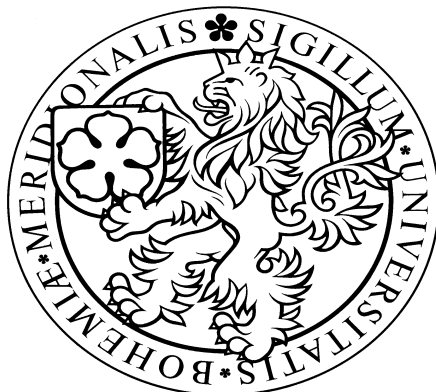


**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**



**PROBLEMATIKA VYŠETŘENÍ POČTU TROMBOCYTŮ SE  
ZAMĚŘENÍM NA AUTOMATICKÝ POČET KREVNÍHO  
ANALYZÁTORU**

*Bakalářská práce 2008*

**Autor:** Pavel Levák

**Vedoucí práce:** MUDr. Ivan Vonke

České Budějovice, 2008

Levák, P., 2008: Problematika vyšetření počtu trombocytů se zaměřením na automatický počet krevního analyzátoru. [Platelet counting with a view to an automatic count of hematology analyzer. Bc. Thesis, in Czech] - 44 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:** Early methods to enumerate platelets were inaccurate and irreproducible. To overcome these problems a number of methods for platelet counting has been designed. The aim of this thesis is to present some of them and refer to their advantages and disadvantages in clinical practice.

The practical part of this thesis focuses on comparison manual phase microscopy and haematology analyzer results on the basis of collected data. This work also highlights the effect of the applied anticoagulant (EDTA, citrate) on the final platelet count. This fact can help to reveal the pseudothrombocytopenia with an incidence of 0,1 % in general population.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 1. 4. 2008

.....

Podpis studenta

*„Dobrá metoda přispívá k rozkvětu poznání a předchází nesčetným chybám, jichž se mohou vědci při hledání pravdy dopustit.“*

**Claude Bernard (1813-1878)**

**Poděkování:**

Velice rád bych tímto způsobem upřímně poděkoval především svému školiteli, MUDr. Ivanu Vonkemu, a poté celému oddělení Klinické hematologie Nemocnice České Budějovice za jejich odborné vedení, spolupráci a hlavně ochotu podílet se na této práci.

## Obsah

1 Úvod do tématu.....	5
2 Fyziologie trombocytů a jejich funkce.....	7
3 Krevní obraz a trombocyty .....	8
3.1 Další parametry automatizovaného stanovení destičkového počtu .....	10
4 Kontrola kvality měření krevních obrazů hematologických analyzátorů .....	11
4.1 Společnost SEKK .....	13
5 Metody stanovení destičkového počtu .....	13
5.1 Přímá metoda stanovení počtu krevních destiček.....	14
5.2 Nepřímá metoda stanovení počtu krevních destiček .....	15
5.3 Poloautomatizované metody .....	15
5.3.1 Coulter particle counters – přístroje stanovující počet buněk .....	15
5.4 Plně automatizované metody .....	16
6 Metoda elektrické impedance .....	18
7 Optické stanovení destiček.....	21
8 Imunologická metoda .....	23
9 Metodika .....	24
9.1 Odběr krve a její zpracování .....	24
9.2 Vyšetření krevního obrazu .....	25
9.3 Stanovení počtu krevních destiček .....	25
9.3.1 Vliv antikoagulantu na výsledek hematologického analyzátoru, EDTA syndrom a pseudotrombocytopenie .....	26
10 Výsledky .....	27
10.1 Vyhodnocení krevních obrazů.....	27
10.2 Výsledky vlivu antikoagulantu na výsledek hematologického analyzátoru, EDTA syndrom a pseudotrombocytopenie.....	29
10.3 Reprodukovatelnost analytického měření hematologickým analyzátozem .....	29
10.4 Stanovení destičkového počtu hematologickým analyzátozem bez použití antikoagulačního činidla .....	31
10.5 Srovnání manuálního a automatického stanovení počtu krevních destiček.....	32
11 Diskuze.....	35
12 Závěr.....	38
13 Seznam citované literatury.....	39
14 Internetové zdroje.....	40
15 Příloha .....	41

## **1 Úvod do tématu**

Stanovení počtu krevních destiček je především v klinické praxi velice podstatné, neboť jakékoliv změny počtu či defekty ve stavbě a funkci těchto krevních elementů mohou vést ke krvácení, které může skončit v těžkých případech dokonce i smrtí pacienta.

V dnešní době se využívají především čtyři hlavní analytické metody stanovení počtu trombocytů: manuální zjištění pomocí mikroskopu, metoda elektrické impedance, optická metoda (včetně fluorescenční metody) a imunometoda. Každá z těchto metod má své klady, ale i zápory, které nastíním v průběhu své práce. Tyto metody jsou využívány v různé míře nejrozličnějšími pracovišti a to především podle toho, co je pro jejich práci stěžejní. Nicméně je logické, že v dnešní době spolu s rozvojem vědy a techniky pronikají do laboratoří nové a nové přístroje - analyzátoři, které dokáží laborantovi nejen usnadnit práci, nýbrž jsou i přesnější, objektivnější a především optimalizují práci v laboratoři. Tento vývoj byl dlouhý a složitý, na jehož počátku bylo metodou číslo jedna právě manuální počítání pomocí mikroskopu vybaveného fázovým kontrastem. Postup této metody byl a dodnes je velice časově náročný, únavný a výsledek je především ovlivněn schopnostmi a zkušenostmi laboranta. Metoda tedy není natolik spolehlivá, jak by se čekalo. Přesto má své nenahraditelné místo a právem je ve světě považována za „zlatý standard“. Tyto počáteční postupy počítání krevních destiček byly tedy nejen nepřesné, ale i nereprodukovatelné až do pol. 20. stol. V nadcházejících letech však došlo k novým objevům, které přispěly k obecnému zlepšení, které tedy spočívalo především v přesnosti a spolehlivosti (např. 1953 Brecher, Schneiderman & Cronkite: rozvoj metody fázového kontrastu, 1953 Coulter: Coulterův princip - znamenal obrovský skok na poli kvantifikace krevních elementů, krevní destičky přidány ve 70. letech 20. stol.).

U prvních analyzátorů založených na principu impedance se ke zjišťování počtu krevních destiček používaly jejich purifikované preparáty nebo PRP (plasma bohatá na trombocyty, z ang. platelet rich plasma). Přesto byl tento postup náchylný k chybám (Briggs et al., 2007). Dnes je již možno stanovovat krevní destičky z celé krve a to s vysokou přesností. U již zmiňované metody využívající fázového kontrastu se výsledky pohybují na vysokém stupni nepřesnosti s variačním koeficientem (z ang.

coefficient of variation) v rozmezí 10-25 % (Harrison et al., 2000). Dnešní analyzátory se mohou pyšnit daleko působivější hodnotou  $CV < 3 \%$  (Bentley, Johnson & Bishop, 1993). Nenechme se však zmást touto nízkou hodnotou, neboť i dnešní analyzátory pracující na principu impedance mají řadu limitů a omezení.

Existuje tedy stále mnoho překážek, které musí být překonány k tomu, aby proces stanovení destičkového počtu byl vždy přesný a spolehlivý. Avšak díky neustálému vývoji nových přístrojů s novými technologiemi jsou vyhlídky na splnění těchto cílů velice příznivé.

Cílem této práce je poskytnout ucelený pohled na vývoj procesu stanovení destičkového počtu od prostého manuálního měření mikroskopem po dnešní moderní měření analyzátory, vysvětlit základní principy měření jednotlivých metod a zhodnotit jejich klady a zápory. V praktické části se zaměřím na samotné měření destičkového počtu prováděné na oddělení Klinické hematologie (OKH) Nemocnice České Budějovice. Na základě naměřených dat bych rád porovnal výsledky počtů destiček stanovených manuálně mikroskopem s výsledky hematologického analyzátoru. Rovněž se budu zabývat přesností těchto metod a vlivem použitého antikoagulantu na výsledek hematologického analyzátoru a to především u vzorků pod hranicí  $100 \cdot 10^9/l$  s cílem odhalit falešně snížený počet tzv. pseudotrombocytopenie.

## **2 Fyziologie trombocytů a jejich funkce**

Trombocyty jsou bezjaderné buňky fyziologicky přítomné v krvi. Nemají tedy jádro, a proto se nemohou samy dělit. Vznikají v kostní dřeni fragmentací cytoplasmy obrovských buněk megakaryocytů (polyploidní buňky s 8-32 jádry), které vznikají z prekursorové buňky megakaryoblastu. Tento explozivní rozpad trvá asi 3-12 hodin. Jejich životnost se pohybuje v rozmezí 8-14 dní, poté jsou degradovány ve slezině. Tento orgán hraje velice významnou roli. Je v něm totiž retinována asi 1/3 všech trombocytů (zbylé 2/3 v krevní cirkulaci). Za patologických stavů může však hodnota trombocytů v tomto orgánu stoupnout až na 90 %. Je nutné si tedy uvědomit, že mezi oběma kompartmenty (krev, slezina) dochází k neustálé výměně těchto buněk.

Za normálních podmínek má krevní destička diskoidní tvar. Její velikost činí přibližně 2-4  $\mu\text{m}$  v průměru. Po kontaktu s cizím povrchem (např. stěna cévy) však vznikají dendritické formy, které se vyznačují přítomností protoplasmatických výběžků (velikost až 20  $\mu\text{m}$ ). Jsou plně reverzibilní. Počet trombocytů v periferní cirkulaci je asi  $150-400 \cdot 10^9/\text{l}$ . Při poklesu pod určitou úroveň začnou ledviny produkovat hormon thrombopoetin (TPO), který stimuluje tvorbu dalších destiček.

Struktura trombocytu se skládá ze zevního pláště, hyaloplasmy a organel. Zevní plášť je složen z komplexů glykoproteinů a mukopolysacharidů. Na jeho povrchu se často nachází membrána tzv. glykokalyx. Hyaloplasma zodpovídá za tvar trombocytu a jeho případné změny prostřednictvím systému vláken (mikrofibrily, mikrofilamenta a mikrotubuly). Mezi organely trombocytů patří mitochondrie, Golgiho aparát a především četná granula. Ty se pak dále dělí na několik skupin podle svého obsahu. Mezi hlavní skupiny se řadí  $\alpha$ -granula (obsahují např. fibrinogen, destičkový faktor 4 a řadu jiných chemotaktických, destičkových a koagulačních faktorů),  $\delta$ -granula (ATP, ADP, Ca, serotonin a další) a  $\gamma$ -granula (lysozomální enzymy).

Funkce trombocytů spočívá v udržování integrity cévní stěny. Zajišťují tedy reparace defektů endotelu, který má za normálních podmínek negativní náboj, aby mohl odpuzovat krevní buňky a ty se tak nemohly shlukovat na jeho povrchu. Další funkcí trombocytů je hemostáza, tedy zástava krvácení. Jedná se o velice komplikovaný, kaskádovitý proces, kdy sebemenší deficit či porucha jednoho z mnoha faktorů má negativní a tedy i fatální vliv na celý proces hemostázy. Trombocyty se účastní také řady obranných dějů a to především při hojení ran,

alergických a imunitních reakcích. Významnou vlastností trombocytů je jejich schopnost fagocytózy (hlavně některých virů).

Laboratorní diagnostika trombocytárních poruch zahrnuje řadu kritérií a zaměřuje se především na počet trombocytů, jejich velikost, tvar, tvorbu v kostní dřeni, imunologická vyšetření a funkci trombocytů. Ta se dále dělí podle toho zda vyšetření probíhá in vivo (např. testy krvácivosti - Duke, Ivy) či in vitro (např. testy adheze, agregace, retrakce koagula či sekrece ze zásobních granul).

### 3 Krevní obraz a trombocyty

Je známo, že krev se skládá z krevních elementů. Krevní obraz definuje nejen jejich počet, nýbrž i jejich povahu. Jedná se tedy o základní vyšetření, které určuje všeobecný obraz o pacientovi. Toto dnes již běžné vyšetření bylo poprvé zavedeno v roce 1904 německým lékařem Josefem Arnetem.

Pokud mluvíme o krevním obrazu ve spojení s trombocyty, tak primárně je sledován počet těchto elementů v krvi. Referenční interval hodnoty počtu trombocytů se pohybuje v rozmezí 150-400.10<sup>9</sup>/l (některé prameny uvádějí horní hranici i 350 či 450.10<sup>9</sup>/l). Výsledky, které se pohybují nad a pod touto hranicí jsou považovány za „patologické stavy“ a je nutné brát v úvahu možné příčiny, které k tomuto stavu vedly. Pokud jsou vyloučena všechna možná pochybení a to především při odebrání a zpracování vzorku, tedy chyby v preanalytické fázi vyšetření, a chyby způsobené při analýze (pochybení laboranta či chyby krevního analyzátoru), musí lékař zjistit, co tento stav sníženého či zvýšeného počtu způsobilo. To tedy znamená stanovit diagnózu a začít s léčbou, neboť trombocyty jsou stejně jako ostatní krevní elementy životně důležité.

**Tab. 1** Fyziologické a varovné hodnoty některých destičkových parametrů

Parametr trombocytů	Zkratka parametru	Jednotka	Fyziologické hodnoty	Varovné hod. ↓	Varovné hod. ↑
Počet trombocytů	PLT	× 10 <sup>9</sup> /l	150-450	50	800
Střed. objem trombocytů	MPV	fl	7,8-11	-	20
Hematokrit trombocytů	PCT	-	0,19-0,36	-	0,8
Distrib. šíře trombocytů	PDW	%	15,5-17,1	10	20



Nejčastějším patologickým stavem při stanovení počtu trombocytů je jejich snížený počet (pod  $135 \cdot 10^9/l$ )<sup>1</sup> čili pokles pod normu. Tomuto stavu se říká trombocytopenie. Klinickým obrazem bývá především tendence ke krvácení, v těžkých případech i spontánní krvácení do kůže a sliznic. Většinou se projevuje při poklesu počtu trombocytů pod  $30\text{--}50 \cdot 10^9/l$ . Riziko vážných až život ohrožujících krvácení vzniká obvykle při poklesu počtu pod  $10 \cdot 10^9/l$ . Mezi hlavní příčiny sníženého počtu trombocytů patří jejich snížená tvorba, zvýšená destrukce či zvýšená sekvestrace. Podle těchto příčin se trombocytopenie dále dělí (primární a sekundární trombocytopenie).

Opačným případem je zvýšený destičkový počet, tedy nad horní hranici  $450 \cdot 10^9/l$ . Tento zvýšený počet je označován jako trombocytóza či trombocytémie. To podle toho, zda se jedná o sekundární zvýšení počtu trombocytů (reakce na zánětlivé onemocnění, splenektomii, nádory či krvácení) nebo v druhém případě o trvalé zvýšení tohoto počtu (MPO, CML, polycytémie, esenciální trombocytémie)<sup>2</sup>. I tento stav je velice nebezpečný. Mnohdy se hodnota trombocytů pohybuje při závažných onemocněních i nad  $1000 \cdot 10^9/l$ . Při vysoké koncentraci krevních destiček se zvyšuje nebezpečí vzniku krevních sraženin v cévním řečišti, které může vyústit v tromboembolismus, krvácení, mozkové a koronární příhody. Trombotické problémy jsou pochopitelně častější a závažnější než ty krvácivé. Zajímavostí je jistě skutečnost, že velká část pacientů je při zachycení trombocytémie asymptomatická (Penka et al., 2005).

Avšak ne všechny výkyvy počtu trombocytů z referenčního rozmezí jsou patologické. Již byly zmíněny faktory preanalytické fáze vyšetření (osoba pacienta, způsob odběru vzorku, zacházení se vzorkem při transportu atd.) a analytické fáze. U té je potřeba ještě zdůraznit možné ovlivnění výsledku vlastnostmi použité metody (přesnost, správnost) a její vliv na výsledek z hlediska klinického. Je totiž nutné mít na vědomí existenci tzv. falešné positivity a falešné negativity v populaci vyšetřovaných pacientů (Racek et al., 2006).

Samozřejmě musí lékař při hodnocení zjištěného počtu trombocytů vzít v úvahu i ostatní aspekty, které mnohdy způsobí změny počtu (tedy mimo referenční rozmezí)

---

<sup>1</sup> Hodnota dolní i horní hranice počtu krevních destiček je rozdílná u různých klinických laboratořích, proto uvádím hodnotu platnou na OKH Nemocnice České Budějovice.

<sup>2</sup> Příčiny primární trombocytémie jsou poměrně diskutabilní (např. CML, tedy chronická myeloidní leukémie, je často řazena spíše mezi sekundární trombocytémie).

a nemusí přitom znamenat závažnou poruchu (rozdíl počtu u dětí a dospělých, nedávno prodělané krvácení po úrazu, požívání některých léků, těhotenství atd.).

Posuzování výsledků krevního obrazu je skutečná věda, kdy odborníci nesmí opomenout jedinou maličkost, která by mohla ovlivnit výsledek. Pokud by se tak stalo, mohlo by to mít vážné následky na pacientovi. Dnes sice většina krevních analyzátorů upozorní laboranta na hodnoty ležící mimo nastavené referenční rozmezí, ale veškerá zodpovědnost zůstává na lékařích, kteří musí každý patologický krevní obraz vyhodnotit, stanovit diagnózu a samozřejmě započít léčbu pacienta.

### **3.1 Další parametry automatizovaného stanovení destičkového počtu**

Mezi tyto parametry řadíme MPV, PCT, PDW a další (např. P-LCR). Na jejich správném stanovení se podílí nejen samotný přístroj, ale také použité reagenty či doba mezi odběrem a stanovením. Je tedy více než nutné dodržovat stanovená pravidla, aby měřené parametry byly spolehlivé a vliv chemikálií a času na výsledek byl tak minimální.

MPV je parametr, který znamená střední objem trombocytu (z ang. mean platelet volume). Hodnota je odvozena z poměru PCT (z ang. platelet-crit) ku počtu destiček (Briggs et al., 2007). Udává se ve femtolitrech a pohybuje se v rozmezí 7,8-11,5 fl. Téměř všechny dnešní analyzátory oznamují MPV a některé i PDW (z ang. platelet size distribution), což je distribuční šíře trombocytů (v %). Jedná se v podstatě o rozptyl destiček dle jejich objemu. Hodnoty se pohybují v rozmezí 15,5-17,1 % (Hochová, 2008). Dalším destičkovým parametrem je P-LCR (z ang. platelet large cell ratio). Je to počet destiček nad hranicí 12-ti fl k celkovému počtu destiček.

Význam v zachování standardních podmínek a samotného významu těchto měřených hodnot dokládají studie mnoha vědců:

- Hodnota parametru MPV se zvyšuje v přítomnosti EDTA o 7,9 % za 30 min., v průměru tedy o 13,4 % během 24 hod, největší nárůst probíhá v prvních 6 hodinách a to o 11,2 % (Bowles et al., 2005).
- Při měření MPV optickou metodou hodnota MPV klesá (vlivem zředění cytoplasmatického obsahu) spolu s následným zmenšením optických rozptylových vlastností. Při použití metody elektrické impedance naopak hodnota MPV roste s časem (Patterson, 1997).

- V klinické praxi může zvýšená hodnota MPV znamenat nebezpečí akutního infarktu myokardu (Martin et al., 1991).
- Zatímco snížené hodnoty MPV byly nalezeny u trombocytopenických pacientů s poruchou kostní dřeně. Zvýšené hodnoty MPV toto riziko snižují (Bowles et al., 2005).

Z těchto a mnoha dalších poznatků je tedy více než jasné, že tyto parametry a jejich hodnoty nepředstavují jen čísla, nýbrž mají v sobě velmi důležité informace, které mohou mnohdy odhalit závažnou chorobu.

#### **4 Kontrola kvality měření krevních obrazů hematologických analyzátorů**

Každá laboratoř si musí vypracovat svůj kontrolní systém, který kontroluje nejen samotnou činnost analyzátorů, ale i vlastní metody laboratorního stanovení (interní a externí kontrola kvality). To je tedy základní prioritou, ze které vyplývá propojení preanalytické, analytické i postanalytické fáze vyšetření. Moderní analyzátory jsou velmi precizní přístroje, od kterých jsou pochopitelně očekávány správné a přesné výsledky. Jen tak je možno na základě správných výsledků bezpečně stanovit diagnózu pacienta. Je tedy více než nutné, aby byly neustále prováděny potřebné kontroly správné funkce. To může zajistit pouze systematická kontrola kvality na pracovišti (Bourková et al., 2004).

Programy kontroly kvality klinických laboratoří se řídí obecnými pravidly. Nicméně nelze aplikovat proces řízení kvality jedné laboratoře na podmínky laboratoře druhé. Jednotlivé laboratoře se v mnohém liší (vybavení laboratoře, chod práce, množství zaměstnanců atd.), a proto i program kontroly kvality podléhá změnám.

Četné kontrolní procesy zajišťují pro měřené parametry vlastnosti jako správnost, přesnost, specifčnost a porovnatelnost. Zároveň porovnávají jednotlivé metody měření, měřicí přístroje a tedy i samotné laboratoře.

Existují dva základní typy kontroly kvality:

- Vnitřní kontrola kvality (Internal Quality Control - IQC)
  - je soubor postupů prováděných personálem laboratoře (tzn. pracoviště si samo zajišťuje kontrolu), které zahrnují veškerá stadia laboratorní práce

(preanalytickou, analytickou i postanalytickou fází) (Bourková et al., 2004)

- základní metodou je obvykle každodenní měření kontrolního vzorku s předem známou (vztažnou) hodnotou, doplňkovými metodami mohou být testy reprodukovatelnosti či porovnatelnosti výsledků
- Externí kontrola kvality (External Quality Assurance - EQA)
  - je systém objektivního hodnocení, tzv. typ mezilaboratorní kontroly
  - provádí nezávislá organizace a to pravidelným porovnáváním výsledků měření hodnocených klinických laboratoří a klinických jednotek navzájem a porovnáním s referenčními hodnotami měření (Bourková et al., 2004)
  - externí kontroly fungují v mnoha zemích po celém světě a většinou pracují na stejném principu - jednou takovou externí kontrolní službou je například britská The UK NEQAS (z ang. The United Kingdom National External Quality Assessment Service)

Každá laboratoř si stanovuje vnitřní referenční rozmezí pro každý typ měřených buněk, včetně destiček. Kontroly jednotlivých procesů jsou obvykle prováděny pravidelně a to v určitých časových intervalech. Tento časový horizont jednotlivých kontrol je různý a individuální pro každou laboratoř, která si ho stanovuje. Zatímco validace přístroje se obvykle provádí 1-2× v roce servisním technikem, kontrola pozadí se provádí denně (i vícekrát) samotným laborantem a to obvykle při zapnutí analyzátoru. O všech provedených kontrolách se vedou záznamy (validační protokol, provozní deník).

Samotná externí kontrola spočívá v používání standardních kontrolních materiálů (např. stabilizovaná lidská krev), které jsou dodávány externími organizacemi v podobě pravidelných dodávek. Tento materiál je certifikovaný. Klinické pracoviště tento materiál stanoví běžným způsobem jako vzorek pacienta. Naměřené hodnoty jsou následně zapsány do speciálního formuláře a ten je odeslán zpět do sídla dané externí kontrolní služby. Ta opačným směrem zašle vypracované statistické hodnocení se všemi náležitostmi, které k tomu patří (Matýšková et al., 2005). Kontrolním materiálem může být také čerstvě odebraný biologický materiál. Ten je však vhodný jen pro vnitřní kontrolu kvality (nemá totiž dostatečnou trvanlivost). Samotné kontroly jsou navíc k dispozici pro různé hladiny krevních buněk.

U nás v České Republice zajišťuje většinu externí kontroly kvality společnost SEKK s.r.o.

## 4.1 Společnost SEKK

Společnost SEKK byla založena v roce 1995. Práce této společnosti spočívá v poskytování služeb klinickým laboratorům. Mezi tyto služby patří především oblast externí kontroly kvality (EQA), oblast správné laboratorní práce (SLP) a oblast vzdělávání v laboratorní medicíně (EDU). Tyto služby jsou poskytovány nejen pracovištím u nás, ale i v zahraničí.

Dnes se společnost SEKK<sup>3</sup> skládá ze tří hlavních částí:

### ➤ Divize EQA

Primárním úkolem je zajištění systému externího hodnocení kvality (EQA) pro klinické laboratoře. Využívá spolupráce s jinými pracovišti i referenčními laboratořemi. Hlavním cílem je dosáhnout maximální odborné úrovně poskytovaných informací a služeb všem účastníkům zapojeným do systému EQA.

### ➤ Divize SLP

Úkolem divize je poskytování služeb souvisejících se zajištěním SLP v klinických laboratořích. Především se soustřeďuje na vývoj programových pomůcek, vzorových metodik a datových standardů.

### ➤ Divize EDU

Tato divize byla založena celkem nedávno v r. 2006 (reakce na rostoucí požadavky vzdělávání pracovníků). Divize EDU má za úkol pořádat výukové, vzdělávací a odborně propagační akce formou přednášek, seminářů, konferencí a kurzů. Zabývají se i výrobou tiskových či elektronických dokumentů, výukových pomůcek a dalších materiálů. Divize EDU spolupracuje s vědeckou radou SEKK, s odbornými společnostmi ČLS JEP a s vysokými školami, zejména s pracovníky lékařských fakult a fakultních nemocnic.

## 5 Metody stanovení destičkového počtu

Profesor anatomie Max Schultze byl první, kdo upozornil na přítomnost těchto částic v krvi (1865). O několik let později (1882) italský patolog G. Bizzozero nazval tyto částice krevní destičky a zároveň popsal jejich funkci (Brewer, 2006).

Dnes se o této důležité složce krve ví mnohem více (viz kapitola 2). Za všechny

---

<sup>3</sup> Informace o společnosti SEKK s r.o. pochází z internetových stránek společnosti [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz).

tyto nabyté informace patří vděk řadě vědcům, lékařům, laborantům a dalším pracovníkům, kteří díky svým objevům a výzkumům umožnili vůbec pochopit důležitost těchto částic.

Postupem času se však ukázalo, že nutná kvantifikace krevních destiček je mnohem složitější než například kvantifikace červených či bílých krvinek. I přes tento smutný fakt, se díky pokrokům ve vědě a technice laboratorních přístrojů, přišlo na čtyři základní způsoby, jak tedy celkový počet krevních destiček v krvi zjistit:

- 1) Přímá metoda (mikroskopy, hemocytometry)
- 2) Nepřímá metoda (barvené krevní nátěry)
- 3) Poloautomatizované stanovení
- 4) Plně automatizované stanovení (moderní analyzátory)

### **5.1 Přímá metoda stanovení počtu krevních destiček**

Přímá metoda stanovení počtu krevních destiček je někdy podle svých zakladatelů uváděna jako Brecher-Cronkite metoda a dlouho byla považována za optimální metodu (Brecher et al., 1953). Dodnes je tato metoda často používána a to především v méně specializovaných laboratořích, kde nejsou k dispozici automatické přístroje, popřípadě v běžné praxi, jestliže celkový počet je příliš nízký či jsou-li přítomny ve vzorku atypické krevní destičky (běžně se provádí i na OKH Nemocnice České Budějovice). Základem této metody je ředící roztok šťavelanu amonného, který způsobí potřebnou lýzu červených krvinek. Má totiž tu výhodnou vlastnost, že neporušuje strukturu krevních destiček a bílých krvinek. Ty tak zůstávají nedotčené a lze je tedy stanovit.

Při provedení přímé metody se obvykle jako antikoagulant používá EDTA, který zabrání srážení odebrané krve a tedy ke vzniku shluků, čímž by se stal vzorek nepoužitelným (ne vždy tomu tak ve skutečnosti je). Naředěnou krví se plní počítací komůrky, kterých je v dnešní době na trhu od různých výrobců velké množství. Takto připravené komůrky se vzorky se následně prohlíží v mikroskopu, který je vybaven pro pozorování ve fázovém kontrastu. Nejčastěji používanou metodou je přímá metoda Piettove.

Variační koeficient CV (z ang. coefficient of variation) této metody je v rozmezí 10-25 % (Harrison et al., 2000). V roce 1988 se tato metoda stala mezinárodní

referenční metodou (ICSH, 1988) a tuto roli si zachovala dodnes.

## **5.2 Nepřímá metoda stanovení počtu krevních destiček**

Při nepřímé metodě se zjišťuje počet trombocytů v krevním nátěru nebo nativním preparátu vztahený na počet erytrocytů. Z nepřímých metod byla nejužívanější Foniova metoda. V současné době se nepřímá metoda stanovení už téměř nepoužívá. Přednost se dává metodě přímé a to hlavně z důvodu větší přesnosti.

## **5.3 Poloautomatizované metody**

První zmínka o elektronickém stanovení počtu krevních destiček pochází z roku 1965 od tvůrců Bentley, Johnson & Bishop. Při této metodě se nechá nesrážlivá krev (s EDTA) spontánně usadit, popřípadě krátce zcentrifugovat. Krevní destičky přítomné v supernatantu PRP (z ang. platelet rich plasma) jsou následně spočítány za použití elektronického přístroje pracujícího na principu impedance (Briggs et al., 2007).

Tyto dnešní přístroje určené k počítání krevních elementů jsou často označovány jako Cell (particle) counters. Na trhu je k dispozici velké množství těchto zařízení pod různými názvy a od různých firem, která jsou postupným vývojem různě modifikována a zlepšována.

### **5.3.1 Coulter particle counters - přístroje stanovující počet buněk**

Takto označené přístroje vyšetřují vzorky krve a analyzují jednotlivé buněčné populace principem, který je založen na elektronickém či optickém základě. Hlavním cílem sestavení těchto přístrojů bylo tak nahradit namáhavé a časově zdlouhavé manuální stanovení, které je závislé na individuálních schopnostech a zkušenostech dotyčného pracovníka.

Elektrická analýza spočívá v průchodu počítaných buněk ve zředěném roztoku krve skrz otvor (aperturu), kterým prochází elektrický proud. Tento průchod buněk mění impedanci mezi elektrodami. Tomuto jevu se říká Coulterův princip (viz kapitola 6). Především v minulosti byla provedena řada pokusů s různými velikostmi apertur (Girling, Eggleton, Sharp, Bull, Schneiderman, Brecher) a bylo zjištěno

mnoho poznatků platících dodnes. Začaly se především používat větší velikosti apertur, neboť malé velikosti měly tendenci zpomalovat průchod buněk či se dokonce ucpávat. Nevýhodou apertur menších rozměrů byla i jejich neustálá potřeba výměn za větší apertury při stanovení počtu buněk o větších rozměrech, což znamenalo především opakované zásahy do přístroje a tedy i riziko negativního ovlivnění samotného měření či dokonce mechanického poškození přístroje (Davis et al., 1967).

Optická detekce se užívá k získání diferenciálního počtu populací jednotlivých typů bílých krvinek. Používá se laserový paprsek a díky speciálnímu softwaru je analyzován odraz, transmise a rozptyl světla každé buňky. Výsledkem je pak numerické zastoupení pravděpodobné celkové distribuce buněčných populací.

#### **5.4 Plně automatizované metody**

Metoda plně automatizovaného stanovení byla poprvé dostupná na zařízeních Technicon či AutoCounter, který využíval elektro-optický systém měření destiček. Přístroje byly již schopny pracovat s plnou krví (v EDTA). Rychlost stanovení se pohybovala kolem 40 vzorků/hod. K lýze červených krvinek se používala 2M močovina (Brittin, Dew & Fewell, 1971, Rowan, Allan & Prescott, 1972).

Jedním z následujících pokroků v automatizovaném stanovení bylo užití speciálního zařízení pracujícího na principu impedance: The Clay Adams (později Beckton Dickinson) Ultra Flow 100 (Briggs et al., 2007). V praxi to především znamenalo zlepšení přesnosti stanovení počtu pro celou krev (tedy výrazné snížení CV) a to oproti dřívějším metodám poměrně znatelně.

Dnes máme již několik metod automatizovaného stanovení počtu krevních destiček. Patří mezi ně měření založené na principu elektrické impedance, optiky a jejího rozptylu (včetně fluorescence) a imunologie atd. Většina analyzátorů je rovněž navržena ke stanovení počtu krevních destiček v přítomnosti červených krvinek (RBC), neboť prochází stejným kanálem přístroje. Ten je však schopen rozlišit jeden typ buňky od druhého na základě velikosti (PLT rozmezí 2-20 fl, RBC 36 fl a více). Počet bílých krvinek (WBC) je stanoven zvlášť ve vlastní části analyzátoru. Stanovení počtu WBC však musí předcházet selektivně navozená lýza červených krvinek. Uvolňuje se tak hemoglobin, který je po změření počtu WBC rovněž stanoven v jedné z částí analyzátoru (hemoglobinometr, princip: měření absorbance při vlnové délce 545 nm). Tyto a další informace jsou v podobě



elektrických pulsů zaznamenány a digitálně převedeny. Součástí tohoto procesu zpracování naměřených dat je i korekce koincidence.

Komerčně je dnes k dostání již široká škála plně automatizovaných analyzátorů, které mohou měřit 8-32 parametrů krve a k tomu využívat různé principy (tab. 2). Společným znakem dnešních analyzátorů je stanovení krevních elementů z plné krve. Mezi běžně stanovené parametry krve patří všechny parametry červených krvinek včetně hematokritu a hemoglobinu, všechny parametry krevních destiček, retikulocyty a leukocyty. U leukocytů se stanovuje i jejich rozdělení do subpopulací. Zde se mohou přístroje lišit. Některé analyzátoři rozdělují leukocyty do 3 skupin (lymfocyty, granulocyty a ostatní), jiné do 5 skupin (lymfocyty, monocyty, neutrofil, eozinofily a bazofily) např. prostřednictvím systému VCS.

*Poznámka: Technologie VCS<sup>4</sup> (V-volume, C-conductivity, S-scatter) je speciální prostředek pro analýzu krve a to především pro jednotlivé subpopulace leukocytů a samotných retikulocytů. Lze říci, že se jedná o jednobarevný analyzátor, který však využívá 3 nezávislé zdroje energie. Přístroj, který má zabudovaný systém VCS, je schopen o každém krevním elementu procházejícím systémem, zjistit velké množství informací včetně objemu, vodivosti, rozptylu a vnitřní struktury. Tato technologie je vysoce specifická a přesná. Modul VCS vlastní např. Coulter Gen S či Coulter MAXM.*

Mezi základní vlastnosti, které jsou u analyzátorů testovány, patří linearita, správnost a přesnost měření, variační koeficient a případná kontaminace analyzátoru. Podstatná je rovněž minimální fluktuace v opakovaných výsledcích téhož vzorku tzv. test reprodukovatelnosti (Briggs et al., 2007).

**Tab. 2** Přehled nejznámějších výrobců hematologických analyzátorů a princip stanovení destičkového počtu

Výrobce	Přístroj	Princip stanovení destičkového počtu
Beckman Coulter	LH 750, GEN-S	Impedance
ABX Diagnostics	Pentra-120	Impedance
Sysmex Corporation	SE-9500, XE-2100	Impedance, optika (u XE-2100)
Abbot Diagnostics	Cell-Dyn 4000, Sapphire	Impedance, optika, imunolog. metody
Bayer Corporation	Advia 120, Advia 2120	Optika

<sup>4</sup> Informace o technologii VCS pochází z internetových stránek [www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com).

## 6 Metoda elektrické impedance

Metoda elektrické impedance se stala nedílnou součástí mnoha hematologických analyzátorů. Člověk, který stojí za tímto objevem, byl Wallace Coulter (1953). Byl to právě on, kdo poprvé popsal a definoval tuto metodu založenou na rezistenci stanovovaných částic. Často můžete pro tuto metodu najít v literatuře i označení Coulter Principle<sup>5</sup> či Electrical Sensing Zone Method.

Coulterův princip (chcete-li metoda elektrické impedance) se brzy stal špičkovou metodou uznávanou a rozšířenou po celém světě. Výrazně tak ovlivnil vývoj klinické diagnostiky. Mezi očekávané výhody, které měla tato nová a revoluční metoda přinést, měly patřit především rychlost a přesnost stanovení.

Přijetí této metody je dnes evidentní a to především v oboru hematologie. Dnes je Coulterův princip začleněn ve více než 98 % zařízeních určených ke stanovení počtu krevních elementů. Navíc se v posledních letech začal využívat i ke studiu ostatních druhů buněk (např. bakterie, tukové buňky a jiné buněčné částice) a dokonce i různých částic (rozmezí velikostí 0,4-1200  $\mu\text{m}$ ) v oblasti potravinářství, pivovarnictví, výrobě kosmetiky a dalších průmyslových oborech jako např. ve výrobě cementu, tonerů (Kružík et al., 2006).

Princip spočívá v průchodu částic (suspendovaných ve velmi malém množství roztoku elektrolytu) skrze malou otevřenou aperturu oddělující platinové elektrody (obr. 1)<sup>6</sup>. Tato oblast je též označována jako tzv. sensing zone (odtud název Electrical Sensing Zone Method) a prochází jí konstantní elektrický proud. Velikost apertury se pohybuje v rozmezí 15-2000  $\mu\text{m}$ . Při průchodu částice přes aperturu tedy dochází ke změnám impedance v podobě momentálních nárůstů. Tyto změny v impedanci produkují pulsy, které jsou digitálně analyzovány a rozděleny podle velikosti. Tak je tedy stanovena koncentrace částic ve vzorku podle počtu pulsů. Zatímco počet pulsů určuje počet buněk, velikost pulsu je úměrná buněčnému objemu. V této metodě je tedy na buňky pohlíženo jako na nevodivé (nekonduktivní) částice, které kladou odpor (Eggleton et al., 1963).

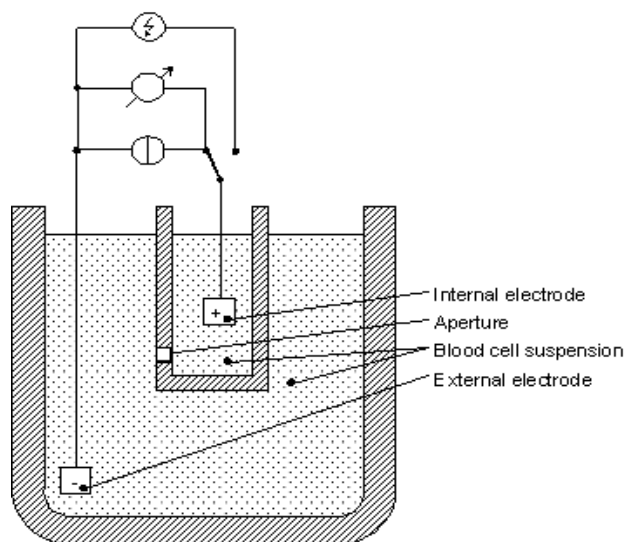
Takto jsou počítány tisíce částic za sekundu s vysokou přesností. Metoda je

---

<sup>5</sup> Některé informace o Coulter principu pochází z internetových stránek společnosti Beckman Coulter [www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com).

<sup>6</sup> Obrázky použité v literárním přehledu pochází z internetových stránek, popř. cit. článků (viz seznam 13 a 14).

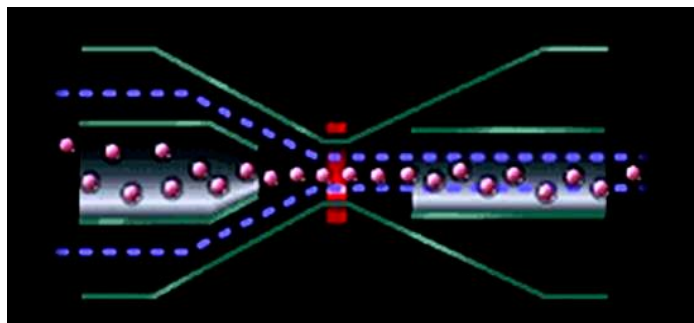
nezávislá na tvaru, barvě i hustotě částice. Průchod buněk přesného množství nařazeného vzorku přes měřicí otvor je zajištěn mechanicky (pomocí vakua) a liší se dle druhu analyzátoru.



**Obr. 1** Schéma Coulter principu

Je jasné, že ideálním stavem při této metodě je ta situace, kdy buňky, které mají být stanoveny, prochází aperturou jedna za druhou. Tak je spolehlivě a přesně stanoven jejich celkový počet. Bohužel velice často dochází i k souběžnému obsazení apertury více než jen jednou buňkou. Tomuto jevu se říká koincidence. Chybě ve stanovení celkového počtu je pak přidělen jednoduchý a odvozený název chyba koincidence. Tato chyba je logicky tím větší, čím je koncentrace buněk v suspenzi vyšší (Briggs et al., 2007).

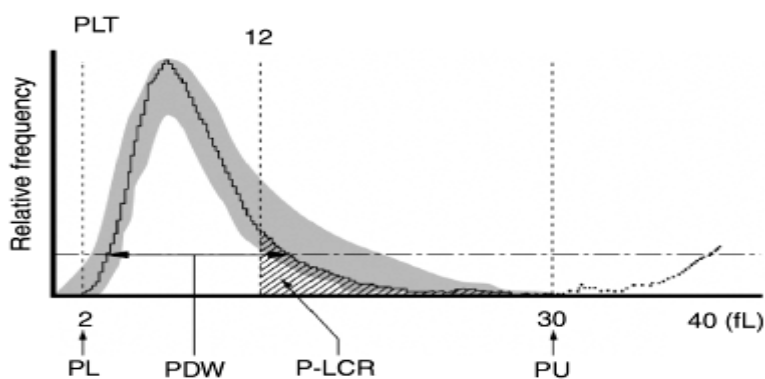
Samozřejmě se tento problém stal výzvou pro mnohé odborníky, kteří přišli s řadou možných řešení. Jedním z nich byl i princip hydrodynamické fokusace (z ang. hydrodynamic focusing). Ten totiž zajistí centrální pozici a vhodnou orientaci měřeného elementu (tzn. svou největší plochou vůči detektoru) v apertuře a to prostřednictvím ředícího roztoku, který je velkou rychlostí vstřikován skrze aperturu (obr. 2). Vznikne tak pohyblivý systém, do kterého je výrazně pomaleji přidávána suspenze krevních elementů (nejčastěji injekčním způsobem), které stanovujeme. Částice se tedy řadí jedna za druhou uprostřed sloupce unášecí kapaliny. Výsledkem tohoto přístrojového vylepšení je výrazné snížení pravděpodobnosti společného průchodu dvou či dokonce více buněk aperturou a tedy přesnější výsledky. Toto uspořádání poprvé použil Crosland - Taylor v r. 1953.



**Obr. 2** Princip hydrodynamické fokusace

Na obr. 3 je možno vidět typický příklad distribuční křivky trombocytů (PLT histogram), ze které je odvozen nejen počet krevních destiček, ale i další parametry těchto krevních elementů. Osy této křivky znázorňují relativní počet (REL, osa y) a objem měřených částic (ve fl, osa x), v tomto případě krevních destiček. Křivka, která grafem prochází, je označována jako tzv. log-normal křivka. Její rozpětí je 0-70 fl. Krevní analyzátor Beckman Coulter LH 750 zde považuje krevní destičky za částice v rozmezí velikosti 2-20 fl (Briggs et al., 2007, Patterson, 1997).

Limity a nevýhody této metody jsou dnes již dobře známé. Byla již probrána otázka koincidence. Ještě závažnějším problémem je však velice obtížné rozlišení destiček (především těch velkých) od jiných buněk či částic. Mezi tyto elementy patří především mikrocyty, fragmenty krvinek, shluky destiček, imunokomplexy či buněčný odpad. Společným znakem je, že negativně ovlivní distribuční křivku stanovovaných destiček, což se samozřejmě projeví na špatném výsledku (falešně zvýšený či snížený počet).



**Obr. 3** Distribuční křivka trombocytů (přístroj Sysmex XE-2100)

*Poznámka: S tímto problémem se dokáže vypořádat např. analyzátor Sysmex XE-2100<sup>7</sup> (Sysmex, Kobe, Japan). Tento přístroj disponuje nejen impedančním stanovením počtu destiček, ale je schopen použít i optickou fluorescenční metodu stanovení. Jeho speciální algoritmus (tzv. switching algorithm) tedy zodpovídá za získání nejpřesnějšího počtu, buď optického nebo impedančního. Vyskytují-li se tedy ve vzorku již zmíněné fragmenty červených krvinek, mikrocyty či velké destičky, přístroj automaticky stanoví raději optický počet (Briggs et al., 2004).*

Dlouhou dobu rovněž panovala domněnka, že impedanční počet není vhodný ke stanovení destičkového počtu u vzorků s velmi nízkou koncentrací destiček (většina zdrojů uvádí hladinu  $20 \cdot 10^9/l$ ). Na toto téma byly a jsou prováděny četné studie, které mají prokázat, zda je toto tvrzení správné. Dosud však nebylo toto tvrzení jistě potvrzeno, ale ani vyvráceno.

*Poznámka: Příkladem toho, může být optický systém analyzátoru Sysmex XE-2100, u kterého (dle studií) mnohdy nabýval impedanční počet přesnějších hodnot než ten optický (Briggs et al., 2004).*

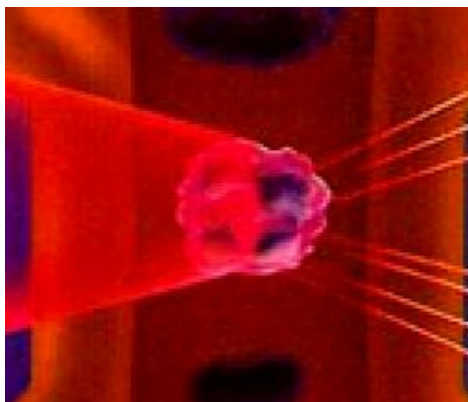
## 7 Optické stanovení destiček

Optické stanovení je další metodou, která je používána ke stanovení počtu krevních elementů. Jedná se o mladší metodu, než-li je metoda elektrické impedance, přesto je dnes na poli analyzátorů již bohatě zastoupena. Na jejím vývoji se podílely především společnosti Bayer Diagnostics, Tarrytown (Advia) a Abbott Diagnostics, Santa Clara (Cell-Dyn 4000). Princip této metody je založen na průchodu laserového paprsku skrze buňku. Součástí analyzátorů jsou pak detektory, jejichž hlavním cílem je zachytit a zpracovat rozptýlené světlo. Tyto světelné signály obsahují informaci o charakteru buňky (velikost, složení, granularita cytoplasmy a lobularita jádra).

Měřený roztok se tedy nejprve umísťuje do kyvety. Tou se následně nechá procházet laserový paprsek. Po interakci krevního elementu s tímto paprskem laseru dochází k rozptylu světla (obr. 4). Tento rozptyl odraženého paprsku je zachycen a měřen pod určitými úhly. Tyto naměřená data jsou zpracována, vyhodnocena a pomocí složitých algoritmů pro jednotlivé parametry jsou i graficky znázorněna do bodových diagramů a histogramů (Hoblová, 2006).

---

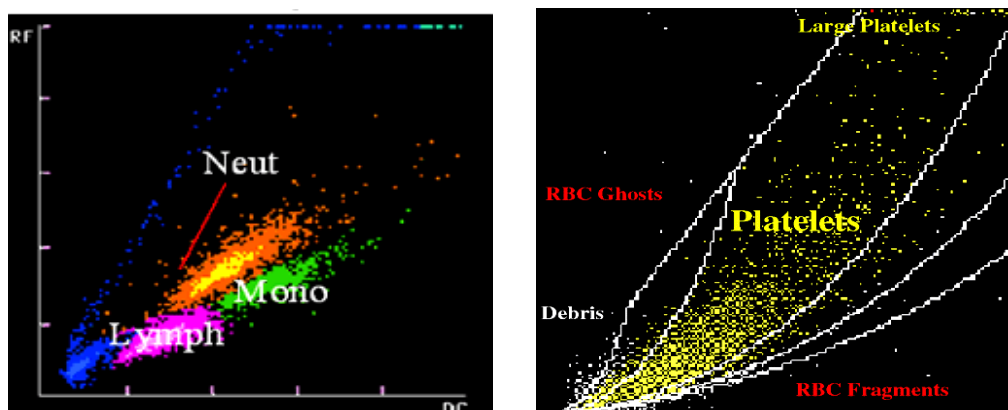
<sup>7</sup> OKH Nemocnice České Budějovice mělo možnost několik měsíců testovat tento přístroj. Ukázalo se, že oddělení nepřináší žádnou větší výhodu ve stanovení počtu destiček oproti přístroji LH 755 firmy Beckman Coulter.



**Obr. 4** Znáznornění rozptylu laserového paprsku na krevním elementu

Pokud měříme rozptyl pod úhlem 2-3°, pak se jedná o jednorozměrovou analýzu. Dnes je však již častější měřit rozptyl laserového paprsku pod úhly 2-3° a 5-15°, kdy je na základě tohoto měření stanoven i objem destičky a její index lomu (Kunicka et al., 2000). V tomto případě mluvíme o dvourozměrové analýze, která má tu výhodu, že je možno lépe odlišit destičky od jiných elementů. Tento typ měření využívají mnohé systémy, např. Advia 120, 2120 - Bayer, Cell-Dyn 4000, Sapphire - Abbott.

*Poznámka: Analyzátor Cell-Dyn 4000 (firma Abbott, měří i principem impedance) pracuje také na principu dvourozměrové destičkové analýzy. Rozdíl je však v tom, že oproti přístrojům firmy Bayer používá odlišné velikosti úhlu měření 7 a 90° (Briggs et al., 2007).*

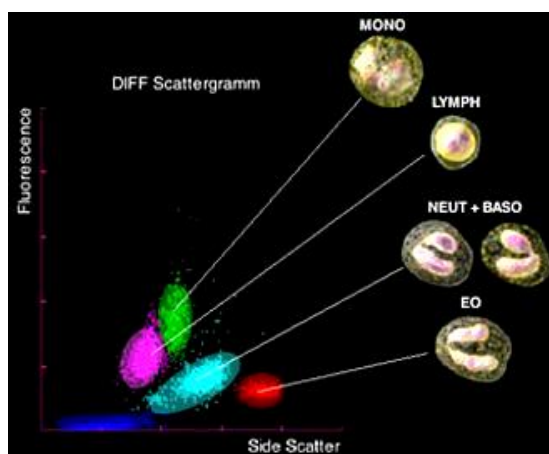


**Obr. 5** Ukázka rozptylového cytogramu (vlevo)  
Rozptylový cytogram trombocytů s vyznačenými oblastmi ostatních částic krve (vpravo)

Na základě zjištěných parametrů (objem a index lomu) a rozptylového cytogramu (častěji se používá označení scattergram) je možno identifikovat populaci destiček

(obr. 5). Přičemž index lomu krevní destičky se pohybuje v rozmezí hodnot 1,35-1,40 (Briggs et al., 2007). Na cytogramu je vidět i pravděpodobné rozložení ostatních částic (fragmenty červených krvinek, mikrocyty, buněčný odpad atd.), které mnohdy mohou při špatném rozlišení destiček zkreslit výsledek. Sporná otázka přesnosti a to hlavně v oblasti velmi nízkých koncentrací (pod  $20 \cdot 10^9/l$ ) byla již zmíněna v kapitole o impedanci.

Mezi optické metody stanovení patří i fluorescenční optická metoda. Princip využívá možnosti obarvení jaderné DNA buňky speciálním barvivem (nejčastěji polymethinové barvivo). Po ozáření laserovým paprskem dochází k excitaci a emisi fluorescenčního záření. Výsledkem je přesný obraz každé detekované buňky (obr. 6). Odlišit destičky od jiných elementů se provádí na základě rozdílné fluorescenční intenzity. Výhodou metody je rovněž možnost rozlišit velké či abnormální destičky od těch normálních. Často je dnes využívána při rozhodování lékařů, zda mají pacientovi podat destičkové transfúze (Briggs et al., 2000). Na principu této metody funguje přístroj Sysmex XE-2100.



**Obr. 6** Optická fluorescenční metoda

## 8 Imunologická metoda

Princip této metody spočívá ve značení krevních destiček monoklonální protilátkou, která bývá konjugována s např. fluoroforem či fluorescein isothiokyanátem (Briggs et al., 2007). Takto označená protilátka se tedy specificky

váže na povrchové molekuly glykoproteinů krevních destiček, čímž umožní jejich stanovení průtokovou cytometrií.

Mezi nejběžnější používané destičkové protilátky patří CD41a (váže se na glykoprotein IIb/IIIa), CD42b (glykoprotein Ib- $\alpha$ ) a CD61 (glykoprotein IIIa) (Dickerhoff et al., 1995). Je potřeba si uvědomit, že použitá protilátka musí být schopna rozpoznat všechny destičky. To je hlavní podmínka, aby bylo možno jednoznačně rozlišit destičky od jiných elementů.

Mezi hlavní výhody této metody patří eliminace koincidence optimálním zředěním vzorku. Rovněž je nutno poznamenat vhodnost použití metody pro vyšetření trombocytopenických vzorků, kdy výsledek prokazuje vysokou přesnost (Kunz et al., 2001). Variační koeficient se u koncentrace destiček  $10 \cdot 10^9/l$  pohybuje v rozmezí 5,3-5,6 % (Dickerhoff et al., 1995). Obecně je tato metoda považována za jednoduchou, spolehlivou a dostupnou pro každou laboratoř s průtokovou cytometrií.

Jediným dostupným zařízením pracujícím na tomto principu je přístroj Cell-Dyn 4000 či Sapphire (Abbott, Wiesbaden - Delkenheim Germany).

## 9 Metodika

Zpracovaná data pochází ze záznamů krevních obrazů OKH Nemocnice České Budějovice, kde jsem absolvoval praxi v rámci svého studia. V této části se zaměřuji na samotné praktické stanovení destičkového počtu prováděné na oddělení. Cílem je vyhodnotit výsledky krevních obrazů, tedy zastoupení jednotlivých, klinicky významných, koncentrací krevních destiček za určité časové období. Dále se soustředím na samotné zhodnocení metod využívaných ke stanovení destičkového počtu na oddělení a to na základě naměřených dat. Část práce je věnována otázce vlivu antikoagulantu (EDTA, citrát) na správnost výsledku destičkového počtu získaného hematologickým analyzátozem.

### 9.1 Odběr krve a její zpracování

Žilní krev (popř. kapilární) je odebrána po rýsku do speciálních umělohmotných zkumavek (objem 3 a 4,5 ml) s antikoagulačním činidlem EDTA (chelatonát trojdraselný  $K_3EDTA$ , fialový uzávěr, suchá forma, v množství asi 1,5 g/l vzorku) či citrátem (modrý uzávěr, kapalná forma, 3,2% roztok, ředění 1 : 9). Jedná se



o uzavřený vakuovaný systém, který zabraňuje expiraci odběrových zkumavek.

Takto odebraný vzorek se ihned po odebrání promísí opakovaným převrácením zkumavky a je spolu s žádankou o konkrétní vyšetření transportován zdravotnickým personálem co nejrychleji na OKH. Zde personál laboratoře zkontroluje jméno a rodné číslo pacienta a přidělí identifikační číslo, které se v podobě čárového kódu nalepí na vzorek i žádanku pacienta.

Takto připravená zkumavka s pacientovou krví je vložena do speciální kazety spolu s ostatními vzorky jiných pacientů a poté do hematologického analyzátoru firmy Beckman Coulter LH 755.

## 9.2 Vyšetření krevního obrazu

K vyšetření krevního obrazu slouží na OKH Nemocnice České Budějovice hematologický analyzátor LH 755 firmy Beckman Coulter. Tento analyzátor stanovuje parametry krevního obrazu metodou elektrické impedance (viz kapitola 6) a stanovuje všechny základní parametry červených krvinek, trombocytů a leukocytů, včetně 5-ti populačního diferenciálního rozpočtu.

## 9.3 Stanovení počtu krevních destiček

Vedle stanovení destičkového počtu hematologickým analyzátozem LH 755 firmy Beckman Coulter se na oddělení provádí měření destičkového počtu i referenční metodou pomocí počítací komůrky a mikroskopu. Tato metoda přímého stanovení se nazývá metoda Piettovcova. Podstatou této metody je počítání trombocytů sedimentovaných na známou plochu mřížky Bürkerovy komůrky. Při této metodě je krev ředěna roztokem prokainu (20×), který způsobí hemolýzu červených krvinek. Zároveň však zvýrazňuje a stabilizuje destičky. Ty nejsou tedy schopny agregace či adheze.

Roztok se skládá z 2,34 g hydrochloridu prokainu, 0,2 g chloridu sodného a je doplněn do 100 g destilovanou vodou (Sakalová et al.,1995).

Provedení metody: 25 µl napipetované kapilární krve je vyfouknuto do spodních vrstev prokainového roztoku, který je předem napipetován v množství 475 µl do zkumavky. Následuje jemné promíchání (v ruce asi 1 minutu) a ponechání v klidu při

pokožkové teplotě 90-120 minut. Poté je třeba vše znovu manuálně promíchat a to po dobu 3 minut.

Teprve nyní se naplní Bürkerova komůrka (stejným způsobem jako při počítání krvinek), která je poté vložena do vlhkého prostředí, kterým je obvykle Petriho miska s navlhčeným filtračním papírem. Ta se ponechá v termostatu při 37 °C po dobu asi 10 minut. Pak je již možno stanovit počet trombocytů, které se jeví v zacloněném zorném poli při 300-400 násobném zvětšení jako svítící body. Počet se stanovuje ve 20 obdélníčcích, přičemž plocha každého činí 1/100 mm<sup>2</sup>. Výsledek pak již lze snadno odvodit.

$$Trc = (\text{součet} / 20) * 1\ 000 * 20$$

Při počítání ve 20 obdélníčcích a ředění 1 : 20 pak stačí součet ve 20 obdélníčcích násobit 1 000. Počet trombocytů je převeden na 1 l krve.

### **9.3.1 Vliv antikoagulantu na výsledek hematologického analyzátoru, EDTA syndrom a pseudotrombocytopenie**

Od 1. září roku 2007 započalo OKH Nemocnice České Budějovice provádět měření destičkového počtu nejen ze vzorků nabraných do antikoagulantu EDTA, ale také ze vzorků, kde je jako antikoagulant použit citrát. Do této doby se měření vzorku s citrátem stanovovalo jen výjimečně. Většina vzorků byla tedy při odběrech nabírána do EDTA. Hematologický analyzátor poté stanovil destičkový počet. Pokud byl tento počet pod dolní hranicí a nejednalo-li se o pacienta s trvale sníženým počtem krevních destiček, následovalo manuální mikroskopické přepočítání metodou Piettovcova. Pokud byl spočítán přibližně stejný počet i mikroskopem ( $\pm 15\%$  výsledku analyzátoru), zůstal platným výsledkem automatický počet analyzátoru. V případě, že rozdíl změřený laborantem mikroskopickou metodou byl větší než zmíněných 15 % automatického počtu, byl do zápisu pacienta zapsán právě výsledek stanovený mikroskopem. V obou těchto případech byla k výsledku přidána poznámka o mikroskopickém stanovení počtu krevních destiček. Poslední možností byl přímý náběr a stanovení destičkového počtu z prstu pacienta.

Přechod na citrát znamenal změnu v postupu práce se vzorky krve. Nejprve je krev rovněž nabírána do antikoagulantu EDTA (suchá forma) a následně změřena hematologickým analyzátozem. Pokud je destičkový počet snížen pod stanovenou

mez, následuje odběr do citrátu (kapalná forma, nutno přičíst k výsledku 10 % kvůli ředění). Vzorek je také změřen přístrojem.

Tímto postupem se předpokládá eliminace části falešně nízkých počtů krevních destiček - tzv. pseudotrombocytopenie. Ta má několik příčin (polékové změny, destičkový satelismus atd.) a jednou z nich je i tzv. EDTA fenomén (či syndrom). Ten spočívá v reakci pacientových protilátek (hlavně IgG, IgM a IgA) s krevními destičkami za přítomnosti antikoagulantu EDTA (Pegels et al., 1982). Při této interakci dochází ke změně konformace povrchových molekul glykoproteinů krevních destiček a následkem toho i k aglutinaci. Vznikají tak shluky, které jsou příčinou falešně nízkého počtu hlášeného přístrojem (Slaughter et al., 1998).

Rychlost aglutinace ovlivňuje koncentrace antikoagulantu (reakce již při 0,3 mM), teplota a hlavně doba mezi odběrem a samotným měřením hematologickým analyzátozem. Frekvence výskytu EDTA-dependentní pseudotrombocytopenie je udávána jako 0,1 % v obecné populaci.

Definitivní důkaz o pseudotrombocytopenii podává v případě nutnosti počítání pod mikroskopem (opět odběr z prstu pacienta).

## **10 Výsledky**

### **10.1 Vyhodnocení krevních obrazů**

V období 1. 10. - 31. 10. 2007 bylo na OKH Nemocnice České Budějovice stanoveno 9080 krevních obrazů. Ke stanovení krevních obrazů byl použit hematologický analyzátor LH 755 firmy Beckman Coulter pracující metodou elektrické impedance. Výsledky stanovení destičkových počtů jsou uvedeny v tab. 1.

**Tab. 1** Výsledky stanovení počtu trombocytů

<b>Krevní destičky [<math>\times 10^9/l</math>]</b>	<b>Počet pacientů</b>	<b>Zastoupení v [%]</b>
Celkový počet KO	9080	-
Počet stanovených destičk. počtů	9034	100
Počet výsledků pod hranicí 135	775	8,58
Počet výsledků v normě 135-450	7554	83,62
Počet výsledků nad hranicí 450	705	7,8
<b>Rozmezí hodnot 100-135</b>	<b>354</b>	<b>3,9</b>
<b>Počet výsledků s varovnou hod. ↓</b>	<b>171</b>	<b>1,9</b>
<b>Počet výsledků s varovnou hod. ↑</b>	<b>48</b>	<b>0,5</b>

*Poznámka: hranice nad  $800 \times 10^9/l$  - varovná hodnota, vysoké riziko trombózy*

*rozmezí  $450-800 \times 10^9/l$  - zvýšený počet, často bez symptomů*

*rozmezí  $135-450 \times 10^9/l$  - referenční rozmezí, norma*

*rozmezí  $100-135 \times 10^9/l$  - klinicky významné rozmezí*

*rozmezí  $50-100 \times 10^9/l$  - klinicky významné, bez rizika spontánního krvácení*

*hranice pod  $50 \times 10^9/l$  - varovná hodnota, vysoké riziko spontánního krvácení*

U ostatních krevních obrazů (46 vzorků) nebyl stanoven destičkový počet. Některé vzorky byly určeny jen pro diferenciální rozpočet leukocytů či jiné stanovení. Zbylá část dodaných vzorků byla sražena (asi 0,15 %) a nemohla být tedy změřena hematologickým analyzátozem.

V tabulce je rovněž uvedena klinicky významná oblast koncentrace krevních destiček  $100-135 \cdot 10^9/l$ . Hladina krevních destiček je totiž u určitého procenta lidí mírně snížena či mírně zvýšena (cca. 5 %). Lidé s koncentrací destiček na dolní hranici  $100 \cdot 10^9/l$  mají sice trombocytopenii, ale ta je mnohdy nijak neohrožuje. Proto u těchto pacientů, u kterých je tato skutečnost zjištěna, nejsou tyto snížené hodnoty v klinicky zaměřené laboratoři mikroskopicky přeměřovány. Na OKH bylo za měsíc říjen stanoveno asi 3,9 % pacientů s takto mírně sníženou hodnotou hladiny krevních destiček.

## 10.2 Výsledky vlivu antikoagulantu na výsledek hematologického analyzátoru, EDTA syndrom a pseudotrombocytopenie

Z období 1. 9. - 31. 12. 2007 byly vybrány všechny výsledky počtů krevních destiček stanovených vždy stejný den z EDTA i citrátu. Tyto destičkové počty jsem spároval, porovnal a výsledky uvedl v tabulce (viz Příloha). Cílem bylo odhalit přítomnost EDTA-dependentní pseudotrombocytopenie.

Ze 126 párů destičkových počtů byly nalezeny zjevné 3 příklady (tab. 2), které by svědčily o přítomnosti EDTA-dependentní pseudotrombocytopenie. Vzorke nabrané do citrátu tedy odhalily falešně snížené počty vzorků nabraných a změřených v EDTA. V jednom případě byl naopak výrazně vyšší počet stanovený v EDTA.

**Tab. 2** Výsledky počtů trombocytů stanovených v rozdílných antikoagulantech

Vzorek	EDTA	Citrát	Citrát*
1	96	250	275
2	18	286	315
3	14	290	319
4	273	54	59

Poznámka: Citrát\* - hodnota počtu destiček změřená v citrátu a zvýšena o 10 % z důvodu ředění.

## 10.3 Reprodukovatelnost analytického měření hematologickým analyzátozem

Posouzení reprodukovatelnosti měření hematologickým analyzátozem je prováděno pravidelně jednou týdně opakovaným měřením stejného vzorku s antikoagulantem EDTA jako součást systému vnitřní kontroly kvality (IQC). V únoru 2008 bylo provedeno paralelně měření dvou vzorků.

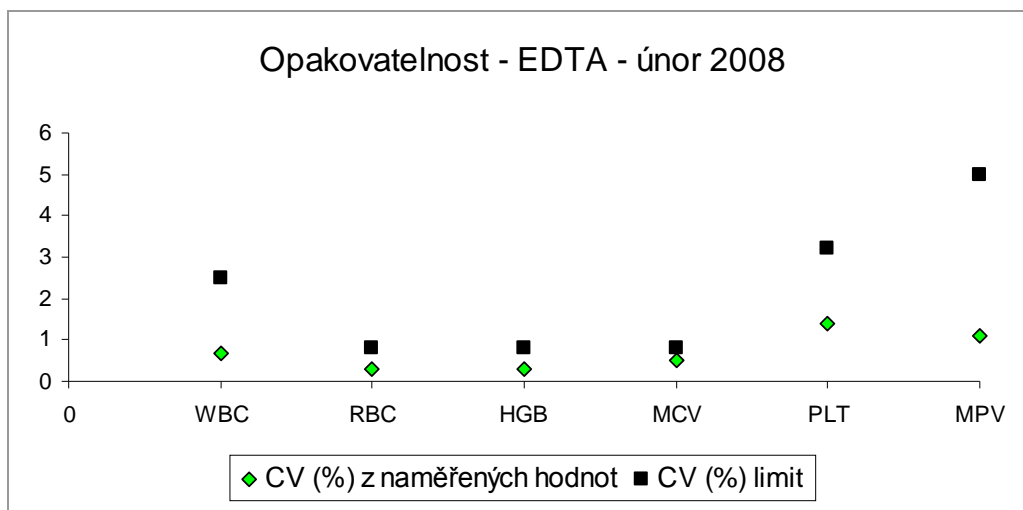
Jeden krevní vzorek obsahoval antikoagulant EDTA (tab. 3), druhý vzorek byl nabrán do citrátu (tab. 4). Každý vzorek byl změřen 6-krát. Hodnoty a výpočty krevních destiček jsou uvedeny v tabulkách. Přiložené grafy znázorňují variační koeficienty a limity ostatních měřených parametrů krevního obrazu (obr. 1, 2).

**Tab. 3** Hodnoty a výpočty testu reprodukovatelnosti hematologického analyzátoru s použitím antikoagulantu EDTA

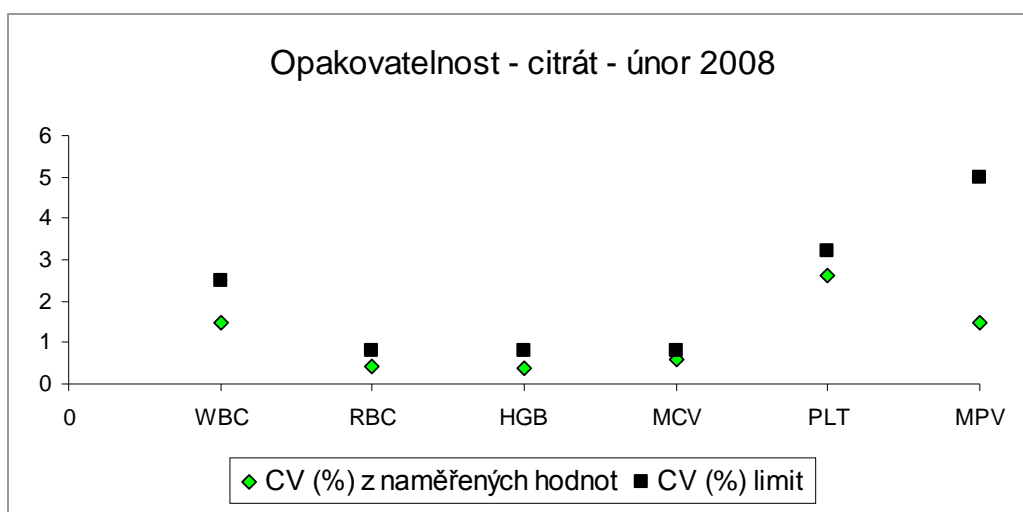
Číslo měření	PLT	MEAN	282,8
<b>1</b>	282,8	<b>2SD</b>	7,9
<b>2</b>	287,7	<b>MIN</b>	276,9
<b>3</b>	284	<b>MAX</b>	287,7
<b>4</b>	279,7	<b>Diff</b>	10,8
<b>5</b>	276,9	<b>CV (%)</b>	<b>1,4</b>
<b>6</b>	285,8	<b>CV (%) limit</b>	<b>3,2</b>

**Tab. 4** Hodnoty a výpočty testu reprodukovatelnosti hematologického analyzátoru s použitím antikoagulantu citrátu

Číslo měření	PLT	MEAN	97,8
<b>1</b>	94,9	<b>2SD</b>	5,1
<b>2</b>	95,8	<b>MIN</b>	94,9
<b>3</b>	96	<b>MAX</b>	100,9
<b>4</b>	99,2	<b>Diff</b>	6
<b>5</b>	100,9	<b>CV (%)</b>	<b>2,6</b>
<b>6</b>	100	<b>CV (%) limit</b>	<b>3,2</b>



**Obr. 1** Vypočtené variační koeficienty a jejich limity pro parametry krevního obrazu - EDTA



**Obr. 2** Vypočtené variační koeficienty a jejich limity pro parametry krevního obrazu - citrát

#### 10.4 Stanovení destičkového počtu hematologickým analyzátozem bez použití antikoagulačního činidla

Cílem bylo pouze vyzkoušet a zhodnotit možnost stanovení destičkového počtu a ostatních parametrů krevního obrazu hematologickým analyzátozem a to bez použití antikoagulačního činidla. Pro porovnání správného výsledku byl vzorek nabrán i do antikoagulantu EDTA. Hodnoty jsou uvedeny v tab. 5.

**Tab. 5** Výsledky stanovení počtu trombocytů a ostatních parametrů krevního obrazu bez použití antikoagulantu

<b>Parametr krev. obrazu</b>	<b>Hodnoty bez aditiv</b>	<b>Hodnoty s EDTA</b>
<b>WBC</b>	5,5	6
<b>RBC</b>	4,93	4,79
<b>HGB</b>	14,3	14,3
<b>HCT</b>	43,6	42,7
<b>MCV</b>	88,5	89
<b>MCH</b>	28,9	29,8
<b>MCHC</b>	32,7	33,4
<b>RDW</b>	11,9	12,8
<b>PLT</b>	<b>277</b>	<b>266</b>
<b>MPV</b>	7,7	8,9
<b>NE%</b>	47,6	44,7
<b>LY%</b>	34,6	36,9
<b>MO%</b>	10,4	11,6
<b>EO%</b>	6	6,2
<b>BA%</b>	1,4	0,6

Je nezbytné, aby byl tento vzorek bez antikoagulačních aditiv odebrán a poté okamžitě změřen hematologickým analyzátozem. Jen tak je možno dosáhnout výsledku, aniž by došlo ke sražení odebrané krve.

### **10.5 Srovnání manuálního a automatického stanovení počtu krevních destiček**

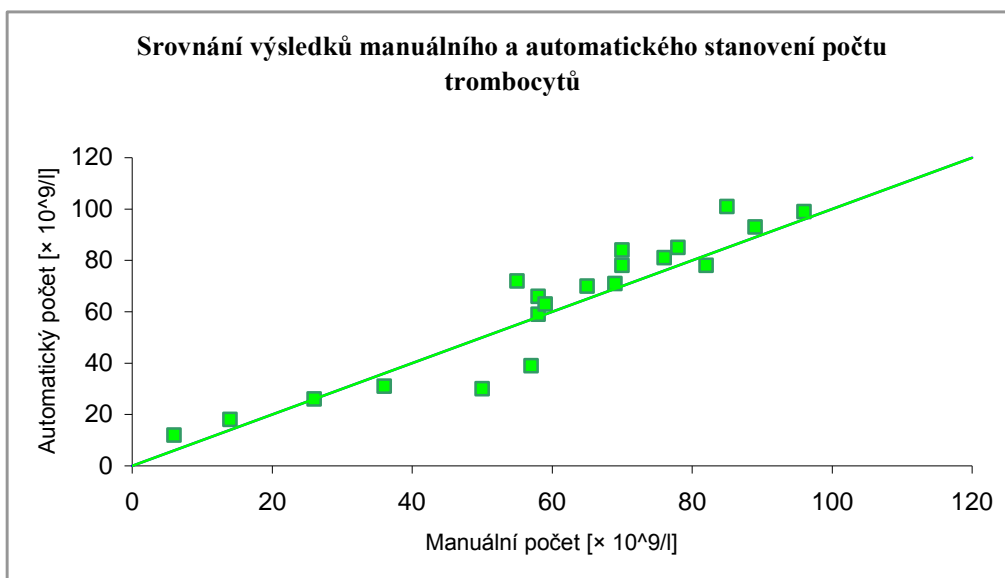
Výsledky destičkových počtů byly stanoveny u 20 různých vzorků. Každý vzorek byl změřen jak manuálně mikroskopem, tak také hematologickým analyzátozem. Výsledky jsou uvedeny v tab. 6. Vzájemný vztah těchto dvou metod vystihuje přiložený graf (obr. 3).



**Tab. 6** Výsledky srovnání dvou metod stanovení počtu trombocytů

Číslo vzorku	Mikroskop [ $\times 10^9/l$ ]	Analyzátor [ $\times 10^9/l$ ]	Rozdíl [ $\times 10^9/l$ ]	Rozdíl [%]
1	70	84	+14	+16,67
2	58	59	+1	+1,69
3	55	72	+17	+23,61
4	58	66	+8	+12,12
5	57	39	-18	-46,15
6	69	71	+2	+2,82
7	59	63	+4	+6,35
8	89	93	+4	+4,30
9	78	85	+7	+8,24
10	76	81	+5	+6,17
11	70	78	+8	+10,26
12	14	18	+4	+22,22
13	65	70	+5	+7,14
14	26	26	0	0
15	82	78	-4	-5,13
16	6	12	+6	+50
17	96	99	+3	+3,03
18	50	30	-20	-66,67
19	85	101	+16	+15,84
20	36	31	-5	-16,13

Průměrný počet stanovený mikroskopem je  $59,95 \cdot 10^9/l$ , hodnoty se pohybují v rozmezí od  $6-96 \cdot 10^9/l$ . Hodnoty hematologického analyzátoru se nachází v rozmezí  $12-101 \cdot 10^9/l$ . Průměrná hodnota zde činí  $62,8 \cdot 10^9/l$ .



**Obr. 3** Srovnání manuálních a automatických počtů trombocytů

Pokud by se jednalo o ideální stav, kdy obě metody stanovení počtu krevních destiček poskytují shodné výsledky, ležely by všechny body na přímce, která pólí úhel mezi osami. V tomto případě se potvrzuje rozdílná přesnost (CV) metody manuálního a automatického stanovení počtu krevních destiček – body jsou různě rozptýleny kolem přímky. Mírou tohoto rozptylu je tzv. korelační koeficient, který nabývá hodnotu  $r = 0,94$ .

## **11 Diskuze**

Cílem práce bylo představit metody stanovení destičkového počtu a ukázat jejich využitelnost v dnešní klinické praxi. Navzdory negativním faktorům, které mnohdy komplikovaly práci a tedy i znemožnily přesnou interpretaci některých naměřených výsledků, tato práce bezesporu vystihuje podstatu procesu stanovení destičkového počtu. Těmito faktory myslím především chyby při preanalytické a analytické fázi vyšetření vzorku (tzn. odběr, transport a uchování vzorku, teplota prostředí, časová prodleva od odběru po zpracování vzorku, použité chemikálie, nastavení a stav přístroje atd.). Samozřejmě je vždy snaha těmto chybám předcházet (např. přístrojové chyby - kontrola kvality měření přístroje a jeho validace) a získávat tak jen správné výsledky. Bohužel není ještě v lidských silách všechny tyto problémy, které výsledek zkreslují či dokonce znemožňují jeho stanovení, odstranit.

Všechna data byla naměřena na OKH Nemocnice České Budějovice a to v období 2007/2008. V případě stanovení automatického počtu hematologického analyzátoru byl použit přístroj firmy Beckman Coulter LH 755 pracující na principu elektrické impedance. Druhou použitou metodou byla metoda manuálního stanovení pomocí mikroskopu. Vzorky byly nabírány standardním postupem do antikoagulačního činidla, kterým bylo EDTA či citrát.

Výsledky krevních obrazů mají jasnou vypovídající hodnotu. Vypočtené procentuelní zastoupení jednotlivých počtů pacientů v daných rozmezech bylo očekávané a nepřineslo žádné výrazné změny v porovnání s minulými měřeními. Z 9034 pacientů bylo celých 83,62 % pacientů v normě, mimo normu se nalézalo 16,38 % pacientů. Zjištěných 0,15 % (tedy asi 14 vzorků z celkového počtu 9080) nemohlo být změřeno a započteno do výsledku kvůli předčasnému sražení krve ve zkumavce a vypovídá tedy již o zmiňovaných chybách v preanalytické fázi laboratorního vyšetření, popř. EDTA syndromu. Toto procento se sice jeví jako zanedbatelné vůči celkovému počtu krevních obrazů, nicméně těchto 14 vzorků znamená v praxi potřebu nového odběru a s tím související okolnosti (další práce pro lékaře a zdravotní sestry, spotřeba více zdravotnického materiálu, opětovné vystavení pacienta odběru a tedy i stresu pro organismus atd.). V případě, že chyby nastanou u vzorků, kde je hladina krevních destiček velmi nízká či naopak vysoká, je situace mnohem závažnější. Zde si již člověk plně uvědomí skutečnost, že i chyby

u minimálního počtu vzorků, které nemohly být změřeny z důvodu špatného laboratorního vyšetření, mohou mít katastrofální následky. Vybraný soubor krevních obrazů obsahoval 1,9 % pacientů s koncentrací krevních destiček pod  $50 \cdot 10^9/l$ , kdy již hrozí spontánní krvácení. Naopak 0,5 % pacientů mělo koncentraci krevních destiček nad kritickou hodnotou  $800 \cdot 10^9/l$  s vysokým rizikem trombózy.

Otázka vlivu antikoagulantu na výsledek hematologického analyzátoru je velice diskutabilní. Výsledky, které jsem zjistil a uvedl v tabulce 2, potvrzují přítomnost EDTA syndromu a tedy i falešně sníženého počtu trombocytů stanoveného přístrojem. Byly zjištěny tři zjevné příklady pseudotrombocytopenie. V jednom případě byl naopak počet trombocytů měřených v citrátu výrazně nižší. Zde předpokládám, že pravděpodobně došlo ke sražení vzorku z důvodu chyby v preanalytické fázi vyšetření. V porovnání s odbornou literaturou je frekvence výskytu mnou stanovené EDTA-dependentní pseudotrombocytopenie zhruba o řád nižší (tedy asi 0,01 %). Možnou odpovědí, proč je frekvence tohoto EDTA fenoménu v naší populaci pacientů o tolik nižší, je skutečnost, že literatura uvádí frekvenci EDTA syndromu v obecné populaci. Při mém pokusu zjistit, zda existuje hodnota této frekvence stanovená konkrétně pro populaci České Republiky, nebyla nalezena žádná studie, která by tuto hodnotu pro naši populaci stanovila. Proto zde existuje možnost odchylky od obecného standardu. Je však důležité podotknout, že faktory jako věk, pohlaví či typ krevní skupiny pacienta nemají podle studií vliv na výskyt EDTA syndromu. Daleko pravděpodobnějším vysvětlením tohoto výsledku je vliv rychlosti zpracování krve (tedy časová prodleva), koncentrace antikoagulantu EDTA a teploty prostředí. Bylo zjištěno, že s rostoucím časem dochází ke zvýšené tvorbě shluků. Vhodnou teplotou pro vznik shluků je navíc teplota pod  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pokud opominu možnost chybné koncentrace EDTA v odběrové zkumavce (nízká pravděpodobnost) a variantu špatného náběru (malý objem nabrané krve), pak hlavním důvodem nízkého výskytu EDTA-dependentní pseudotrombocytopenie je skutečnost, že vzorky jsou na OKH velmi rychle zpracovány (do 1 hod od odběru) a tedy nestačí dojít u některých vzorků k aglutinaci na základě EDTA syndromu.

Použití citrátu odhalilo tyto falešně snížené počty trombocytů a mohu tedy potvrdit význam tohoto postupu, který nejen eliminuje EDTA syndrom, ale i některé technické chyby náběru. Nicméně se ukázalo, že citrát některé výsledky mírně podhodnocuje, což samozřejmě z hlediska přesnosti výsledku je chybou. Přesto se tento postup na

oddělení osvědčil a z hlediska klinické praxe je využíván, neboť jistě přináší více pozitiv než negativ (dražší náklady či špatné stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů).

Pokus o změření krevního vzorku nabraného do zkumavky bez antikoagulačního činidla dopadl velice dobře. Všechny parametry krevního obrazu byly stanoveny. Následná kontrola vzorku nabraného do EDTA potvrdila relativní správnost výsledku. Podmínkou bylo okamžité měření vzorku hematologickým analyzátozem, aby nedošlo ke sražení krve. Zde je nutné poznamenat riziko poškození přístroje v případě sražení krve uvnitř přístroje.

Cílem testu reprodukovatelnosti bylo zkontrolovat, zda přístroj užívaný oddělením poskytuje opakovaně přesné výsledky počtu trombocytů měřených v EDTA i citrátu. Tyto kontroly se provádí pravidelně v rámci kontroly kvality měření hematologického analyzátozem. Z naměřených hodnot jsem spočítal variační koeficienty, které nabývaly hodnot 1,4 % pro EDTA a 2,6 % pro citrát. Obě tyto hodnoty jsem porovnal s limitem CV 3,2 %, který nesmí být překročen, a shledal výsledek, že hematologický analyzátozem je správně nastaven a stanovuje destičkový počet relativně přesně. Z grafu je možné porovnat i ostatní CV měřených parametrů krevního obrazu a jejich limity. Vypočtené variační koeficienty počtu trombocytů i některých jiných parametrů byly nižší u vzorků stanovených v EDTA. To říká, že přístroj stanovuje přesněji vzorky nabrané do tohoto antikoagulantu. Je to dáno především tím, že EDTA je nejpoužívanějším typem antikoagulantu pro řadu svých výhodných vlastností a výrobci analyzátozemů tedy doporučují jeho používání. Proto není ani překvapením, že výsledky jsou obecně přesnější. Nicméně bylo již řečeno a dokázáno, že i EDTA má své chyby (EDTA fenomén), které lze odstranit jen volbou jiného typu antikogulantu.

Pokud je srovnávána metoda manuálního stanovení počtu trombocytů mikroskopem a metoda stanovení hematologickým analyzátozem, vycházím z postupu dříve prováděného na oddělení. Jestliže se počet trombocytů stanovený analyzátozem pohybuje pod hranicí  $100 \cdot 10^9/l$ , je vzorek přeměřen manuálně mikroskopem. V případě, že je stanoven stejný počet ( $\pm 15\%$ ) i mikroskopem, je ponechán původně stanovený počet analyzátozem. V opačném případě je zapsán počet stanovený referenční metodou, tedy mikroskopem. Naměřená data ukazují, že 60 % výsledků vyšlo i po přeměření mikroskopem jako původní počet analyzátozem ( $\pm 15\%$ ). U zbylých 40 % výsledků se počet změřený mikroskopem lišil o více než daných

$\pm 15$  % oproti počtu analyzátoru. V tomto případě tedy mohu vyvodit větší přesnost metody automatického stanovení. To dokládají i literární prameny a vědecké studie, kdy CV metody manuálního stanovení mikroskopem se pohybuje v rozmezí 10-25 % (v praxi i více) (Harrison et al., 2000). Oproti tomu metoda automatického stanovení hematologickým analyzátozem je považována za mnohem spolehlivější a přesnější metodu s CV < 3 % (Bentley, Johnson & Bishop, 1993). Porovnání těchto výsledků nedokazuje takový rozdíl, což je dáno malým množstvím porovnatelných hodnot z námi vybraného období. V praxi je navíc metoda manuálního stanovení počtu trombocytů časově náročná, pro laboranta namáhavá a výsledek je ovlivnitelný samotnou osobou, která počet stanovuje. Přesto má tato metoda v klinické praxi své místo a nelze ji ještě plně nahradit. Metoda automatického stanovení je samozřejmě investičně mnohem náročnější, ale oproti metodě manuálního stanovení je automatická (minimální práce laboranta), rychlá (přes 100 vzorků za hodinu) a především poskytuje přesné a reprodukovatelné výsledky.

## **12 Závěr**

Postup laboratorního vyšetření počtu trombocytů je nastaven na OKH Nemocnice České Budějovice poměrně vhodným způsobem, který poskytuje dobré výsledky. Ty jsou dosaženy optimálním sledem měření, kdy je nejprve automaticky stanoven vzorek nabraný do antikoagulantu EDTA. U zjištěných trombocytopenických vzorků následuje automatické stanovení z citrátu s cílem eliminovat pseudotrombocytopenie, tedy falešně snížené počty trombocytů. Tento doporučený postup doplňuje v případě nutnosti přímý náběr z prstu pacienta a jeho přeměření referenční metodou pomocí mikroskopu. Na základě dat jsem ověřil, že tento zavedený postup (EDTA-citrát-prst) funguje, přestože zjištěných rozdílů v naměřených hodnotách bylo málo. Mezi hlavní výhody tohoto postupu patří především rychlost (oproti mikroskopu - trvá asi 2 hod.), menší náročnost a hlavně vyšší přesnost vyšetření počtu trombocytů. Jediným větším rizikem je skutečnost, že se jedná o málo prověřený postup, který ještě vyžaduje průběžné laboratorní sledování a následné vyhodnocování změřených výsledků.

Potvrdil jsem rovněž vliv antikoagulantu na výsledný počet hematologického analyzátoru a možnost získávat správný počet krevních destiček hematologickým analyzátozem bez použití antikoagulačního činidla.

### 13 Seznam citované literatury

Bentley S. A., Johnson A., Bishop C. A. (1993) A parallel evaluation of four automated haematology analysers. *American Journal of Clinical Pathology* 100, 626-632.

Bourková L., Matýšková M., Kratochvílová J. (2004) Kontrola kvality měření krevních obrazů na hematologických analyzátoch. Česká hematologická společnost.

Bowles K. M., Cooke L. J., Richards E. M., Baglin T. (2005) Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia. *Clinical and Laboratory Haematology* 27, 370-373.

Brecher G., Schneiderman M., Cronkite E. P. (1953) The reproducibility of the platelet count. *American Journal of Clinical Pathology* 23, 15-21 (cit. podle Briggs et al., 2007).

Brewer D. B. (2006) Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *British Journal of Haematology* 133, 251-258.

Briggs C., Harrison P., Grant D., Staves J., Machin S. J. (2000) New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter - XE 2100. *Clinical and Laboratory Haematology* 17, 163-172.

Briggs C., Kunka S., Machin S. J. (2004) The most accurate platelet count on the Sysmex XE-2100. Optical or impedance? *Clinical Laboratory Hematology* 26, 157-158.

Briggs C., Harrison P., Machin S. J. (2007) Continuing developments with the automated platelet count. *International Journal of Laboratory Hematology* 29, 77-91.

Brittin G. M., Dew S. A., Fewell E. K. (1971) Automated optical counting of blood platelets. *Blood* 38, 422-430.

Dalamangas L. C., Slaughter T. F. (1998) Ethylenediaminetetraacetic Acid-Dependent Pseudothrombocytopenia in a Cardiac Surgical Patient. *Anesth Analg* 86, 1210-1211.

Davis R. E., Green R. E. (1967) Automatic platelet counting with the Coulter particle counter. *Journal of Clinical Pathology* 20, 777-779.

Dickerhoff R., von Ruecker A. (1995) Enumeration of platelets by multiparameter flow cytometry using platelet-specific antibodies and fluorescent reference particles. *Clinical and Laboratory Haematology* 17, 163-172.

Eggleton M. J., Sharp A. A. (1963) Platelet counting using the Coulter electronic counter. *Journal of Clinical Pathology* 16, 164-167.

Harrison P., Horton A., Grant D., Briggs C., Machin S. J. (2000) Immunoplatelet

counting: a proposed new reference procedure. *British Journal of Haematology* 108, 228-235.

Hoblová J. (2006) Krevní obraz - minulost a současnost vyšetření. *Florence* 9.

Hochová I. (2008) Laboratorní příručka. OKH FN Motol, 37 str.

ICSH (1998) Recommended methods for the visual determination of white cell and platelet counts. WHO LAB 88, 3.

Kružík P., Vlček R., Moos J. (2006) Analyzátoři buněk a částic. *In vitro diagnostika* 3, 4-5.

Kunicka J. E., Fischer G., Murphy J., Zelmanovic D. (2000) Improved platelet counting using two-dimensional laser light scatter. *American Journal of Clinical Pathology* 114, 283-289.

Kunz D., Kunz W. S., Scott C. S., Gressner A. M. (2001) Automated CD61 Immunoplatelet analysis of thrombocytopenic samples. *British Journal of Haematology* 112, 584-592.

Martin J. F., Bath P. M., Burr M. L. (1991) Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction. *Lancet* 338, 1409-1411.

Matýšková M., Bourková L., Hoblová J. (2005) Zajištění spolehlivosti vyšetření krevních obrazů. *Vnitřní lékařství* 51 (7&8), 894-899.

Patterson K. (1997) Platelet parameters generated by automated blood counters. *CME Bulletin Haematology* 1, 13-16.

Pegels J. G., Bruynes E. C., Engelfriet C. P., von dem Borne A. E. (1982) Pseudothrombocytopenia: an immunologic study on platelet antibodies dependent on ethylene diamine tetra-acetate. *Blood* 59, 157-161.

Racek et al. (1999) *Klinická biochemie*. Galén, Karolinum, Praha.

Rowan R. M., Allan W., Prescott R. J. (1972) Evaluation of an automatic platelet counting system utilizing whole blood. *Journal of Clinical Pathology* 25, 218- 226.

Sakalová A., Lipšič T. (1995) *Hematológia a transfuziologie*, Osveta, Martin.

Schwarz J., Penka M. (2005) Trombocytózy a trombocytémie. *Vnitřní lékařství* 51 (7&8), 861-872.

#### 14 Internetové zdroje:

- Společnost **SEKK**: [www.sekk.cz](http://www.sekk.cz), společnost **Abaxis**: [www.abaxis.com](http://www.abaxis.com)
- Společnost **Beckman Coulter**: [www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)
- Společnost **Sysmex**: [www.sysmex.de](http://www.sysmex.de), [www.sysmex.co.jp](http://www.sysmex.co.jp)



## 15 Příloha

- a) Objevitelé krevních destiček: Max Schultze, Giulio Bizzozero
- b) Objevitelé Coulter principu: Wallace H. a Joseph R. Coulter
- c) Tabulka: Hodnoty spárovaných vzorků nabraných a změřených ve dvou různých antikoagulačních činidlech (EDTA, citrát) za období 1. 9. - 31. 12. 2007

### a) Max Schultze (1825-1874)

- Lékař, cytolog, univerzitní profesor anatomie a histologie
- Narozen: Freiburg, Breisgau
- Studium: lékařství v Greifswaldu a Berlíně
- Zaměstnání: ředitel Anatomical Institute v Bonnu, univerzitní profesor anatomie a histologie (Halle, Bonn)
- Zakladatel časopisu Archiv für mikroskopische Anatomie (dnes Cell and Tissue Research)
- Autor první zmínky o krevních destičkách v jeho studii o bílých krvinkách



### Giulio Bizzozero (1846-1901)

- Lékař, univerzitní profesor, vědec
- Narozen: Varese, Itálie
- Studium: lékařství (University of Pavia)
- Zaměstnání: univerzitní profesor (Pavia, Turín), zakladatel Institute of General Pathology v Turíně
- Průkopník lékařské mikroskopie a histografie
- Objevitel bakterie Helicobacter pylori a krevních destiček (popsal i jejich funkci v organismu)
- Ve své době spolupracoval se známými jmény jako C. Golgi, E. Bassini, A. Carle či C. Forlanini



**b) Wallace H. Coulter (1913-1998)**

- Spoluzakladatel, předseda a prezident Coulter Corporation
- Znám jako objevitel Coulter principu
- Narozen: Little Rock, Arkansas
- Studium: střední škola v Munroe, Westminster University ve Fultonu, Missouri, Georgia Institut of Technology (elektroinženýrství)
- Zaměstnání: technik - hlasatel v rádiové stanici, poté ve společnostech - General Electric X-Ray, Press Wireless, Raytheon Manufacturing Company, Illinois Tool Works, Mittelman Electronics Division of Century Steel
- V r. 1958 - vznik Coulter Electronics, Inc. (společně s bratrem)
- V r. 1997 - dochází k získání Coulter Corporation firmou Beckman Instruments, Inc. (dnes známa jako Beckman Coulter, Inc., ústředí společnosti ve Fullertonu v Kalifornii)



**Joseph R. Coulter (1924-1995)**

- Spoluzakladatel Coulter Corporation, elektroinženýr, vynálezce
- Syn železničního dispečera a telegrafa
- Narozen: Poplar Bluff, Missouri
- Studium: elektroinženýrství
- Za války - rádiový operátor U.S. Signal Corps
- Zaměstnání: Illinois Institute of Technology, Motorola Corporation
- V r. 1958 - vznik Coulter Electronics, Inc (společně s bratrem)
- Zájmy: vývoj částicových analyzátorů, design produktů, výzkum rakoviny a AIDS (založení Coulter Pharmaceutical, Inc.)



- c) Tab.** Hodnoty spárovaných vzorků nabraných a změřených ve dvou různých antikoagulačních činidlech (EDTA, citrát)

*Poznámka: Citrát\* - hodnota počtu destiček změřená v citrátu a zvýšena o 10 % z důvodu ředění.*

Měsíc	Vzorek	EDTA	Citrát	Citrát*	Měsíc	Vzorek	EDTA	Citrát	Citrát*
1. 9.	1	160	144	158	-	45	93	66	73
-	2	96	250	275	-	46	263	230	253
-	3	114	98	108	1. 11.	47	19	11	12
-	4	65	65	72	-	48	11	9	10
-	5	273	54	59	-	49	94	73	80
1. 10.	6	90	82	90	-	50	89	73	80
-	7	18	14	15	-	51	94	77	85
-	8	78	67	74	-	52	15	12	13
-	9	85	77	85	-	53	85	79	87
-	10	93	82	90	-	54	79	68	75
-	11	81	64	70	-	55	sraženo	280	308
-	12	74	56	62	-	56	81	72	79
-	13	71	48	53	-	57	60	47	52
-	14	20	12	13	-	58	56	49	54
-	15	39	31	34	-	59	62	57	63
-	16	252	268	295	-	60	sraženo	172	189
-	17	66	57	63	-	61	83	77	85
-	18	74	52	57	-	62	33	26	29
-	19	77	75	83	-	63	26	24	26
-	20	45	53	58	-	64	14	9	10
-	21	86	74	81	-	65	94	75	83
-	22	55	45	50	-	66	92	75	83
-	23	104	90	99	-	67	90	69	76
-	24	68	62	68	-	68	92	68	75
-	25	57	48	53	-	69	77	71	78
-	26	67	64	70	-	70	91	82	90
-	27	92	74	81	-	71	91	70	77
-	28	63	46	51	-	72	85	59	65
-	29	90	83	91	-	73	21	19	21
-	30	88	60	66	-	74	61	44	48
-	31	70	53	58	-	75	5	5	6
-	32	3	4	4	-	76	35	21	23
-	33	69	55	61	-	77	117	96	106
-	34	92	75	83	-	78	22	16	18
-	35	93	80	88	-	79	394	365	402
-	36	171	198	218	-	80	85	81	89
-	37	44	45	50	-	81	60	42	46
-	38	31	23	25	-	82	450	334	367
-	39	81	66	73	-	83	72	63	69
-	40	89	67	74	-	84	118	63	69
-	41	85	71	78	-	85	47	33	36
-	42	83	50	55	-	86	17	14	15
-	43	3	4	4	-	87	133	178	196
-	44	94	62	68	-	88	80	71	78

Měsíc	Vzorek	EDTA	Citrát	Citrát*	Měsíc	Vzorek	EDTA	Citrát	Citrát*
-	<b>89</b>	2	2	2	-	<b>109</b>	51	36	40
-	<b>90</b>	37	26	29	-	<b>110</b>	83	63	69
-	<b>91</b>	43	36	40	-	<b>111</b>	92	116	128
1. 12.	<b>92</b>	55	49	54	-	<b>112</b>	15	10	11
-	<b>93</b>	79	66	73	-	<b>113</b>	90	52	57
-	<b>94</b>	61	52	57	-	<b>114</b>	72	59	65
-	<b>95</b>	190	158	174	-	<b>115</b>	52	45	50
-	<b>96</b>	70	57	63	-	<b>116</b>	77	71	78
-	<b>97</b>	63	50	55	-	<b>117</b>	80	74	81
-	<b>98</b>	84	63	69	-	<b>118</b>	71	64	70
-	<b>99</b>	46	54	59	-	<b>119</b>	89	72	79
-	<b>100</b>	86	61	67	-	<b>120</b>	57	55	61
-	<b>101</b>	293	227	250	-	<b>121</b>	94	79	87
-	<b>102</b>	95	70	77	-	<b>122</b>	76	64	70
-	<b>103</b>	92	87	96	-	<b>123</b>	<b>18</b>	<b>286</b>	<b>315</b>
-	<b>104</b>	4	5	6	-	<b>124</b>	47	61	67
-	<b>105</b>	104	76	84	-	<b>125</b>	<b>14</b>	<b>290</b>	<b>319</b>
-	<b>106</b>	87	70	77	-	<b>126</b>	70	63	69
-	<b>107</b>	92	76	84	-				
-	<b>108</b>	89	72	79	-				