metody stanovení počtu leukocytů	10
1.3.1 Manuální stanovení pomocí mikroskopu	11
1.3.2 Metoda elektrické impedance – Coulter princip	12
1.3.2.1 Nátěrový automat Coulter LH Series Slide Maker	14
1.3.3 Optické metody	15
1.4 Laboratorní informační systém (LIS)	16
2. Cíl práce a hypotézy	17
2.1 Cíl práce	17
2.2 Hypotézy	17
3. Metodika	18
3.1 Příjem materiálu do laboratoře hematologie	18
3.2 Automatizované stanovení 5 – populačního diferenciálního rozpočtu leukocytů	18
3.3 Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů pomocí mikroskopu	21
3.3.1 Zhotovení krevního nátěru a jeho obarvení	21
4. Výsledky	23
4.1 Vyhodnocení NRBC	26
4.2 Vyhodnocení patologických buněk	27
4.3 Srovnání obou metod	29
5. Diskuze	32
6. Závěr	35
7. Seznam použité literatury	36
8. Klíčová slova	41

Úvod

Stanovení počtu leukocytů je velmi důležitou a nedílnou součástí stanovení celkového krevního obrazu. Důležitým parametrem je i zjištění přesného zastoupení typů leukocytů z periferní krve (diferenciální rozpočet leukocytů), který je důležitý pro stanovení diagnózy. Změněné poměry mohou být příznakem různých infekčních onemocnění. Přítomnost nezralých bílých krvinek v krevním oběhu je příznakem leukémie.

Hlavním cílem jakéhokoliv laboratorního stanovení je zjistit dostatečně přesné výsledky pro klinické použití (Buttarelo 2004). V dnešní době se využívají 3 hlavní analytické metody stanovení počtu leukocytů, a to manuální stanovení pomocí mikroskopu, metoda elektrické impedance a optická metoda. Dlouhou dobu bylo metodou číslo jedna právě manuální počítání pomocí mikroskopu (Barnes et al. 2005), avšak vzhledem k velikému pokroku v oblasti moderní medicíny, vědy a techniky, se do laboratoří dostávají stále novější a propracovanější analyzátory, které se vyznačují hlavně svou přesností, spolehlivostí, poměrně malým množstvím krve potřebné k vyšetření a v neposlední řadě je velkým přínosem jejich rychlost (100 - 120 vyšetření za hodinu). Hematologické analyzátory poskytují podle typu přístroje od 24 - 48 parametrů, včetně diferenciálního rozpočtu leukocytů, histogramů a scategramů erytrocytů, leukocytů a trombocytů (Pecka 2006).

Na oddělení Klinické hematologie (OKH) Nemocnice České Budějovice a.s. se ke stanovení krevních elementů využívá analyzátoru společnosti Beckman Coulter - Coulter LH 750. Typů hematologických analyzátorů je celá řada a podrobněji se jimi budu zabývat v průběhu své práce.

1. Současný stav

Fyziologický počet leukocytů se u dospělého člověka pohybuje v rozmezí $4,0 - 10,0 \cdot 10^9/l$ (Penka a kol. 2001). Leukocyty se dělí na dvě skupiny: granulocyty a agranulocyty. Granulocyty označujeme jako neutrofilní, eozinofilní a bazofilní podle barvení jejich granul v cytoplazmě. U dospělého člověka je 40 - 70 % leukocytů neutrofilních, 2 - 10 % eozinofilních, 0 - 1 % bazofilních. Mezi agranulocyty patří lymfocyty a monocyty; lymfocyty tvoří 20 - 40 %, monocyty 2 - 10 % bílých krvinek. Toto zastoupení označujeme jako diferenciální rozpočet leukocytů (Rokyta 2008). Ani nejpropracovanější analyzátoři v podmínkách nemocnice se všemi obory však nejsou schopny stanovit správně diferenciální rozpočet leukocytů přibližně u 15 % pacientů.

1.1 Vývoj, morfologie a funkce leukocytů

Neutrofilie se v organismu dospělého člověka vyskytují v kostní dřeni, v krvi a ve tkáních. V kostní dřeni dochází k množení a dozrávání neutrofilních granulocytů (od myeloblastů až po segmentované granulocyty). Myeloblast je nezralá buňka s velkým oválným jádrem, jádérky a většinou neobsahuje žádná granula. Tato buňka je odvozena z progenitorových buněk a dozrává v promyelocyt, ve kterém jsou již zjevná peroxidáza-pozitivní granula. Dalším stádiem vyžívání je myelocyt, jehož granula jsou peroxidáza-negativní a v této fázi již mizí jádérka. Klíčovým nástrojem a ukazatelem azurofilních granul v lidské kostní dřeni i v krevních buňkách pro světelnou i elektronovou mikroskopii je tedy peroxidázová reakce. Posledním předstádiem zralých neutrofilů jsou pak metamyelocyty a neutrofilní tyče. Zralé neutrofilie mají granula tmavě fialová až růžovofialová, jejich jádro je členěné na segmenty, které jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky. Plně vyžralý eozinofilní neutrofil má dvoulaločné jádro a je vyplněn cytoplazmou s velkými eozinofilními zrny. Při přípravě krevního nátěru je velmi citlivý k mechanickému poškození. Granula bazofilních neutrofilů jsou tmavě fialová až černá a překrývají většinu cytoplazmy i jádra. Prekurzory monocytů jsou monoblasty a promonocyty. Monoblasty se v kostní dřeni vyskytují ve velmi malém množství a bez použití elektronového mikroskopu je

téměř nerozeznáme od myeloblastů. Jádro zralého monocytu je ledvinovité, může však být i kulaté nebo nepravidelné, obvykle excentricky uložené. Cytoplazma této buňky je šedomodrá a vakuolizovaná. Lymfocyty se podle velikosti rozdělují na malé (6 - 9 μm) a velké (9 - 15 μm). Jejich jádro obsahuje velké množství kondenzovaného heterochromatinu. Podle funkce se lymfocyty rozdělují na T-lymfocyty (dozrávající v thymu) a B-lymfocyty, z nichž vyzárají plazmatické buňky, charakteristické bazofilní cytoplazmou a excentricky uloženým jádrem (Beuter et al. 2001).

Na činnosti leukocytů závisí vrozená i získaná imunitní odpověď. Vrozená imunita zahrnuje především granulocyty a makrofágy (tkáňová forma monocytů). Získaná imunitní odpověď závisí hlavně na lymfocytech, které poskytují celoživotní imunitu (Janeway et al. 2005). Neutrofilie jsou efektorové buňky imunitního systému. Hrají rozhodující roli nejen v obraně proti patogenům, ale jsou také schopné modulovat funkci ostatních imunitních buněk (Cascao et al. 2009). Jsou zodpovědné za chemotaxi, což je jeden z klíčových jevů imunitní reakce proti bakteriální infekci (Agrawal et al. 2008). Eozinofily jsou buňky specializované na sekreci cytokinů a mnoha dalších proteinů v průběhu zánětlivé reakce (Melo et al. 2008). Jsou považovány za silné efektorové buňky, které mají potenciál k uvolnění řady mediátorů zánětu a ke zničení tkáně při chronických zánětlivých onemocněních, jako je astma. Jsou také zapojeny do regulačních mechanismů a přispívají i vrozené a získané imunitě, stejně jako systémové adaptivní imunitě (Raap and Wardlaw 2008). Bazofily představují méně než 1 % z periferní krve. Fenotypově jsou podobné žírným buňkám. Podporují diferenciaci Th2 - lymfocytů a hrají klíčovou roli v IgG zprostředkované systémové anafylaxi (Mukai et al. 2009). Monocyty cirkulují v krvi jako ještě nezralé buňky, které pak vycestují do tkání a tam dozrávají v makrofágy. Mají velkou fagocytární kapacitu a hrají velmi důležitou roli při imunitní látkové obraně, protože na svém povrchu „umí“ vystavit bakteriální antigen a takto zpracovaný předložit lymfocytům (Mourek 2005). T i B - lymfocyty se účastní specifických imunitních reakcí. B - lymfocyty jsou zdrojem protilátek, T - lymfocyty mají regulační pomocnou, potlačující nebo přímou cytotoxickou funkci (Fučíková 1997).

1.2 Krevní obraz

Termínem krevní obraz označujeme vyhodnocení počtu červených a bílých krvinek, krevních destiček a jejich charakteristiku. Jako diferenciální rozpočet leukocytů označujeme vyhodnocení všech typů bílých krvinek ve vzorku periferní krve. Počty jednotlivých bílých krvinek vyjadřujeme jednak jejich procentuálním zastoupením z celkového počtu bílých krvinek a jednak jejich absolutní koncentrací (tab. 1). Při podezření na krevní onemocnění, je vhodné si vyžádat nejen strojový (automatickým analyzátozem vyhodnocený), ale také mikroskopický diferenciální rozpočet bílých krvinek, neboť patologické bílé krvinky, jejichž detekce vede ke stanovení diagnózy, nemusí být zachyceny ve strojovém diferenciálním krevním obraze, ale pouze při hodnocení mikroskopickém (Adam a kol. 2007).

Tab. 1 Fyziologické hodnoty leukocytů u dospělého člověka

Parametr	%	Relativní počet	Absolutní počet
Neutrofil	40 - 70	0,34 - 0,73	1,80 - 7,00
Tyč	1 - 5	0,01 - 0,07	0,00 - 0,40
Eozinofil	2 - 10	0,01 - 0,07	0,04 - 0,50
Bazofil	0 - 1	0,00 - 0,02	0,00 - 0,10
Lymfocyt	20 - 40	0,19 - 0,53	1,2 - 4,00
Monocyt	2 - 10	0,02 - 0,14	0,11 - 0,90

1.2.1 Nenádorové změny v počtu leukocytů

Změny v počtu bílých krvinek mohou provázet nejrůznější onemocnění. Zvýšení jejich počtu nazýváme leukocytóza, snížení počtu se označuje jako leukopenie. Většinou však přesněji určujeme, kterého typu bílých krvinek se početní změna týká. Při sníženém počtu neutrofilů hovoříme o neutropenii či granulocytopenii. S tou se nejčastěji setkáme po toxickém poškození kostní dřeně (např. některými léky). Někdy může vznikat imunologickými mechanizmy. Zvýšený počet neutrofilů je neutrofilie, častá při infekčních chorobách, při zánětu nebo sepsi. Při extrémně vysokých počtech

neutrofilů, s přítomností mladších vývojových forem v obvodové krvi, hovoříme o leukemoidní reakci. Změny v počtu ostatních typů bílých krvinek mají menší význam. Eozinofilie provází zpravidla alergické choroby a infekce vyvolané parazity. Lymfocytopenie provází některá nádorová onemocnění nebo se objevuje po léčbě např. glukokortikoidy. Lymfocytóza má nejčastěji infekční příčinu a provází některé virové infekce. Monocytóza je běžná u tuberkulózy (Klener a kol. 2001).

Typickým příkladem nenádorových chorob leukocytů je onemocnění infekční mononukleózou (způsobené virem Epstein - Barrové). V krevním obraze nacházíme na začátku onemocnění mírnou leukocytopenii, která přechází do leukocytózy - počet leukocytů bývá v rozmezí $10 - 20 \cdot 10^9/l$. V diferenciálním rozpočtu leukocytů je převaha lymfocytů, s přítomností reaktivních lymfocytů, což jsou transformované T - lymfocyty. Tyto buňky nejsou vždy snadno identifikovatelné a mohou být zaměněny s monocytoidními buňkami nebo mladými lymfocyty. Důležitým pojmem je i posun doleva - jedná se o posun v diferenciálním obraze k nezralým formám a je patrný u bakteriálních infekcí, u zánětů střevní sliznice, pankreatitid, zánětů žil i u nemocí pojiva. Posun doleva je také přítomen u stavů spojených s destrukcí buněk, např. u popálenin, hemolýzy či nekrózy jater. Dále bych zmínila posun doprava, kdy v krevním nátěru nacházíme vícejaderné segmenty a neutrofilii. Vyskytuje se u megaloblastové anémie a myelodysplastického syndromu (Lexová 2000).

1.3 Metody stanovení počtu leukocytů

Rychlé a přesné laboratorní vyšetření je v dnešní době zásadním kritériem. Rutinní manuální kompletní krevní obraz již postrádá reprodukovatelnost (Rappaport et al. 1988). V moderních nemocnicích a klinikách nahradily hematologické automatizované přístroje ruční metody pro stanovení hematologických parametrů (CBC) i mikroskopické „oční“ počítání diferenciálního rozpočtu leukocytů. Důvodem je přesnější detekce vzorků s distribučními nebo morfologickými odchylkami, než tradičním počítáním očima. Nicméně, mikroskopický diferenciální počet leukocytů byl jediným způsobem, jak identifikovat typy buněk a jejich relativní podíl, téměř 100 let.

Buňky byly identifikovány svým tvarem, intracelulárními strukturami a jejich barvicími vlastnostmi (Pierre 2002).

Osvědčená a mnoha roky prověřená technologie Beckman Coulter VCS zásadním způsobem změnila pohled na buněčné subpopulace leukocytů. Kombinace průtokové cytometrie, vysokofrekvenční vodivosti a impedanční metody poprvé v historii přístrojové analýzy leukocytů nabízí možnost standardizace a kvantifikace vlastností jednotlivých typů leukocytů. Zavedení měřítka pro velikost leukocytů, velikost jádra, granularitu a poměr velikosti jádra k velikosti leukocytu umožňuje použití matematických a statistických metod pro analýzu vlastností jednotlivých buněčných subpopulací leukocytů a zavedení statistického aparátu pro popis jejich patologií (Boudal 2006).

Mikroskopické hodnocení nátěru periferní krve však zůstává i nadále základem dobré práce v hematologické laboratoři. Kvalitní analyzátor krevního obrazu tuto práci významně ulehčí, a tak je možné plně vyhovět různorodým požadavkům kladeným na moderní laboratoř (Šigutová 2006).

Jak již bylo řečeno v úvodu práce, v dnešní době se využívají 3 hlavní metody stanovení počtu leukocytů: manuální metoda pomocí mikroskopu, metoda elektrické impedance a optická metoda.

1.3.1 Manuální stanovení pomocí mikroskopu

Techniku rozpoznávání různých typů bílých krvinek poprvé zavedl Ehrlich v roce 1898 (rozpoznával krvinky obarvené pomocí anilínových barviv).

Krevní nátěry se provádí z kapilární nebo žilní krve. Jako antikoagulační přísady se používá solí EDTA. Při diferencování se zjišťuje zastoupení morfologických typů buněk bílé řady v obarveném nátěru obvodové krve. Prohlíží se a hodnotí se zvlášť buňka, jádro a plazma.

U buňky hodnotíme velikost, tvar, vzhled, umístění v nátěru a dále jí porovnáváme s ostatními buňkami. U jádra sledujeme jeho velikost, uložení, tvar, uspořádání chromatinu a také počet, velikost a vzhled jadérek. U plazmy hodnotíme její

množství, vzhled, barvitelnost, výběžky, vakuolizaci, perinukleární vyjasnění, granulaci a inkluze. V rámci hodnocení periferního krevního obrazu se dále zjišťuje zastoupení normoblastů, které je nutné, pro následný přepočítání leukocytů. Zjišťujeme také posun v rámci vyžívání buněčných forem (posun k mladším nebo starším vývojovým formám), anomálie v buňkách jednotlivých křvetvorných řad a v neposlední řadě také výskyt některých dalších buněčných forem, např. holá jádra megakaryocytů nebo nezralé vývojové formy křvetvorných řad (Pecka 2006).

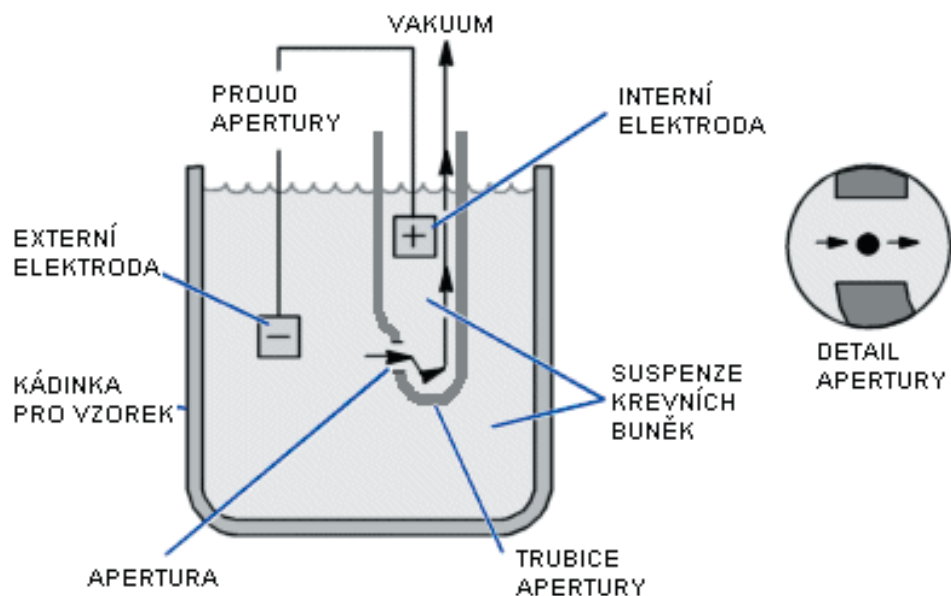
Nátěry periferní krve jsou barveny panoptickým barvením dle Pappenheima s použitím barviv Maye - Grünwaldova a Giemsa - Romanovského. V některých laboratořích se dává přednost modifikaci dle Wrighta (užívá bikarbonát sodný pro přeměnu metylénové modři do aktivní formy). Při těchto panoptických (tj. nespecifických) barveních dochází k odlišení jednotlivých buněčných struktur podle jejich pH (struktury kyselé - eozinofilní, struktury neutrální a struktury zásadité - bazofilní). Preparáty jsou vyšetřovány pod světelným mikroskopem jednak při malých zvětšeních (100 - 200 násobné) pro přehledné zhodnocení, jednak při zvětšeních, která umožňují detailní morfologické posouzení (zvětšení 1000 - 1200 násobné). Buňky periferní krve mohou být vyšetřovány i za pomoci elektronové mikroskopie (ultrastrukturální diagnostika). V tomto případě jsou elementy po fixaci impregnovány solemi těžkých kovů. Takto upravené buňky a buněčné struktury jsou vystaveny emisi elektronů a v závislosti na své denzitě tento tok elektronů odklánějí. Na fluorescenčním stínítku vzniká obraz, který může být fotograficky dokumentován (Mayer a kol. 2002).

1.3.2 Metoda elektrické impedance – Coulter princip

V roce 1953 Wallace Coulter (1913 - 1998), zakladatel a bývalý prezident společnosti Coulter Corporation, patentoval tzv. Coulterův impedanční princip - metodu pro stanovení počtu a velikosti částic v kapalině. Tato technologie navždy změnila klinickou diagnostiku a lékařský výzkum a stala se základem hematologických analyzátorů. Coulterův princip je v současnosti nejrozšířenější metodou pro stanovení počtu a velikosti částic v kapalině v lékařských a průmyslových aplikacích.

Metoda Coulter počítá a stanoví velikosti buňky zjištěním a změřením změn elektrického odporu, když částice (např. buňka) ve vodivé kapalině prochází malou aperturou. Každá buňka suspendovaná ve vodivé kapalině (ředícím roztoku) funguje jako izolátor. Průchod každé jednotlivé buňky aperturou zvyšuje v daném okamžiku elektrický odpor mezi dvěma ponořenými elektrodami, umístěnými na obou stranách apertury (obr. 1). To vyvolá elektrický impuls, který lze načítat a měřit jeho velikost. Zatímco počet impulsů indikuje počet částic, velikost elektrického impulsu je úměrná buněčnému objemu (Kružík a kol. 2006). Zpracování elektronických obvodů umožňuje simultánní měření impedance v několika frekvencích, v rozsahu od 100 kHz až 15 MHz (Gawad et al. 2001).

Na principu elektrické impedance pracuje například analyzátor od společnosti Beckman Coulter - Coulter LH 750, přístroj určený k počtu krevních buněk (CBC), diferenciálního rozpočtu leukocytů, a to včetně jaderných červených krvinek - NRBC (Amouroux et al. 2003). Tento analyzátor využívá k identifikaci buněk kombinaci tří měření - objemu, vodivosti a rozptylu. Těchto parametrů může využít i pro vyhodnocení jejich morfologických změn (Miguel et al. 2007).



Obr. 1 Schéma Coulter principu

Novějším analyzátozem společnosti Beckman Coulter je Coulter LH 780. Nové, rychlejší, analytické algoritmy kontrolují celou fázi průletu buňky měřicí aperturou tzv. „Flight - time“ a optimalizují následný čas potřebný pro ustálení systému tzv. „Wait -time“. Výsledkem je zdatelné zvětšení linearit, stability a rozsahu měření především u leukocytů a trombocytů. Horní hranice linearit měření leukocytů je 400000 WBC / ml a horní hranice měřicího rozsahu je přitom cca 800000 WBC / ml. Byly tak značně překonány hranice, jichž dříve dosahovaly pouze některé optické metody. Na opačném konci měřicí škály leží hodnoty, se kterými se v každodenní rutinní praxi setkáváme možná nejčastěji - leukocytopenie.

Vyspělá technologie VCS, s proměnným počítacím časem, je schopna validně diferencovat leukopenické vzorky již od 0,3 WBC. Dalším významným přínosem je automatická detekce přítomnosti normoblastů (NRBC), jejich numerické vyhodnocení a automatická korekce počtu leukocytů u každého vzorku bez nutnosti použití dalších reagentů. Do LIS (laboratorní informační systém) je možné přenášet i nekorigovaný počet leukocytů (Boudal 2006).

1.3.2.1 Nátěrový automat Coulter LH Series Slide Maker

Součástí analyzátoru Coulter LH 750 na OKH České Budějovice a.s. je nátěrový automat Coulter LH Series Slide Maker. Přístroj je plně softwarově řízen hematologickým analyzátozem Coulter LH 750 a lze ho používat pouze ve spojení s tímto analyzátozem. Jeho případná porucha však nenaruší funkci samotného hematologického analyzátoru. Slide Maker využívá odpadní krve z aspirační jehly a nezvyšuje se proto množství aspirovaného vzorku. Krev je v nátěrové jednotce uchovávána za stálého míchání během celé analýzy vzorku a po vyhodnocení výsledků krevního obrazu systém na základě libovolně nastavitelných a programovatelných kritérií vytvoří nátěr nebo krev vypustí do odpadu. Patentované technologické postupy při roztírání krevního filmu umožňují dosáhnout standardních parametrů nátěru, stejné délky filmu u všech vzorků (přístroj se adaptuje na viskozitu a hematokrit jednotlivých vzorků) a manuální metodou nedosažitelné, rovnoměrné rozptýlení monocytů v celém jednovrstvém nátěru. Vysušené a identifikačním štítkem označené nátěry jsou

v kazetách transportovány do výstupního boxu, odkud mohou automaticky postupovat do barvicí linky nebo mohou být obsluhou vyjmuty. Přístroj je koncipován jako bezúdržbový a veškeré čištění probíhá společně s čistícím cyklem připojeného hematologického analyzátoru LH 750. Použitá sklíčka jsou standartní se zabroušenými rohy a ukládají se do dvou zásobníků po 200 kusech (Boudal 2005).

1.3.3 Optické metody

Další metodou ke stanovení počtu leukocytů je metoda optická. Krevní částice se dostává do interakce s fokusovaným světelným paprskem, jehož zdrojem je halogenová žárovka nebo laser. Světlo se na povrchu částice rozptýlí a je zachyceno v různých úhlech detektorem, který generuje impuls odpovídající příslušné částici a nese i informaci o její velikosti. Rozptyl laserového paprsku na povrchu částice podává svědectví o morfologických vlastnostech částice, zejména o přítomnosti a počtu granul (Gregora a kol. 2001).

Jako příklad bych uvedla analyzátor společnosti Sysmex, Xe – 2100. Je založen na optické a elektrické měřící technologii, vylepšený přidáním průtokového cytometru, fluorescencí a schopností diferencovat rozpadlé buňky. Co se týče přesnosti, reprodukovatelnosti, linearity a časové stability, je tento analyzátor zcela uspokojivý. Výsledky 500 kompletních krevních obrazů a diferenciálů přesně souhlasily se získanými výsledky s analyzátozem Coulter STKS společnosti Beckman Coulter (Nakul - Aquaronne et al. 2003). Starším analyzátozem je Sysmex XT - 2000i, schopný změřit až 30 parametrů u hematologických vzorků v periferní krvi a jeho výkon je 80 vzorků za hodinu. Tento analyzátor se doporučuje jako záloha k Xe - 2100 nebo může být využit jako samostatný v laboratoři s menším objemem, ale širokým spektrem vyšetření (Fernandes and Hamaguchi 2003).

Optických metod využívá např. i analyzátor společnosti Abbott Diagnostics, CELL-DYN Sapphire, využívající integrované optické a fluorescenční (488 nm) měření. Detektory jsou pak konfigurovány pro fluorescenční analýzu (Johannessen et al. 2006).

1.4 Laboratorní informační systém (LIS)

Kromě počítačů, které řídí činnost analyzátorů a jsou jejich integrální součástí, jsou v laboratoři i další počítače, k nimž jsou analyzátory připojené. Vytvářejí síť, kterou spolu s patřičným programovým vybavením nazýváme laboratorní informační systém (LIS). Ten může být samostatný nebo pracuje v přímé návaznosti na nemocniční informační systém, který řídí chod klinické části zdravotnického zařízení.

Veškerý přijatý biologický materiál je registrován a vhodným způsobem označen. Obvykle se užívá číselné značení, které jednoznačně určí vzorek i jeho charakter (rutinní, statimový, vzorek s požadavkem speciálních metod apod.). Údaje o pacientovi a kódy požadovaných laboratorních metod je nutné vložit do počítače. To se děje buď manuálně, nebo lépe, je-li pacient identifikován čárovým kódem, příslušným čtecím zařízením. Čárovými kódy mohou být označeny i jednotlivé metody, činidla v přístrojích apod.; ještě více údajů v sobě uchovávají dvourozměrné dot-kódy. Stále více laboratoří začíná využívat zadávání požadavků na laboratorní vyšetření prostřednictvím informační sítě přímo na klinickém pracovišti (tzv. elektronická žádanka).

V případě, že je analyzátor přímo (on-line) napojen na počítač LIS, jsou k němu požadavky přenášeny přímo. Po provedení analýzy, jsou-li v pořádku výsledky kontrolních měření, jsou výsledky automaticky přenášeny zpět a přiřazovány k jednotlivým pacientům. Pro přístroje, které nejsou součástí sítě LIS, lze vytisknout pracovní deník, podle něho provést analýzu a výsledky vložit do systému manuálně. Laboratorní informační systém může podle předem daného algoritmu automaticky doplnit výsledky laboratorních testů o další metody a tak značně urychlit diagnostický a tím i léčebný postup. Tento algoritmus může být obsažen i v programu řídícím chod analyzátoru.

Konečně správný LIS by měl umožňovat i třídění výsledků podle předem zvolených kritérií. Těmi může být např. pohlaví a věk nemocného, překročení určité kritické hladiny, období, kdy byla vyšetření prováděna apod. Je tak cenným pomocníkem při využití laboratorních údajů pro vědecké a statistické účely (Racek 2006).

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem práce je blíže zmapovat rozdíly mezi automatickým a mikroskopickým stanovením diferenciálního rozpočtu leukocytů a navrhnout vhodný algoritmus pro vyšetření. Přibližně u 10 - 15 % pacientů dochází k selhání automatického diferenciálního rozpočtu, což je dáno hlavně přítomností patologických buněk, které analyzátor není schopen vyhodnotit. Vhodným algoritmem vyšetření lze omezit subjektivní stránku rozhodování.

2.2 Hypotézy

Hypotéza 1. Předpokládaný počet mikroskopicky přepočítávaných diferenciálů na oddělení Klinické hematologie Nemocnice České Budějovice a.s. se bude pohybovat kolem 10 %.

Hypotéza 2. Lze identifikovat skupiny rizikových pacientů, u nichž procento mikroskopicky předělávaných diferenciálů výrazně převyšuje průměr.

Hypotéza 3. U některých skupin pacientů je procento selhání přístrojových diferenciálů tak vysoké, že nemá cenu tuto analýzu provádět.

3. Metodika

V této kapitole popíši jednotlivé postupy stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů podle zpracovaných dat. Tato data jsem získala na OKH Nemocnice České Budějovice a.s., kde jsem vykonávala praxi k této práci.

3.1 Příjem materiálu do laboratoře hematologie

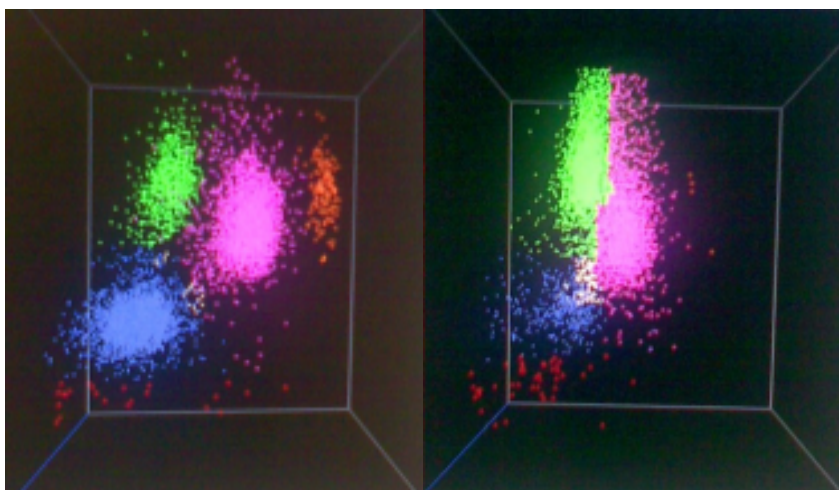
Postupy v laboratoři předcházející vlastnímu vyšetření zahrnují příjem materiálu se žádankou o vyšetření, identifikaci materiálu, přípravu materiálu před vlastním vyšetřením a transport materiálu na určený úsek laboratoře. Vzorky pro vyšetření celkového krevního obrazu (tj. počet erytrocytů, hemoglobinu, hematokritu, trombocytů a leukocytů, včetně diferenciálního rozpočtu leukocytů) se odebírají do zkumavky s antikoagulačním přípravkem EDTA (vakuety s fialovým uzávěrem). Vzorek materiálu musí být popsán nezaměnitelnou identifikací pacienta (údaje na štítku zkumavky se musí shodovat s údaji na žádance o vyšetření). Žádanka musí obsahovat jméno pacienta, rodné číslo, číselný kód diagnózy a označení zdravotní pojišťovny, žádající zařízení a požadovaná vyšetření. Pokud některý z těchto údajů chybí, je nutné kontaktovat příslušné oddělení a doplnit chybějící údaj. Připravené zkumavky s krví pacientů se poté vloží do speciální kazety a následně do analyzátoru.

3.2 Automatizované stanovení 5 - populačního diferenciálního rozpočtu leukocytů

Před vložením vzorku do analyzátoru ho musíme promíchat několikanásobným otočením zkumavky o 180° ve vertikální ose (tímto zamezíme vzniku sraženiny). Tyto vzorky krve jsou označeny identifikačním čárovým kódem a umístěny do speciálních kazet. Kazety jsou poté vloženy do zásobníku na pravé straně analyzátoru, odkud jsou automaticky posouvány k místu aspirace a promíchávány. Vzorek je automaticky aspirován pomocí jehly, která pronikne víčkem vakuety a současně je čárový kód identifikován čtečkou. Po změření všech vzorků je kazeta posouvána směrem od místa aspirace a nakonec je uložena do zásobníku na levé straně

analyzátoru. Část vzorku je smíchána v míchací komůrce s předeřtým lyzačním činidlem pro DIFF analýzu a během míchání je přidán stabilizační roztok pro DIFF analýzu, který stabilizuje leukocyty. Výsledky počtu jednotlivých populací leukocytů jsou pak vyjádřeny v procentech a v absolutních počtech: NE % udává počet neutrofilů na 100 leukocytů (WBC), stejným způsobem jsou vyjádřeny parametry LY % (lymfocyty), MO % (monocyty), EO % (eozinofily), BA % (bazofily). Absolutní počet neutrofilů (10^9 neutrofilů/ l) je určen vztahem: $(NE \% / 100) \times \text{počet WBC}$. Stejným způsobem jsou vyjádřeny i parametry LY, MO, EO, BA (10^9 buněk / l).

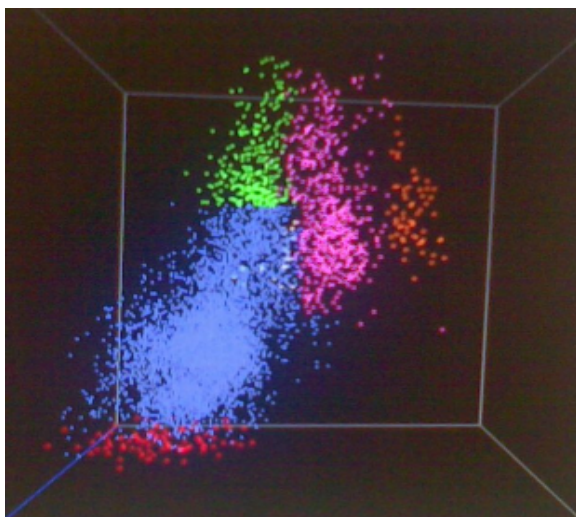
Diferenciální rozpočet leukocytů přepočítáváme pomocí mikroskopu vždy při výslovné indikaci lékaře. Pokud není výslovně indikován, řídíme se výsledky měření, a to hlavně 3D grafem. Na grafu jsou růžovou barvou znázorněny neutrofilové, modrou lymfocyty, zelenou monocyty, oranžovou eozinofily a bílou bazofily. Posun buněk neutrofilní řady v 3D grafu směrem nahoru je dán pravděpodobným výskytem nezralých forem dané populace (obr. 2). Podle grafu a také podle poznámek pod ním pak předpokládáme výskyt nezralých forem. Poznámka **Imm. NE 1** předpokládá výskyt pouze neutrofilních tyček. **Imm. NE 2** pak předpokládá výskyt metamyelocytů, myelocytů a promyelocytů. V tomto případě je nutné vyhodnotit diferenciální rozpočet leukocytů mikroskopicky.



Obr. 2 Schéma posunu doleva

Pokud je u dospělého člověka zjištěna lymfocytóza nad 50 %, je nutné porovnat výsledek s dřívějšími hodnotami pacienta. Je-li tato hodnota zjištěna poprvé, vyhodnocujeme diferenciální rozpočet leukocytů pomocí mikroskopu. Pokud se v 3D grafu populace lymfocytů prolíná do populace monocytů, může se jednat o variantní lymfocyty (přítomné u infekční mononukleózy), popřípadě o lymfoblasty (obr. 3). V tomto případě je nutné přepočítat diferenciální rozpočet leukocytů mikroskopicky.

V případě, že je procentuální zastoupení monocytů a eozinofilů vyšší než 20 %, a zastoupení bazofilů vyšší než 3,9 %, postupujeme stejně jako u lymfocytů - výsledek porovnáme s dřívějšími hodnotami pacienta, popřípadě přepočítáme mikroskopicky.

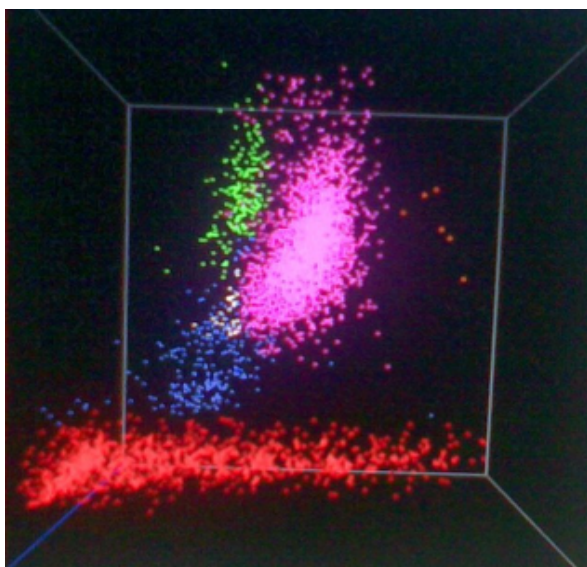


Obr. 3 Lymfocytóza

Analyzátor stanovuje i počty normoblastů (NRBC). Na 3D grafu je lze vidět v dolní části znázorněné červenou barvou (obr. 4). V případě, že jich stanoví více než 2 %, ověřujeme výsledek mikroskopicky. Při počtu normoblastů > 20 % při mikroskopickém počítání, musíme spočítat korekci leukocytů na normoblasty podle vzorce:

$$K = 100 \times \text{počet LEU} : (100 + \text{počet normoblastů})$$

Skutečná hodnota leukocytů po korekci se poté zapisuje do počítače.



Obr. 4 NRBC

3.3 Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů pomocí mikroskopu

Při pozorování krevního nátěru mikroskopem jsou v celkovém počtu 100 leukocytů tříděny a počítány bílé krvinky podle typu (zralé i nezralé buňky). Zároveň jsou během určování diferenciálu počítány i nezralé červené krvinky (normoblasty) a také je prohlížena morfologie všech buněk (např. zvláštní tvar buňky, anizocytóza, polychromázie, buněčná tělíska, zvláštnosti jader apod.). Dobře obarvený nátěr by měl mít růžově purpurovou barvu.

3.3.1 Zhotovení krevního nátěru a jeho obarvení

Na odmaštěné podložní sklíčko nanese dostatečně velkou kapku vzorku. Umístíme ji při okraji kratší hrany podložního sklíčka (asi 1/8 délky podložního sklíčka). Roztírací sklíčko posuneme směrem ke kapce vzorku, kratší hranu roztíracího sklíčka ponoříme do kapky a vzorek necháme rozlít po celé kratší hraně roztíracího sklíčka (úhel mezi podložním a roztíracím sklíčkem musí být 30 - 40°). Kapku poté roztáhneme směrem k druhému konci podložního sklíčka (maximálně do 3/4 délky). Při

přesunu vyvíjíme takový tlak, aby byl nátěr rovnoměrný a přiměřeně se ztenčoval.

Nátěr řádně usušíme na vzduchu při pokojové teplotě, označíme jménem pacienta a číslem vzorku a poté fixujeme metanolem po dobu 5 minut. Po vyjmutí z metanolu sklíčko s nátěrem ponoříme do roztoku May - Grünwald po dobu 1 sekundy a vyjmeme. Tento krok zopakujeme ještě 4 x (celkem tedy 5 x). Poté sklíčko ponoříme po dobu 1 sekundy do roztoku Giemsa - Romanovski a po vyjmutí tento krok zopakujeme ještě 10 x (celkem tedy 11 x). Po obarvení preparát omyjeme pod mírně tekoucí studenou vodou a usušíme.

Po zaschnutí nanese na preparát malou kapku imerzního oleje a prohlédneme pod mikroskopem při zvětšení 1000x pomocí imerzního objektivu (tzn. 100x). V případě jakýchkoliv pochybností o kvalitě techniky barvení preparátu během prohlížení mikroskopem je lepší zhotovit nový nátěr.

4. Výsledky

V období 12. 10. - 26. 10. 2009 bylo na OKH Nemocnice České Budějovice a.s. stanoveno 5002 krevních obrazů. Krevní obrazy vyhodnotil analyzátor Coulter LH 750, společnosti Beckman Coulter, založený na principu elektrické impedance (tab. 2).

Tab. 2 Výsledky stanovení krevních obrazů a diferenciálního rozpočtu leukocytů

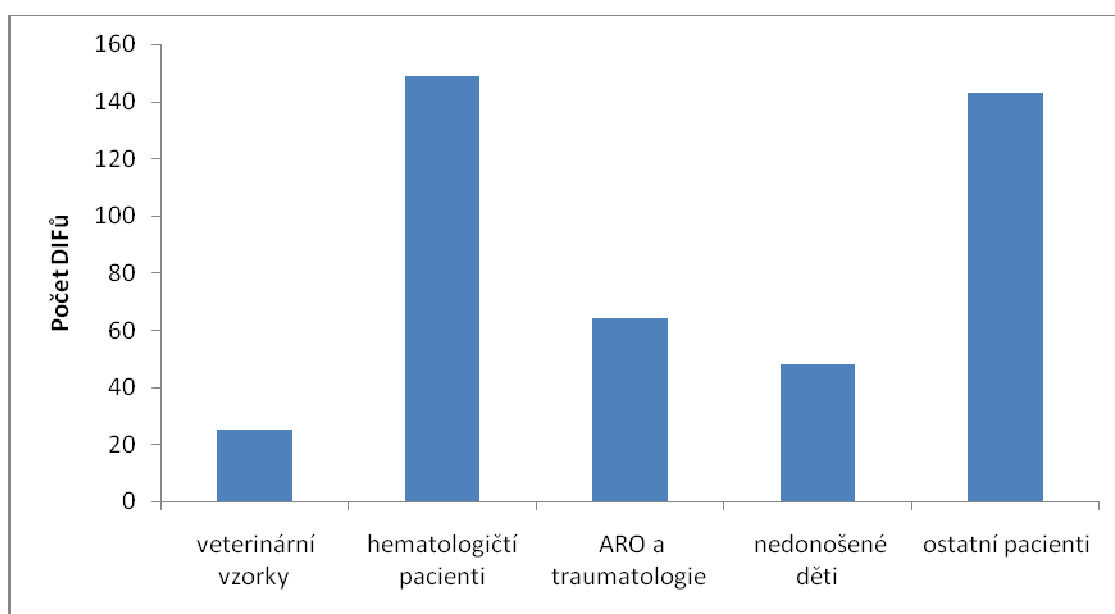
Typ vyšetření	Počet KO a DIFů
Celkový počet KO	5002
Počet mikroskopických DIFů z celkového počtu	460
Počet mikroskopických DIFů na požádání	21
Počet DIFů s ponechanou původní hodnotou	10

Z celkového počtu 5002 stanovených krevních obrazů se mikroskopicky přepočítávalo 460 vzorků. Toto zastoupení tvoří 9,2 % z celkového počtu krevních obrazů. Z počtu 460 mikroskopických DIFů jich bylo 21 provedeno na požádání přímo od ošetřujícího lékaře. Nejčastěji si ho takto vyžadují na oddělení Dětské hematologické jednotky, kdy chce mít lékař jistotu v přesném zastoupení fyziologických i patologických buněk dítěte.

U 10 vzorků z celkového počtu mikroskopických DIFů byla i po mikroskopickém přepočtu ponechaná původní hodnota stanovená analyzátozem. Podle 3D grafu (grafy popsané v Metodice) bylo patrné, že se ve vzorku vyskytují abnormální či nezralé buňky. Nicméně, po mikroskopickém přepočtu se počet buněk shodoval s původními hodnotami, popř. byly patrné jen zanedbatelné odchylky. V takových případech se do počítače nezapisuje mikroskopický výsledek, ale ponechávají se hodnoty stanovené analyzátozem.

Na oddělení Klinické hematologie se kromě materiálu pacientů zpracovávají i vzorky zasílané z veterinárních klinik. Takových vzorků bylo v období 12. 10. - 26. 10. 2009 zpracováno 25. U těchto vzorků se mikroskopický diferenciální rozpočet dělá pokaždé automaticky, z důvodu morfologických odlišností krvinek u zvířat (analyzátor je koncipován výhradně na lidské krvinky).

Dále jsem se zabývala skupinami pacientů, u nichž se mikroskopický diferenciální rozpočet leukocytů dělá nejčastěji. Dle níže uvedeného grafu (obr. 5) je jasně vidět, že nejčastěji se mikroskopicky přepočítávají vzorky hematoonkologických pacientů, zejména pacientů s diagnostikovanou leukémií. Časté jsou mikroskopické diferenciály také u pacientů z oddělení ARO či traumatologie, z důvodu větší náchylnosti k infekcím a k posunu k nezralým buňkám a také se často přepočítávají vzorky nedonošených dětí. Skupinou ostatní pacienti jsou myšleni pacienti z ostatních pracovišť Nemocnice České Budějovice a.s.



Obr. 5 Výsledky počtu DIFů

Přesné hodnoty provedených mikroskopických DIFů jsou uvedeny v tab. 3. Z procentuálního zastoupení je patrné, u kterých skupin pacientů se mikroskopický diferenciální rozpočet provádí nejčastěji. Vzorky z veterinárních klinik jsou zde zastoupeny ze 100 %, což je dáno nutností mikroskopického přepočtu, právě z důvodu morfologické odlišnosti buněk u zvířat. Počet provedených DIFů u hematologických pacientů činí 149. U výběru těchto pacientů jsem se řídila zasílajícím oddělením, které se zabývá hematologií (oddělení Klinické hematologie - ambulance, Dětská hematologická jednotka, Interna), ne podle diagnózy. Pacienti tudíž nemuseli mít chorobu spojenou s bílými krvinkami. Z oddělení ARO a traumatologie bylo přepočítáváno 10,5 % vzorků, což je dáno častým posunem doleva z důvodu zvýšené náchylnosti k infekcím. Z celkových 73 vzorků od nedonošených dětí se přepočítávalo celých 48 vzorků. Je to dáno hlavně tím, že v nezralé krvi nedonošence se často vyskytují normoblasty. Ve velké většině se jich v krvi vyskytuje více než 2. V takovém případě se o jejich hodnotě musíme přesvědčit mikroskopicky kvůli případné korekci leukocytů. Vzorky pacientů z ostatních pracovišť Nemocnice České Budějovice a.s. se přepočítávaly z pouhých 4,3 %.

Tab. 3 Výsledky mikroskopicky provedených DIFů

Typ vyšetření	Počet DIFů	Zastoupení v %
Počet stanovených DIFů u psů	25	100
Počet DIFů u hematologických pacientů	149	14,7
Počet DIFů u pacientů z oddělení ARO a traumatologie	64	10,5
Počet DIFů u nedonošených dětí	48	65,7
Počet DIFů u ostatních pacientů	143	4,3

4.1 Vyhodnocení NRBC

Analyzátor vyhodnocuje i hodnoty NRBC (orto chromní či polychromní normoblasty). Je to dáno tím, že přístroj počítá a vyhodnocuje všechny jaderné buňky. Podle zkušeností na oddělení Klinické hematologie byla jako varovná hodnota, upozorňující na výskyt NRBC, stanovena hodnota vyšší než 2 NRBC. Pokud tedy analyzátor vyhodnotí více než 2 NRBC, je nutné se o jejich hodnotě přesvědčit mikroskopicky. V případě, že je jich v nátěru více než 20 (pro pracoviště je tato hodnota klinicky významná) se provádí tzv. korekce leukocytů podle vzorce:

$$K = 100 \times \text{počet LEU} : (100 + \text{počet normoblastů})$$

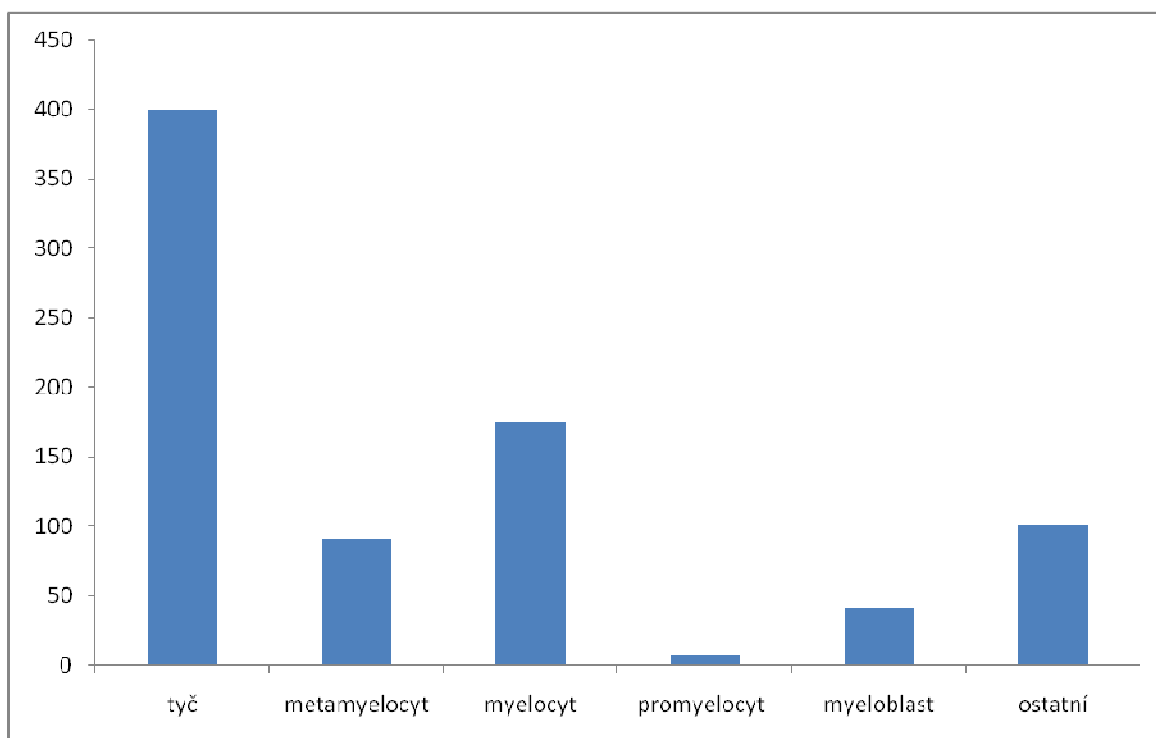
Skutečná hodnota leukocytů se po mikroskopickém přepočtu zapisuje do počítače. NRBC se u pacientů vyskytují při různých poruchách krvetvorby (např. při těžkých hemolytických anémiích). Nejčastěji se však vyskytují u nedonošených dětí (tab. 4).

Tab. 4 Výsledky počtů NRBC

NRBC	Počet NRBC
Celkový počet vzorků s NRBC	94
NRBC < 20	80
NRBC > 20	14
NRBC u nedonošenců	26

4.2 Vyhodnocení patologických buněk

Jak jsem již zmiňovala, analyzátor není schopen vyhodnotit patologické buňky. Nejčastěji se jedná o buňky myeloidní řady - neutrofilní tyče, metamyelocyty, myelocyty, promyelocyty a myeloblasty (obr. 6).



Obr. 6 Poměr patologických buněk mezi sebou

V krevních nátěrech se při různých chorobách však vyskytují i jiné, abnormální buňky. U některých pacientů (nejčastěji s diagnostikovanou infekční mononukleózou) často nalézáme plazmatické buňky, variantní či atypické lymfocyty, které se obtížně rozeznávají od monocytů. Přítomné mohou být i buňky zvané lymfomonocyty. Atypické či variantní lymfocyty se do výsledků nezapočítávají jako takové. V krevním nátěru se hodnotí jejich přítomnost, ne jejich počet. U některých pacientů byla zjištěna přítomnost několika abnormálních buněk najednou. Např. pacient s diagnostikovanou infekční mononukleózou měl v krevním nátěru plazmatické buňky, lymfomonocyty i variantní lymfocyty. U některých chorob nalézáme eozinofilní tyče či

eozinofilní myelocyty (tab. 6). Různé typy nezralých buněk rozeznáváme u leukémií. Např. u monoblastické leukémie můžeme v krvi pacienta nacházet až 80 % monoblastů, u lymfatických leukémií nacházíme lymfoblasty až z 90 %. Detekce těchto buněk vede ke stanovení diagnózy mnohých onemocnění, nejčastěji leukémií. Proto se při jakémkoliv podezření na výskyt těchto nezralých či abnormálních buněk musí udělat krevní nátěr a přečíst mikroskopicky.

Tab. 6 Výskyt ostatních abnormálních buněk

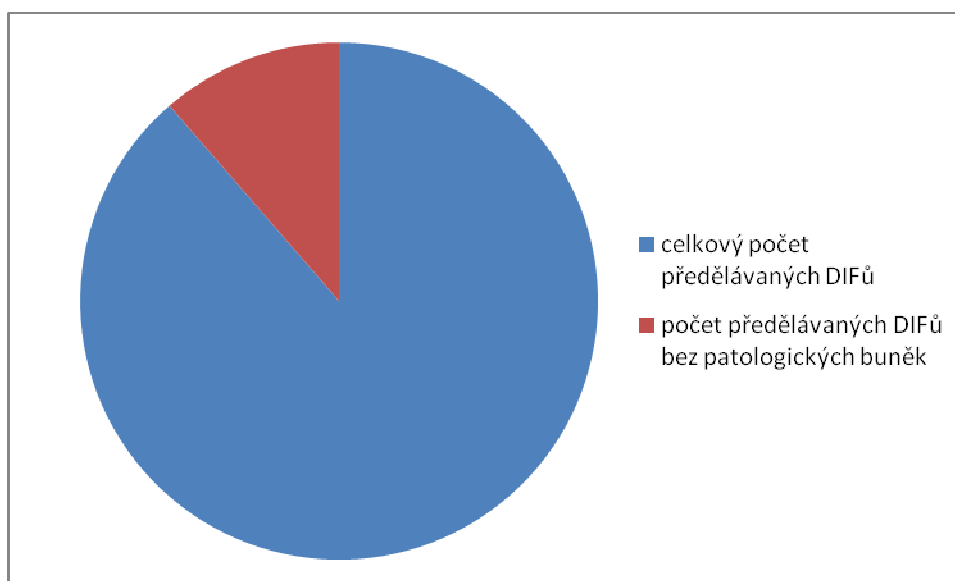
Typ buňky	Počet buněk	Počet pacientů
Plazmatické buňky	67	45
Lymfomonocyty	13	8
Eozinofilní tyče	5	3
Eozinofilní myelocyty	17	11
Atypické lymfocyty	přítomny	1
Variantní lymfocyty	přítomny	21

Nejčastěji se vyskytující nezralou buňkou v krvi pacientů je neutrofilní tyč. Z celkového počtu 460 mikroskopických DIFů se neutrofilní tyče vyskytovaly u 400 pacientů. Metamyelocyty se v nátěrech vyskytovaly poměrně méně - přítomny byly u 91 pacientů. Druhou, nejčastěji zastoupenou nezralou buňkou, byl pak myelocyt, přítomný u 175 pacientů. Nejméně zastoupenou nezralou buňkou byl promyelocyt, který byl přítomen u 8 pacientů (tab. 7).

Tab. 7 Průměrné hodnoty nezralých buněk myeloidní řady

Typ patologické buňky	Počet pacientů	Průměrný počet buněk
Neutrofilní tyč	400	7,721
Metamyelocyt	91	2,032
Myelocyt	175	5,006
Promyelocyt	8	1,5
Myeloblast	41	8,122

Z celkového počtu mikroskopicky předělávaných DIFů nebyla u 59 vzorků nalezena žádná patologie (obr. 7). Většinou se jednalo o přepočtení eozinofilů či monocytů, jejichž hodnota stanovená analyzátozem byla vyšší než 20 % nebo o přepočtení bazofilů, kde analyzátozem stanovil hodnotu vyšší než 3,9 %. Ve většině případů se pak přepočítané hodnoty téměř shodovaly s hodnotami naměřenými analyzátozem, ale vzhledem k nalezení třeba i jediné neutrofilní tyče, se zapisoval mikroskopický výsledek, neopouštěval se výsledek stanovený analyzátozem.



Obr. 7 Poměr počtu mikroskopicky předělávaných DIFů bez patologických buněk

4.3 Srovnání obou metod

Dodnes je referenční metodou stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů metoda manuální. Hematologické analyzátory se postupně vylepšují, dokáží vyhodnotit stále více a více parametrů a lze na nich stanovit stále větší počet vzorků za určitý časový interval. Dochází tak k velikému pokroku v oblasti moderní techniky, ale přesto zůstává významná část krevních obrazů, která se musí mikroskopicky předělávat. Podíl mikroskopicky provedených DIFů trvale klesá, ale vzhledem k tomu, že analyzátory zatím nejsou schopny určit nezralé či abnormální buňky, se u určitých skupin pacientů předělává diferenciál častěji. Z výsledků je zřejmé, u kterých skupin pacientů se mikroskopický diferenciální rozpočet leukocytů musí udělat pokaždé, a u kterých více či méně často. Pokaždé se DIF musí předělat u vzorků zvířat, protože analyzátor nemusí správně vyhodnotit jejich buňky z důvodu morfologické odlišnosti. Z těch více častých skupin pacientů jde hlavně o nedonošené děti z důvodu nevyzrálosti krve a častou přítomností normoblastů. Dále se jedná o hematologické pacienty. Zde je důvod jasný - u pacientů s leukémií či jinou chorobou krve (např. plazmocytom, myelodysplastický syndrom a mnoho dalších) předpokládáme výskyt abnormálních nebo nezralých buněk, které, jak už bylo řečeno, analyzátor není schopen vyhodnotit. U

pacientů z oddělení ARO a traumatologie je důvodem častěji předělávaných DIFů vyšší náchylnost k infekcím. Počet DIFů u pacientů z ostatních pracovišť nemocnice činil pouhých 4,3 %, což je známkou toho, že analyzátor je vysoce spolehlivý, v případě vyjmutí rizikových skupin.

5. Diskuze

Cílem této práce bylo blíže zmapovat a porovnat metody stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů a poukázat na hlavní rozdíly mezi manuálním a automatickým stanovením. Starší analyzátory poskytovaly pouze třípopulační diferenciál, rozlišující populaci krevních buněk s malým, středně velkým a velkým jádrem. Třípopulační diferenciál tedy v žádném případě nedokáže přesně odlišit lymfocyty, neutrofilů a tzv. střední populaci krevních buněk (bazofily, eozinofily, monocyty). Moderní analyzátory v dnešní době poskytují pětipopulační diferenciál, který rozlišuje v bílé řadě neutrofilů, eozinofily, bazofily, monocyty a lymfocyty. Nejsou ovšem schopny stanovit nesegmentované formy neutrofilů - tyče (Pecka 2006).

Stanovení na analyzátorech má i další určitá omezení, na která se musí během stanovení pamatovat. Vzorky mohou obsahovat složky nebo látky, které brání přesnému stanovení jednotlivých parametrů. Při vyšetření parametrů se vyskytuje těsná provázanost jedněch parametrů s jinými, může pak docházet k tomu, že nepřesné stanovení jedné složky může mít vliv na stanovení jiné složky. Poznat možné interference znamená vydávat správné výsledky, naopak nepoznané interference mohou mít negativní klinické výsledky. Rozlišujeme interference plazmatického a buněčného původu, které mohou ovlivnit jak absolutní počty krevních buněk, ale i diferenciální počet leukocytů. Mezi buněčné složky, které ovlivňují převážně počet a rozpočet leukocytů patří normoblasty, erytrocyty rezistentní na lýzu, velké trombocyty nebo bakteriální kontaminace (Pecka 2006). Chyby v měření však mohou být způsobeny i preanalytickou částí vyšetření (tzn. špatným odběrem krve, dlouhou časovou prodlevou od odběru vzorku po jeho zpracování, transport vzorku apod.). Správně by se měly odebrat 4 ml krve do zkumavky s antikoagulantem EDTA, promíchat a bez dalšího zpracování odeslat (Kessler 1992). Nedodržení správného postupu při transportu a skladování vzorků může také zásadně ovlivnit spolehlivost laboratorních výsledků, a to hlavně při stání biologického materiálu na světle a v teple (Čermáková a Štěpánová 2003). Stabilizovaná krev se při hematologických vyšetřeních zpracovává obvykle čerstvá, může se však uložit do chladničky při 2 až 4 °C. Hemoglobin a počet erytrocytů

se sice mohou vyšetřit i po 24 hodinách, bílé krvinky do 10 hodin, hematokrit do 2 hodin, počet trombocytů do 1 hodiny, ale odkládání čerstvých vzorků se provádí jen výjimečně a přidržuje se výsledkům z čerstvé krve. Zhotovování nátěrů z krve pro diferencování bílých krvinek se provádí do 3 hodin po odběru (Hrubíško a kol. 1981). Při jakémkoliv podezření na nepřesné měření přístroje (ať už na měření počtu leukocytů, erytrocytů, hematokritu, hemoglobinu, trombocytů i ostatních měřených parametrů) je na místě zvážit další postup. Chyba totiž nemusí být v přístroji, ale právě v analyzovaném vzorku. V případě, že je krev sražená nebo jiným způsobem poškozená, se musí zavolat na příslušné oddělení a nechat odebrat nový vzorek, protože analyzátor sraženou či jinak poškozenou krev nevyhodnotí.

Rizikovou skupinu při stanovení diferenciálního rozpočtu tvoří vzorky psů. K jejich přesnému stanovení je potřeba speciálních analyzátorů, zaměřených právě na buňky zvířat, protože se morfologicky odlišují od lidských. Takovým analyzátozem, zaměřeným speciálně pro veterinární praxi, je např. analyzátor LaserCyte založený na principu průtokové cytometrie. Tento analyzátor poskytuje úplnou hematologickou analýzu včetně 5 - populačního diferenciálního rozpočtu leukocytů. Ani tento přístroj však nedokáže stanovit DIF správně přibližně u 32 % vzorků (Papasouliotis et al. 2006). Na analyzátoru Coulter LH 750 je téměř zbytečné vyhodnocovat diferenciální rozpočet leukocytů u psů, protože ze 100 % se vzorky musí přepočítávat mikroskopicky.

Další skupinou rizikových pacientů jsou pacienti hematologičtí. Tito pacienti se dají rozdělit do 2 skupin: na pacienty s nezhoubným onemocněním, u kterých analyzátor ve velké většině případů nemá problém s rozlišením jednotlivých typů leukocytů a na pacienty se zhoubnými onemocněními (nejčastěji se jedná o leukémie), u kterých analyzátor selhává v podstatě vždy. Pro diagnostiku a léčbu akutních leukémií je však velmi důležité zjistit přesné zastoupení nezralých buněk. Přestože hematologických analyzátorů je již celá řada, není u nich vyvinuta dostatečná citlivost k detekci patologických buněk (Tohyama et al. 2005). Vzhledem k tomu, že jsem hematologické pacienty rozlišovala podle zasílajícího oddělení, ne podle diagnózy, jsem neměla příležitost u nich rozlišit zhoubné či nezhoubné onemocnění.

Vzorky pacientů z oddělení ARO a traumatologie byly v daném období diferencovány z 10,5 %. Těžce ranění pacienti jsou velmi náchylní k infekcím a k posunům k nezralým neutrofilům (Ogura et al. 1999, Ishikawa et al. 2000). Tvoří tedy jednu z rizikových skupin, u kterých je potřeba výsledky řádně kontrolovat.

U předčasně narozených dětí se často vyskytuje leukocytóza - mnohdy až $30 \cdot 10^9 / l$. Patogenetické sekvence vedoucí k leukocytóze u nedonošených dětí při nemaligních onemocněních nejsou ještě objasněny (Wirbelauer et al. 2008). Falešně vysoké počty leukocytů však mohou způsobovat jaderné červené krvinky - normoblasty (Dörner et al. 1995). Na oddělení Klinické hematologie bylo v období 12. 10. - 26. 10. 2009 stanoveno 48 mikroskopických DIFů u nedonošenců. Z tohoto počtu bylo celých 54,1 % přepočítáváno právě kvůli normoblastům. Přítomnost normoblastů v krvi nedonošenců se spojuje se stavem hypoxie (Vatansever et al. 2002).

Vzorky pacientů z ostatních pracovišť Nemocnice České Budějovice a. s. se mikroskopicky přepočítávaly z pouhých 4,3 %. Z toho lze usuzovat, že analyzátor je vysoce spolehlivý po vyjmutí pacientů z rizikových skupin.

6. Závěr

Cílem práce bylo porovnat a blíže zmapovat hlavní rozdíly mezi automatickým a mikroskopickým stanovením diferenciálního rozpočtu leukocytů podle výsledků zjištěných na oddělení Klinické hematologie Nemocnice České Budějovice a.s., využívající ke stanovení krevních obrazů hematologického analyzátoru Coulter LH 750. Dle naměřených dat a výsledků jsem potvrdila všechny 3 hypotézy. V období 12. 10. - 26. 10. 2009 bylo mikroskopicky přepočteno 9,2 % vzorků. Identifikovala jsem rizikové skupiny pacientů, u nichž se mikroskopický přepočet leukocytů provádí nejčastěji. Jedná se o vzorky psů, hematologické pacienty, pacienty z oddělení ARO a traumatologie a o nedonošené děti. Diferenciální rozpočet leukocytů u psů selhává při automatické analýze ze 100 %. Přístrojový diferenciál tedy nemá smysl u těchto vzorků analyzovat. Pravděpodobně nemá smysl na přístroji analyzovat diferenciál i u hematoonkologických pacientů z důvodu časté přítomnosti patologických buněk, ale vzhledem ke struktuře dat to nelze říci spolehlivě.

Na základě těchto výsledků byla navržena úprava algoritmu - nediferencovat na přístroji vzorky psů a hematoonkologických pacientů. Tato úprava algoritmu přinese nákladovou úsporu - krevní obraz bez diferenciálu stojí přibližně o 50 % méně a také podstatně urychlí samotnou práci. Nemusíme totiž čekat na přístrojový výsledek, vzorek se může po přijetí do laboratoře rovnou natřít na sklíčko, obarvit a přečíst. Tento navrhovaný algoritmus byl zčásti zaveden do praxe.

7. Seznam použitých zdrojů

- Adam, Z., Vorlíček, J. a kol. (2007): Hematologie pro praktické lékaře. Praha: Galén: 31.
- Agrawal, N., Toner, M., Irimia, D. (2008): Neutrophil migration assay from a drop of blood. Lab on a Chip 8: 2054-2061.
- Amouroux, I., Balay, M., Marfaing-Koka, A. (2003): Evaluation of the blood analyzer Beckman Coulter LH 750: analytic performance, decision rules. Annales de Biologie Clinique (Paris) 61: 576-584.
- Barnes, PW., McFadden, SL., Machin, SJ., Simson, E. (2005): The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. Laboratory Hematology 11: 83-90.
- Beuter, E. et al. (2001): Williams Hematology. New York: Mc Graw-Hill: 753-915
- Boudal, P. (2006): Nová řada hematologických analyzátorů Beckman Coulter LH 780 a LH 785. In Vitro Diagnostika 4: 6.
- Boudal, P. (2006): Nové možnosti v přístrojové analýze subpopulací leukocytů (WBC) a erytrocytů (RBC). In Vitro Diagnostika 4: 4.
- Boudal, P. (2005): Doplnky k LH 750 a LH 1500. In Vitro Diagnostika 1: 15.
- Buttarelo, M. (2004): Quality specification in haematology: the automated blood cell count. Clinica Chimica Acta 346: 45-54.
- Cascao, R., Rosário, HS., Fonseca, JE. (2009): Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. Acta Reumatologica Portuguesa 34: 313-326.

Čermáková, M., Štěpánová, I. (2003): Klinická biochemie – 1. díl. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně: 20.

Dörner, K., Schulze, S., Reinhardt, M., Seeger, H., Van Hove, L. (1995): Improved automated leukocyte counting and differential in newborns achieved by the haematology analyser CELL-DYN 3500. *Clinical and Laboratory Haematology* 1: 23-30.

Fernandes, B., Hamaguchi, Y. (2003): Performance characteristics of the Sysmex XT-2000i hematology analyzer. *Laboratory Hematology* 9: 189-197.

Fučíková, T. (1997): Klinická imunologie v praxi. Praha: Galén: 15.

Gawad, S., Schild, L., Renaud, PH. (2001): Micromachined impedance spectroscopy flow cytometric for cell analysis and particle sizing. *Lab on a Chip* 1: 76-82.

Gregora, E. a kol. (2001): Vnitřní lékařství, díl IIIb: Hematologie. Praha: Galén: 53.

Hrubíško, M. a kol. (1981): Hematologie a krevní transfúze I. Martin: Avicenum: 141.

Ishikawa, K., Tanaka, H., Nakamori, Y., Hosotsubo, H., Ogura, H., Nishino, M., Shimazu, T., Sugimoto, H. (2000): Difference in the responses after administration of granulocyte colony-stimulating factor in septic patients with relative neutropenia. *Journal of Trauma* 5: 814-824.

Janeway, CH., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2005): Immunobiology: the immune system in health and diseases. New York: Garland Science Publishing: 2

Johannessen, B., Roemer, B., Flatmoen, L., Just, T., Aarsand, AK., Scott, CS. (2006): Implementation of monoclonal antibody fluorescence on the Abbott CELL-DYN Sapphire hematology analyzer: evaluation of lymphoid, myeloid and platelet markers. *Clinical and Laboratory Haematology* 28: 84-96.

Kessler, S. (1992): *Memorix, Laboratorní diagnostika*. Weinheim: Scientia Medica: 122.

Klener, P. a kol. (2001): *Vnitřní lékařství II*. Praha: Informatorium: 116-117.

Kružík, P., Moos, J., Vlček, R. (2006): *Analyzátoř buněk a částic*. In *Vitro Diagnostika* 3: 4.

Lexová, S. a kol. (2000): *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně: 87-90.

Mayer, J., Starý, J. a kol. (2002): *Leukemie*. Praha: Grada: 38.

Melo, RC., Dvorak, AM., Weller, PF. (2008): Electron tomography and imunonogold electron microscopy for investigating intracellular and secretion in human eosinophils. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12: 1416-1419.

Miguel, A., Orero, M., Simon, R., Collado, R., Perez, PL., Palios, A., Iglesias, R., Martinez, A., Corbonell, F. (2007): Automated neutrophil morphology and its utility in the assessment of neutrophil dysplasia. *Laboratory Hematology* 13: 98-102.

Mourek, J. (2005): *Fyziologie*. Praha: Grada Publishing: 26.

Mukai, K., Obata, K., Tsujimura, Y., Karasuyama, H. (2009): The roles for basophil in allergy. *Nippon Rinsho* 67: 2095-2099.

Nakul-Aquaronne, D., Sudaka-Sammarcelli, I., Ferrero-Vacher, C., Starck, B., Bayle, J. (2003): Evaluation of the Sysmex Xe-2100 hematology analyzer in hospital use. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 17: 113-123.

Ogura, H., Tanaka, H., Koh, T., Hashiguchi, N., Kuwagata, Y., Hosotsubo, H., Shimazu, T., Sugimoto, H. (1999): Priming, second-hit priming, and apoptosis in leukocytes from trauma patients. *Journal of Trauma* 5: 774-781.

Papasouliotis, K., Cue, S., Crawford, E., Pinches, M., Dumont, M., Burley, K. (2006): Comparison of white blood cell differential percentages determined by the in-house LaserCyte hematology analyzer and a manual method. *Veterinary Clinical Pathology* 3: 295-302.

Pecka, M. (2006): *Laboratorní hematologie v přehledu II: fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín: FINIDR: 137-148.

Penka, M. a kol. (2001): *Hematologie I. Neonkologická hematologie*. Praha: Grada Publishing: 191.

Pierre, RV. (2002): Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. *Clinical Laboratory Medicine* 22: 279-297.

Raap, V., Wardlaw, AJ. (2008): A new paradigm of eosinophil granulocytes: neuroimmune interactions. *Experimental Dermatology* 17: 731-738.

Racek, J. a kol. (2006): *Klinická biochemie*. Praha: Galén: 303-304.

Rappaport, ES., Helbert, B., Beissner, RS., Trowbridge, A. (1988): Automated hematology: where we stand. *Southern Medical Journal* 81: 365-370.

Rokyta, R. a kol. (2008): *Fyziologie*. Praha: ISV nakladatelství: 66.

Šigutová, P. (2006): Příklady hodnocení diferenciálních rozpočtů leukocytů na Coulter LH 750. *In Vitro Diagnostika* 4: 10.

Tohyama, K., Shiga, S., Itose, Y., Uchihaski, K., Ohkura, M., Takahashi, K., Itoh, M., Ichiyama, S., Hamaguchi, Y. (2005): Improved detection of minimal acute myeloid leukemia cells by the use of the combined parameters of XE-2100 hematology analyzer. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 1: 18-24.

Vatansever, V., Acunas, B., Demir, M., Karasalihoglu, S., Ekuklu, G., Ener, S., Pala, O. (2002): Nucleated red blood cell counts and erythropoietin levels in high-risk neonates. *Pediatrics International* 6: 590-595.

Wirbelauer, J., Thomas, W., Siau, R., Speer, CP. (2008): Leukemoid reaction in extremely immature preterm infants. *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie* 5: 165-169.

8. Klíčová slova

Diferenciální rozpočet leukocytů

Elektrická impedance

Hematologické analyzátory

Krevní obraz

Leukocyty

Optické metody

Pappenheimovo barvení

Key words

Blood picture

Differential count of leukocytes

Electrical impedance

Hematology analyzers

Leukocytes

Optical methods

Pappenheim staining