

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Porovnání mikroskopických a přístrojových výsledků
jednotlivých typů krvinek se zaměřením na
trombocyty**

Bakalářská práce

Autor práce: Michaela Drábová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Ivan Vonke, MBA

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2013

Abstrakt

Cílem mé práce je stanovení počtu krevních destiček více metodami. Dále určení příčiny zjištěných rozdílů v počtu trombocytů. A posledním cílem je určení algoritmu pro jejich spolehlivé počítání.

Moje hypotéza je zaměřena na specifické situace, ve kterých může být přístrojové stanovení hladin trombocytů výrazně odlišné od skutečnosti. Pro získání jejich skutečného počtu je nutné užití alternativní metody. Za alternativní metodu je považováno mikroskopické stanovení nebo stanovení počtu trombocytů z citrátu sodného.

Hypotéza I. Použitím alternativních metod dostaneme u části populace jiné výsledky.

Hypotéza II. Tyto alternativní metody nám pomáhají pro rozlišení pravé a falešné trombocytopenie.

Teoretická část bakalářské práce se zabývá tvorbou, strukturou, fyziologií, funkcí, metabolismem a charakteristikami krevní destičky. Je definován pojem trombocytopenie. Je zmíněna kontrola kvality laboratorních analýz. Jsou popisovány různé protisrážlivé přípravky používané v hematologii. Dále techniky, kterými se počet trombocytů dá stanovit a také interference spojené s měřením krevních buněk.

Praktická část zahrnuje zpracování biologického materiálu ve vakuetě s fialovým uzávěrem, kde se nachází antikoagulant EDTA (pro rutinní stanovení celého krevního obrazu) a zároveň ve vakuetě s modrým uzávěrem, kde se nachází antikoagulant citrát sodný (pro opakované stanovení pouze počtu trombocytů).

Analýza tohoto biologického materiálu byla provedena pomocí analyzátoru Coulter LH 750, společnosti Beckman Coulter. Metodou Coulter se zjistí velikost krevních buněk díky změnám elektrického odporu.

Zpracování biologického materiálu manuálně bylo provedeno pomocí světelného mikroskopu společnosti Carl Zeiss, jehož celkové zvětšení, které stačí na pozorování trombocytů, je 400násobné. Počet trombocytů se hodnotí v Bürkerově komůrce, ve 20 obdélnících. Pro jejich stabilizaci a zvýraznění se používá roztoku prokainu.

Na oddělení klinické hematologie, Nemocnice České Budějovice a.s., jsem v období 23. dubna – 22. května 2012 zjišťovala počet trombocytů ve dvou různých antikoagulanciích, s použitím rozdílných technik měření. Toto porovnání je důležité, protože pokud by byl rozdíl v počtu trombocytů zjištěných z antikoagulancia EDTA v porovnání s citrátem sodným vyšší než 20 %, mohlo by se jednat o vzorky s podezřením na pseudotrombocytopenii.

Vlastní měření zahrnovalo padesát vzorků, které byly vybírány již s určitým podezřením podle následujících kritérií: počty trombocytů musely klesnout pod hranici $100 \times 10^9/l$ a zároveň jsme museli obdržet hlášení analyzátoru o přítomnosti shluků.

Naměřené hodnoty trombocytů byly statisticky zpracovány a jsou v mé bakalářské práci zobrazeny v příslušných tabulkách a grafech. Pro lepší představu jsou zde také obrázky a to především histogramy, vypovídající o určitých změnách v počtu a objemu krevních buněk.

Tento výzkum prokázal výskyt jevu PTCP v 0,052 % případů. Rozdíl mezi užitými technikami byl jasně patrný, mikroskopie nedosáhne takových přesných výsledků jako analyzátor. Množství vzorků a rychlost jejich provedení se nedá porovnávat.

Mikroskopie nám v dnešní době slouží spíše jako pomocná technika v těch případech, kdy je přístroj nedokonalostmi (např. tvorbou shluků) ovlivněn natolik, že vydává falešné počty trombocytů. Nevýhodou je však časová prodleva od odběru do možného počítání.

Alternativními metodami dosáhneme případného ověření či upravení (např. opakovaný odběr do jiného antikoagulancia) prvotních výsledků.

Abstract

The aim of my thesis is to determine the number of platelets with different methods; then to determine the cause of the measured differences in the number of platelets, followed by determination of algorithm for reliable counting of platelets.

In specific situations, the instrument determination of the levels of platelets may be significantly different from the real situation. The actual number of platelets can be obtained by using alternative methods. Microscopic assessment and determination of the number of platelets in sodium citrate are considered as alternative methods.

Hypothesis I. When using alternative methods, different results are obtained in part of the population.

Hypothesis II. These alternative methods help us to distinguish between true and false thrombocytopenia.

The theoretical part deals with the formation, structure, physiology, function, metabolism and characteristics of platelets. The term of thrombocytopenia is defined. Quality control of laboratory analyzes is mentioned. Different anticoagulant products used in hematology are described. There are also described techniques by which platelets can be determined and interference associated with the measurement of blood cells.

The practical part includes the processing of biological material in a test-tube with the purple cap containing anticoagulant EDTA (from this test-tube a complete blood count is provided), while a test-tube with the blue cap contains anticoagulant sodium citrate (this test-tube is only for re-determination of the platelets count).

Analysis of biological material was performed by the analyzer Coulter LH 750, Beckman Coulter Inc. The Coulter method measures the size of blood cells due to changes in electrical resistance.

Manual processing of biological material was performed using a light microscope Carl Zeiss Inc., the total magnification for observation of platelets is 400 times. Number of platelets is evaluated in Bürker chamber in 20 rectangles. Solution of procaine is used to stabilize and highlight the platelets.

In the period of 23rd April – 22nd May 2012 at the department of Clinical Hematology, Nemocnice České Budějovice a.s., I examined the platelets count in two different anticoagulants by using different measurement techniques. This comparison is important because if the difference in the number of platelets found in EDTA anticoagulant compared with sodium citrate is higher than 20 %, the samples could be suspected of pseudothrombocytopenia.

The measurement included fifty samples which were selected already with some suspicion according to following two criteria: the platelets count had to fall below $100 \times 10^9/l$ and at the same time we had received analyzer report of the presence of clumps.

The measured values of platelets were statistically processed and they are shown in charts and graphs in my thesis. For a better idea there are also pictures – especially histograms showing some changes in the number and volume of blood cells.

This research has demonstrated the occurrence of the phenomenon PTCP in 0,052% cases. The difference between the techniques was clearly evident. Microscopy does not reach such accurate results as analyzers. Quantity of samples and speed of implementation can not be compared.

Nowadays microscopy is used as an auxiliary technique in those cases where the analyzer is too affected by imperfections (for example formation of clumps) that it gives false platelets count. The disadvantage is the time delay from the sampling to the possibility of counting.

By alternative methods we reach eventual verification or modification of first results (for example repeated sampling to another anticoagulant).

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2013

.....

Michaela Drábová

Poděkování

Mé poděkování patří především mému školiteli MUDr. Ivanu Vonkemu za jeho cenné rady a připomínky k psaní této práce. A samozřejmě také laborantkám z oddělení klinické hematologie, Nemocnice České Budějovice a.s., za jejich ochotu a spolupráci.

Obsah

1 ÚVOD.....	10
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1 Tvorba a vývoj krevních destiček - megakaryopoéza	11
2.2 Tvorba a vývoj krevních destiček - trombopoéza	11
2.2.1 Regulace trombopoézy	12
2.3 Struktura krevní destičky	12
2.4 Fyziologie a funkce krevních destiček	14
2.4.1 Morfologické projevy aktivace krevní destičky	15
2.4.2 Glykoproteinový komplex Iib/IIIa	17
2.4.3 Funkce krevní destičky v organismu.....	18
2.5 Metabolismus krevní destičky.....	18
2.6 Charakteristiky krevní destičky.....	19
2.7 Trombocytopenie.....	20
2.8 Kontrola kvality laboratorních analýz	20
3 METODY STANOVENÍ POČTU KREVNÍCH BUNĚK.....	22
3.1 Mikroskopické počítání krevních destiček	22
3.2 Počítání krevních částic na analyzátorech	23
3.2.1 Impedanční princip stanovení počtu krevních buněk	24
3.2.2 Optická metoda stanovení počtu krevních buněk	26
3.2.3 Imunologické stanovení počtu krevních buněk	27
3.3 Interference spojené s měřením na analyzátorech krevních buněk	27

3.3.1 Interference při stanovení počtu trombocytů.....	28
4 METODIKA	30
4.1 Cíle práce a hypotézy.....	30
4.2 Biologický materiál v hematologické laboratoři.....	31
4.2 Zpracování krevního vzorku	31
5 VÝSLEDKY	34
5.1 Výsledky stanovení celého souboru KO.....	34
5.2 Výsledky stanovení vybraného souboru vzorků	36
5.3 Histogram a parametry krevní destičky (EDTA versus citrát)	42
5.3.1 Interference v histogramu PLT	42
5.3.2 Srovnání histogramů PLT a WBC u vzorku číslo 36.....	44
5.3.3 Parametry krevní destičky u vzorku číslo 36.....	45
6 DISKUSE.....	46
7 ZÁVĚR.....	49
8 POUŽITÁ LITERATURA	50
9 PŘÍLOHA	55

1 Úvod

Rozšířené používání hematologických analyzátorů vedlo k podstatnému zlepšení buněčné hematologie. Rychlé a přesné výsledky jsou pravidlem u normálních i abnormálních vzorků. Nicméně v několika případech, například při patologii nebo při změnách vyvolanými po odběru vzorku, může hematologický analyzátor vygenerovat nesprávný výsledek pro jeden či více parametrů v počtu krvinek. Na konci 60. let se tak hematologické analyzátory nahrazovaly ručními technikami. V 80. letech došlo ale k zdokonalení přístrojového hardwaru a softwaru, což vedlo k vyššímu stupni kvality analýzy abnormálních výsledků (*Zandecki et al., 2007*).

Nejčastěji se vyskytující anomálií, která je spojena s falešnými počty na hematologickém analyzátoru, je EDTA-dependentní pseudotrombocytopenie (EDP). Pseudotrombocytopenie (PTCP) je falešně nízký počet krevních destiček stanovený *in vitro*, který neodpovídá skutečnému počtu destiček cirkulujících v krvi. Příčinou je shlukování destiček v odběrové zkumavce díky protilátkám závislým na ethylendiamintetraoctové kyselině (EDTA) nebo díky nedostatečné antikoagulaci. Hematologické analyzátory nemusejí takto vzniklé shluky destiček rozpoznat, u některých vzorků zařazují jednotlivé shluky mezi červené krvinky nebo leukocyty a vydávají výsledek s falešně nízkým počtem trombocytů. Moderní analyzátory na přítomnost shluků destiček upozorňují. V klinické praxi lze na pseudotrombocytopenii usuzovat v situacích, kdy klinický obraz neodpovídá výsledku vyšetření počtu destiček (*Gumulec a kol., 2010*).

2 Literární přehled

2.1 Tvorba a vývoj krevních destiček - megakaryopoéza

Megakaryocyty vznikají z pluripotentní kmenové buňky, podobně jako ostatní typy dřevných buněk. Působením řady růstových faktorů se pluripotentní kmenová buňka stává unipotentní pro megakaryocytární vývojovou řadu. Zrání megakaryocytů je stimulováno řadou faktorů. První morfologicky rozlišitelnou buňkou této řady je megakaryoblast. Je to buňka nejvýše diploidní a prochází opakovaně atypickou mitózou, při které dochází ke zmnožení jaderného materiálu (polyploidie), ne však k dělení buňky. Dále dochází ke zrání (maturaci) cytoplasmy, při které se tvoří membránové glykoproteiny, specifická granula a dochází k výrazné produkci cytoplasmatické membrány. Během zrání megakaryocytů nově vytvořená membrána ohraničuje periferní části cytoplasmy, které se uvolňují v podobě krevních destiček. Na obvodě zralých megakaryocytů se pak tvoří hnízda oddělujících se trombocytů. Megakaryocyty se již nedělí, ale jen vyžívají. Trvání celé megakaryopoézy se odhaduje na 8 - 10 dní.

2.2 Tvorba a vývoj krevních destiček - trombopoéza

Polyploidní megakaryocyty mohou tvořit krevní destičky. Ze zralého megakaryocytu se může vytvořit až několik tisíc krevních destiček (2 - 4 tisíce). K tvorbě krevních destiček dochází buď v kostní dřeni, nebo plicní tkáni. Krevní destičky mohou vznikat z megakaryocytů dvěma způsoby:

- a) Tvorbou pseudopodií a následnou fragmentací – tento proces popsal již v roce 1960 Wright
- b) Přímým rozpadem megakaryocytů

Proces tvorby destiček ze zralého megakaryocyty trvá přibližně 5 hodin. Po úplném rozpadu cytoplasmy jsou v nátěru vidět jen holá jádra megakaryocytů. Přestup krevních destiček z kostní dřeně do obvodové krve se uskutečňuje pomocí výběžků megakaryocytů, které s dozrávajícími trombocyty prorůstají mezi endotelovými buňkami do nitra cév, protékající krev z nich uvolňuje a odplavuje trombocyty. Do obvodové krve se denně vyplaví zhruba 4×10^{11} trombocytů. Krvetvorba destiček má určitou rezervu, kterou využije při vystupňovaných nárocích na jejich potřebu:

- 2/3 krevních destiček cirkuluje
- 1/3 krevních destiček je zadržována ve slezině – za některých patologických stavů může být ve slezině zadrženo až 90 % krevních destiček

2.2.1 Regulace trombopoézy

Regulace trombopoézy je humorální, podílí se na ní jak trombopoetin (TPO), tak několik dalších endogenních faktorů. Mezi cytokiny, které se podílejí na trombopoéze patří: interleukiny IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), EPO (erythropoetin), FGF (Fibroblast Growth Factor), SCF (Stem Cell Factor), LIF (Leukemia Inhibitory Factor). Stimulem k tvorbě trombocytů je pokles jejich celkového počtu (*Pecka, 2002*).

2.3 Struktura krevní destičky

Membrána trombocytů obsahuje řadu receptorů schopných reagovat na celou řadu podnětů a je zde přítomno značné množství antigenu krevních skupinových systémů. V elektronovém mikroskopu lze v krevní destičce rozlišit některé mikrostruktury:

1. v cytoplasmě se nacházejí dva druhy velkých granul:
 - α -granula – světlá
 - granula o velké denzitě (hustotě) – tmavá

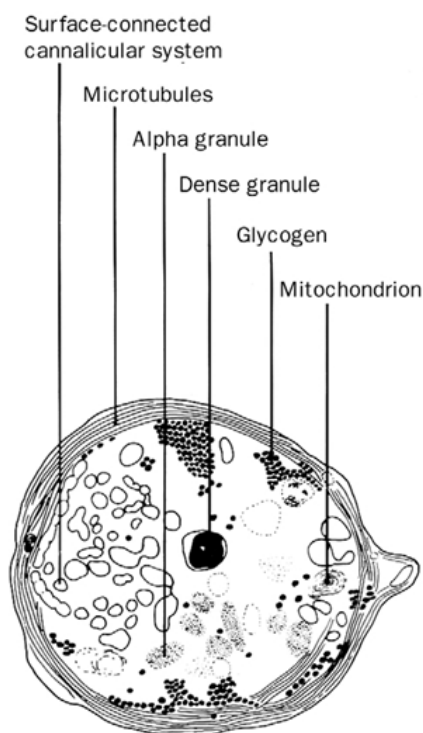
V granulích uskladňují trombocyty četné látky jako ADP (adenosindifosfát), ATP (adenosintrifosfát), serotonin, tromboglobulin, destičkový faktor 4 aj., které uvolňují do prostředí nebo na svůj povrch, jakmile se zapojí do hemostázy.

2. mitochondrie, ve kterých probíhají základní metabolické pochody. Výsledkem těchto pochodů je uvolnění energie pro činnost buňky.

3. glykogen, který je potřebný pro energetický metabolismus krevní destičky

4. kontraktilní (smršťovací) systém, který je zodpovědný za změnu tvaru destičky při jejím přilnutí k poškozenému cévnímu endotelu a při vypuzování obsahu granul, také tvoří mikrotubuly a hutný tubulární systém. Tento systém tvoří kontraktilní bílkovina podobná svalovému aktomyozinu – trombostenin.

5. otevřený kanálkový systém, který se skládá z početných vychlípení destičkové membrány, které zasahují do nitra buňky. Tento kanálkový systém urychluje membránový transport a slouží k vyplavení obsahu granul na povrch buňky (*Hrubíško a kol., 1983*).



Obr. 1 Struktura krevní destičky

2.4 Fyziologie a funkce krevních destiček

Krevní destičky jsou nejmenší částice v krvi. Jedná se o buněčné fragmenty. Cirkulující krevní destičky volně unášeny krevním proudem mají oválný, diskoidní tvar, tzv. klidový tvar. Jakmile se dostanou do kontaktu s nefyziologickým nebo cizím povrchem, mění svůj tvar na kulovitý s výběžky (pseudopodie) tzv. vydrážděná forma (*Hrubíško a kol., 1983*). V nativním nátěru se jeví jako silně světlolomná granulární bezjaderná tělíška o průměru kolem 1,5 – 3,5 μm , tloušťky 1 – 1,5 μm a objemu 8 – 12 fl. Mladší destičky jsou větší a mají lepší funkci oproti starším. Mají hutnější cytoplasmu a vyšší obsah granulí obsahujících serotonin. Na membráně mají větší počet vazebných míst. Trombocyty přežívají v krevním oběhu zdravého člověka 8 – 14 dní. Po uvolnění z megakaryocytů podléhají procesu stárnutí. Stárnutím se snižuje denzita destičky a také klesá aktivita nitrobuněčných procesů. Zestárlé nefunkční trombocyty jsou odbourávány mononukleárním fagocytárním systémem (MFS) ve slezině, játrech a kostní dřeni.

Krevní destičky podléhají řadě interakcí a to buď s rozpustnými složkami krevní plazmy, nebo s narušeným povrchem endotelu. Výsledkem těchto interakcí může být jejich aktivace, při které se mění tvar, metabolismus i látková přeměna destičky. Krevní destičky mohou být aktivovány:

- a) Stykem se subendoteliálními strukturami (při poškození cévní stěny se obnaží kolagen pod endotelem)
- b) Některými látkami (aktivátory) vyplavenými do krevního oběhu (např. kolagen, trombin, adrenalin, ADP, serotonin aj.)

Při aktivaci krevní destičky dochází uvnitř buňky k přesunům nitrobuněčného vápníku (uvnitř buňky se zvyšuje koncentrace volných Ca^{2+}). Dochází ke změnám membránové struktury – fenomén flip-flop neboli přetočení fosfolipidové dvojvrstvy cytoplasmatické membrány krevní destičky v horizontální rovině tak, že fosfolipidy vnitřní části dvojvrstvy se dostávají do vnějších částí buněčné membrány a opačně. Dochází také k poškození membrány s následnou tvorbou membránových mikročástic (microvehicle).

2.4.1 Morfologické projevy aktivace krevní destičky

a) Změna tvaru

Aktivace trombocytů je většinou spojována se změnou tvaru krevní destičky. Změna tvaru je morfologickým projevem aktivace kontraktálního aparátu krevní destičky. Destičky vytvářejí pseudopodie a rozprostírají se po povrchu. Změna tvaru probíhá velmi rychle, 15 sekund po podnětu depolymerují mikrotubuly, které udržují diskoidní tvar, zároveň dochází k polymeraci aktinu. Následuje tvorba pseudopodií (obvykle 5 – 6 výběžků). Děj vyžaduje vydatný přísun energie (ve formě ATP) a přítomnost Ca^{2+} .

b) Adheze (přilnavost)

Adheze destiček je proces, který obnáší přilnutí destiček na jiné než destičkové povrchy. Adheze krevních destiček na subendotel poraněné cévy je komplexní proces, který vyžaduje přítomnost několika adhezivních proteinů. Adhezivita je lineárně závislá na počtu trombocytů. Uplatňuje se zde zejména von Willebrandův faktor (vWF) tzv. protikrvácivý faktor, fibronectin (přítomen v α -granulích krevních destiček), fibrinogen a částečně Ca^{2+} . Při vrozeném nedostatku vWF je adheze destiček nedostatečná, i když je jejich počet normální. Krevní destičky mohou adherovat ke kolagenním vláknům přímo pomocí receptorového komplexu glykoproteinu GP Ia/IIa. Krevní destičky po styku s kolagenními nebo subendotelovými strukturami změny během několika sekund svůj tvar a pomocí vytvořených výběžků přilnou k povrchu. Destičky se během tohoto procesu mohou zvětšit až desetinásobně. Přítomnost Mg^{2+} zvyšuje adhezi trombocytů na kolagen až 5krát.

c) Agregace (shlukování)

Agregace je vzájemné shlukování krevních destiček. Dochází k němu vlivem konformace glykoproteinové struktury GP IIb/IIIa po obsazení receptorových míst na membráně krevní destičky agonisty. Konformační změna umožní vyvázání molekuly fibrinogenu nebo vWF mezi dvěma receptory GP IIb/IIIa na dvou různých destičkách. Při agregaci vlivem některých vnějších podnětů dochází nejprve ke spojování trombocytů většinou přes receptory na jejich výběžcích. Tento děj popisujeme jako

primární agregaci. V průběhu primární agregace dochází jen k částečnému spojování trombocytů s menším počtem glykoproteinových struktur GP IIb/IIIa. Při silnějším aktivačním impulsu k sobě destičky přilnou těsněji, dochází k tzv. sekundární agregaci. Při tomto ději se obnaží větší počet glykoproteinových receptorů a dochází k řadě nevratných změn v krevní destičce (*Pecka, 2006*).

Jednotlivé agregované destičky se rozprostírají, rozplývají a postupně splývají navzájem – dochází k viskózní metamorfóze (přeměně) trombocytů – ADP se uvolňuje z poraněné tkáně nebo z hutných granul trombocytů. Toto uvolnění se děje v procesu tzv. uvolňovací reakce, uvolňují se také látky způsobující smrštění cévní stěny (vazokonstrikci), jako jsou adrenalin a serotonin. Agregace je většinou následným krokem po adhezi, ale může být vyvolána přímo působením řady induktorů (ADP, kolagen, adrenalin, trombin, serotonin, aj.) (*Hrubisko a kol., 1983*). Adrenalin vyvolává agregaci sám o sobě, je-li v dávkách, které výrazně překračují jeho fyziologickou koncentraci (*Pecka, 2006*).

Normální adhezivní a agregační schopnost krevních destiček odpovídá za vznik primární hemostatické zátky. Jen na ní se potom může vytvořit dostatečně pevná sekundární, fibrinová hemostatická zátka ve formě fibrinové sítě (= fibrinové sraženiny, koagulum). Za patologických podmínek odpovídají adhezivní a agregační vlastnosti trombocytů za vznik trombózy (*Hrubisko a kol., 1983*).

Mnohé léky ovlivňují funkci krevních destiček tak, že snižují jejich agregaci. Jsou proto užívány pro preventivní léčbu tromboembolických chorob jako antiagregační léky. Hlavním antiagregačním lékem je Acylpyrin (kyselina acetylsalicylová) (*Donner, 1985*). K agregaci, destrukci i vadné produkci destiček mohou vést virové infekty, protože megakaryocyty jsou ideálním místem pro replikaci virů (*Friedmann, 1994*).

d) Retrakce (smršťování) adherovaných a agregovaných krevních destiček

Po určité době dochází ke kontrakci destičkového trombu působením cytoskeletálního systému krevní destičky. Tím se obnovuje průchodnost poraněné cévy uzavřené primární hemostatickou zátkou. Retrakce jsou schopné jen živé a funkčně zdatné destičky, které vyžadují značný přísun energie (ve formě ATP). Při retrakci

dochází k vytlačení séra ze smršťujícího se koagula. Retrakci koagula a také kontrakci cévní stěny podporuje vazba fibrinogenu krevních destiček na destičkový aktin prostřednictvím GP IIb/IIIa (*Pecka, 2006*).

2.4.2 Glykoproteinový komplex IIb/IIIa

Vnější obal krevních destiček obsahuje GP označované podle elektroforetické pohyblivosti číslicemi I – IX a písmeny „a“ nebo „b“. GP jsou nepostradatelné pro správnou funkci destiček. Povrchové GP obsahují molekuly kyseliny sialové, která pomáhá udržovat negativní povrchový náboj. Ten zabraňuje adhezi destiček na neporušený endotel a jejich vzájemné agregaci. Intracelulární část GP je ve spojení s kontraktilním systémem (*Koubek a kol., 2009*).

GP IIb/IIIa patří mezi nejhojnější povrchové proteiny trombocytů. V klidovém stavu destičky má receptor jen velmi malou afinitu k fibrinogenu. Po aktivaci dochází ke zvýšení povrchové denzity receptorů GP IIb/IIIa – receptory jsou uvolňovány z α -granulí a denzních granulí destičky. Jakmile fibrinogen pokryje poraněné cévy, destičky k němu adherují. Na 1 destičce je kolem 40 000 vazebných míst pro fibrinogen (*Pecka, 2006*). GP IIb/IIIa je receptorem nejen pro fibrinogen, ale také pro vWF, fibronectin, vitronectin a trombospondin.

Vrozené chybění tohoto glykoproteinu má zásadní vliv na posouzení funkce destiček. Výsledkem absence GP IIb/IIIa je Glanzmannova trombastenie (*George, 2000*). Ta je charakterizovaná normálním počtem krevních destiček a jejich morfologií, prodlouženou dobou krvácivosti, sníženou nebo chybějící retrakcí koagula a abnormální agregací destiček na fyziologické podněty (*Beutler et al., 1995*). Glanzmannovu trombastenii je možné diagnostikovat imunofluorescenční metodou pomocí průtokové cytometrie, kdy je snížena exprese receptoru pro fibrinogen GP IIb/IIIa tj. CD41/CD61 (*Kubisz a kol., 2006*).

2.4.3 Funkce krevní destičky v organismu

Krevní destičky plní v organismu více úloh:

- Mají vliv na správnou funkci endotelových buněk
- Účastní se při zástavě krvácení: primární hemostatická zátka a aktivace plazmatických koagulačních faktorů
- Hrají podstatnou úlohu při chorobném uzavírání nebo ucpání cévy krevní sraženinou – trombogeneze
- Vykazují fagocytární aktivitu (*Pecka, 2006*)
- Mají antifibrinolytickou aktivitu, která brání předčasnému odbourávání fibrinového koagula, avšak obsahují i aktivátory fibrinolýzy (*Hrubiško a kol., 1983*)

2.5 Metabolismus krevní destičky

Krevní destička nemá jádro, proto nemůže syntetizovat DNA a neprobíhá v ní buněčné dělení. Jinak může vykonávat většinu buněčných funkcí. K tomu potřebuje krevní destička velké množství energie. Tuto energii získává v mitochondriích. Hlavním zdrojem energetické přeměny je glykogen, který je přítomen v krevních destičkách ve značném množství. Produkty glykolytického štěpení jsou dále oxidovány v mitochondriích za vzniku ATP. Značné množství energie je potřebné pro viskózní metamorfózu a retrakci. Jestliže obsah ATP v krevní destičce klesne pod 50 % normálního stavu, retrakce probíhá nedostatečně.

2.6 Charakteristiky krevní destičky

a) **Střední objem krevní destičky** (MPV – Mean Platelet Volume) se měří na analyzátoch krvinek, jde o přímo měřenou veličinu. MPV vyjadřuje průměrný objem buňky v hodnocených trombocytech. Histogram distribuce podle MPV reprezentuje křivku závislosti středního objemu destiček na jejich četnosti. Histogram se získává na analyzátoch krevních částic. Zjišťuje se objem trombocytů (horizontální osa) a jejich četnost (vertikální osa). Graf nás informuje o mikrotrombocytech a makrotrombocytech, nebo o přítomnosti shluků krevních destiček.

b) **Šíře distribuce destiček** (PDW – Platelet Distribution Width) jedná se o šíři nejpočetnějších populací trombocytů v jejich histogramu podle MPV. PDW reprezentuje šíři histogramu distribuce krevních destiček podle jejich objemu. Informuje nás o anizocytóze trombocytů.

c) **Destičkový hematokrit** (Pct – Plateletcrite) nás informuje o tom, jakou část objemu v celkovém objemu plazmy zaujímají destičky. Tato hodnota se získá ze vztahu:

$$\text{Pct} = \text{PLT} * \text{MPV}$$

Zvýšené hodnoty se nachází u trombocytóz a makrotrombocytů, snížené hodnoty mohou být u trombocytopenií a mikrotrombocytů (Pecka, 2006).

parametr	zkratka	fyziologické hodnoty
počet krevních destiček	PLT	140 – 440 x 10 ⁹ /l
střední objem trombocytů	MPV	7,8 – 11,5 fl
šíře distribuce destiček	PDW	15,5 – 17,1 %
destičkový hematokrit	Pct	0,15 – 0,30

Tab. 1 Fyziologické hodnoty parametrů trombocytů

2.7 Trombocytopenie

Nedostatečnost trombocytů v hemostáze může být způsobena snížením počtu - trombocytopenií, nebo jejich funkční nedostatečností – trombocytopatií. Výskyt trombocytopenií je však podstatně častější než výskyt trombocytopatií.

Trombocytopenie může být:

- Lehká, kdy se hodnoty trombocytů pohybují v rozmezí $140 - 100 \times 10^9/l$
- Středně těžká, kdy se hodnoty trombocytů pohybují v rozmezí $100 - 50 \times 10^9/l$
- Těžká, kdy se nacházejí hodnoty trombocytů pod $50 \times 10^9/l$

Krvácivé projevy se vyskytují většinou až při snížení počtu trombocytů pod $50 \times 10^9/l$ a více – jde o spontánní krvácení bez vyvolávající příčiny (*Hrubíško a kol., 1983*).

2.8 Kontrola kvality laboratorních analýz

Kontrolní procesy v laboratořích zajišťují pro měření parametry: pravdivost, preciznost (opakovatelnost a reprodukovatelnost), selektivita měřicího systému (např. rozlišení erytrocytů od trombocytů) a srovnatelnost a slučitelnost výsledků měření.

Kontrolní procesy porovnávají metody měření a měřené veličiny, měřicí přístroje (otevřený a uzavřený systém aspirace vzorku) a jejich preanalytické systémy, jednotlivé laboratoře (*Bourková a kol., 2010*).

Obecně dělíme kontroly na:

- Interní kontroly kvality (IQC - Internal Quality Control), které si zajišťuje pracoviště samo v každodenním provozu
- Externí kontroly kvality (EQC – External Quality Control), které zajišťuje nezávislá organizace. Tento typ bývá také označován jako mezilaboratorní kontrola či porovnání. V České republice zajišťuje většinu externí kontroly kvality firma SEKK (Systém Externí Kontroly Kvality) (*Matýšková a kol., 2005*).

Hodnocení pravdivosti se provádí srovnáním vlastních výsledků měření se vztaženými (referenčními) hodnotami použitého kontrolního materiálu pro jednotlivé hematologické parametry.

Preciznost měření analyzátoru v sérii (opakovatelnost) se provádí minimálně 1x měsíčně, optimálně 1x týdně. Měří se stejný materiál opakovaně po sobě alespoň 5x (záleží na množství kontrolního vzorku) v sérii. Preciznost měření analyzátoru v čase se provádí 2 – 3 x denně. Vybrané vzorky je nutné opakovaně (minimálně 2 – 3x) změřit během provozu, s různými rutinními sériemi vzorků pacientů, nebo po určitých časových intervalech (zařadit mezi vzorky v běžném provozu). Požadovanou hodnotu preciznosti si laboratoř určí dle vlastních zkušeností. Variační koeficienty by se však měly blížit hodnotám uvedeným v dokumentaci přístroje a neměly by přesahovat doporučené hodnoty WHO (World Health Organization) (*Bourková a kol., 2010*).

Mírou rozptylu výsledků, tedy nepřesnosti, je směrodatná odchylka (SD – Standard Deviation). Obvykle se počítá relativní směrodatná odchylka neboli variační koeficient (CV – Coefficient of Variation), vyjadřovaný většinou v procentech (*Racek a kol., 1999*).

Dle doporučení WHO je nastaven variační koeficient pro trombocyty $< 15 \%$ - pro srovnatelnost různých metod měření a různých hematologických analyzátorů (reprodukovatelnost) a pro preciznost měření analyzátoru v čase. Laboratoř si ale může toto rozmezí mírně upravit dle vlastních zkušeností (*Bourková a kol., 2010*). Oddělení klinické hematologie (OKH) Nemocnice České Budějovice má nastaven 10 % rozptyl pro trombocyty.

3 Metody stanovení počtu krevních buněk

Počet krvinek se vyjadřuje počtem krvinek v 1 litru krve. Počet krevních destiček je stále používán jako test první linie ke zjištění funkce trombocytů.

3.1 Mikroskopické počítání krevních destiček

Trombocyty v krvi lze spočítat přímým nebo nepřímým způsobem. Mezi nepřímé metody patří metoda Foniova a orientační metoda Jedličkova a Altschullerova. Metody přímé jsou přesnější (*Hrubíško a kol., 1983*). Při orientačním hodnocení relativního počtu trombocytů v nátěru periferní krve se spočítá počet trombocytů na 1 000 erytrocytů a dle vzorce se přepočítá počet trombocytů na litr krve (*Matýšková a kol., 2003*).

Vzorec: $(\text{zjištěný počet trombocytů} \times \text{RBC}) / 1000$; kde

$\text{RBC} = \text{počet erytrocytů} / \text{l krve}$

Při přímých metodách se trombocyty počítají podobně jako erytrocyty a leukocyty v počítací komůrce. Řadíme sem metodu Piettových a modifikovanou metodu Brecher-Cronkite. U obou metod se krev ředí 20násobně a to pomocí ředícího roztoku. V případě metody Piettových se užívá roztoku prokainu, kde ale trombocyty můžeme začít počítat nejdříve za 45 – 60 minut. U metody Brecher-Cronkite je použití 1 % šřavelanu amonného jako ředícího roztoku výhodou, protože hemolyzuje erytrocyty rychleji a tak můžeme začít počítat již po 5 minutách (*Hrubíško a kol., 1983*). Přesto mikroskopická metoda využívající fázového kontrastu slouží nadále jako „zlatý standard“ pro mezinárodní referenční metodu ke stanovení počtu krevních destiček (*Pecka a kol., 2010*).

3.2 Počítání krevních částic na analyzátozech

V současné době se počet krevních buněk měří na analyzátozech krvinek, které poskytují podle typu přístroje od 24 do 48 parametrů včetně diferenciálního počtu leukocytů, histogramů a scattergramů erytrocytů, leukocytů a trombocytů. Výhodou automatických analyzátorů je jejich rychlost (100 – 120 vyšetření za hodinu), přesnost, spolehlivost a poměrně malé množství krve potřebné k vyšetření (*Pecka, 2006*). Měření na analyzátozech poskytují informace o počtu, velikosti, tvaru a složení buňky.

V analyzátozech dochází nejprve k tomu, že se buňky pomocí speciálního systému řadí tak, aby byla pokud možno měřena jen jedna buňka. Současně dochází k naředění krevního vzorku izotonickým roztokem, ředění se rozdělí do dvou cest. V jedné cestě se počítají erytrocyty a trombocyty (výraznější ředění), ve druhé cestě se po určité úpravě vzorku počítají leukocyty a zjišťuje se jejich rozpočet (méně výrazné ředění). Erytrocyty a trombocyty jsou izovolumetricky sférovány (zachování jejich objemu) pro jejich snadnější zpracování v analyzátoru.

Izotonický roztok obsahuje stabilizační látky, které po určitou dobu udržují fyziologické vlastnosti krvinky a jejich fyzikální parametry. Dnes se používají roztoky výhradně s CE značkou (*Pecka a kol., 2010*). Značka CE potvrzuje shodu s požadavky směrnice (jejíž jednou ze základních podmínek je to, aby výrobek uvedený na trh byl již výrobcem validovaný) a s příslušnými zákony (*Dastych a kol., 2008*).

K měření parametrů krevních buněk se na automatických analyzátozech používá kapilární nebo žilní krev. Pro většinu stanovení krevních parametrů se používá jako antikoagulant chelatonát trojdraselný (K_3EDTA). Pro jemnější ošetření zejména fyziologických vlastností krvinek se používají antikoagulanty s pufracími schopnostmi (např. ACD – Acidum Citricum Dextrose) obsahující většinou jako základní balanční složku kyselinu citrónovou a citráty (sodné nebo draselné). K dispozici je kromě K_3 , také K_2 a Na_2EDTA (*Pecka a kol., 2010*).

Rozdíl mezi substancí K_2EDTA a K_3EDTA je v pH, které tyto látky vytváří v systému odebrané krve. pH K_3EDTA se blíží fyziologické hranici pro pH krve (7,2 - 7,6), zatímco pH K_2EDTA se pohybuje lehce nad hodnotou 5 (5,2 – 5,6). Rozdíly jsou i ve fyziologickém působení na krevní buňky a v rozpustnosti obou solí (*Pecka, 2006*).

Mezinárodní výbor pro standardizaci v hematologii ICSH (International Committee for Standardization in Haematology) doporučil jako nejvhodnější antikoagulant K_2EDTA k počítání a zjištění změn velikosti krevních buněk. Doporučená koncentrace EDTA solí se pohybuje v rozmezí 1,2 – 2,0 mg/ml krve (Pecka a kol., 2010). K_3EDTA se používá většinou tekutá, a tím dochází k naředění vzorku, obecně dává K_3EDTA o 1 – 2 procenta nižší hodnoty všech přímo měřených parametrů krevního obrazu.

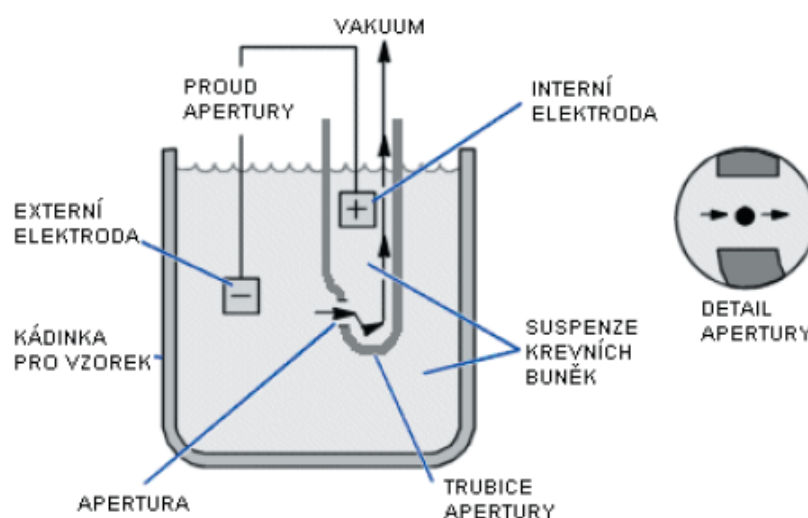
Bez ohledu na použitý typ EDTA je nutné odběrovou nádobku s krví 8 – 10krát opatrně otočit k zajištění řádného promíchání vzorku. EDTA (ale i obecně všechny chelátotvorné látky) mohou zapříčinit PTCP – tzn. ovlivnit počet krevních destiček (Jabor a kol., 2008). Soli EDTA mohou mít vliv na konformaci GP IIb/IIIa na povrchu trombocytu. Na změněný povrch se snadněji váží IgG a tento komplex přilne k buněčné membráně leukocytů – jedná se o tzv. destičkový satelitismus (Penka a kol., 2011). Vzhledem k tomu, že trombocyty jsou izovolumetricky sférované při odběru krve do solí EDTA, nedochází k výraznější chybě při stanovení jejich objemu (MPV) (Pecka a kol., 2010).

V případech použití větších objemů tekutých antikoagulancií, platí zejména pro látky s nižší antikoagulační účinností, jako je citrát nebo ACD dochází k diluci plazmy (Jabor a kol., 2008). U těchto antikoagulantů se musí vzít v úvahu diluční faktor (poměr antikoagulantu a krve) (Pecka a kol., 2010). V citrátu lze stanovit počty trombocytů, ostatní parametry krevního obrazu jsou ale zkreslené. Nejčastěji používaná koncentrace citrátu sodného je 0,109 mol/l krve, v poměru s krví 1:10 (1 díl citrátu a 9 dílů krve). U citrátu sodného se jedná o 10 % diluci (Jabor a kol., 2008).

3.2.1 Impedanční princip stanovení počtu krevních buněk

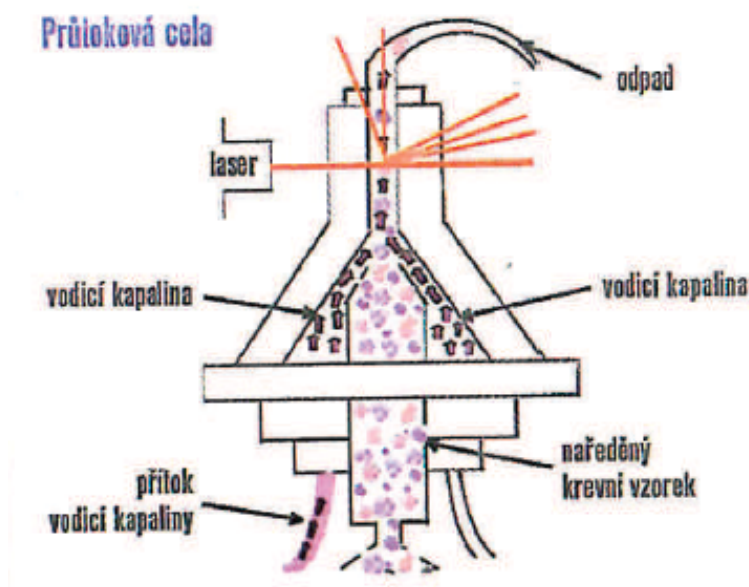
U impedančního principu se naředěná suspenze krevních částic vhání do měřicí kyvety. Vně i uvnitř kyvety je polarizované stejnosměrné elektrické pole. Vnikne-li částice do vstupního otvoru, změní se měrný odpor prostředí a vybudí se určité napětí, které se měří voltmetrem. Stejnosměrný proud nemůže pronikat do vnitřních struktur

krvní buňky, protože se na buněčné membráně udržuje poměrně silný záporný elektrický náboj. Dochází k tomu, že buňka je stejnosměrným proudem obtékána. Změna napětí vybudí impuls, jehož velikost odpovídá objemu částice (Pecka, 2006). Objem částic je vyjádřen v μm^3 nebo fl. Výsledky nejsou závislé na barvě či indexu lomu (Polčík, 2010). Nevýhoda impedančního systému spočívá v tom, že je měřena prakticky každá částice nebo změna prostředí v daném systému, tedy i prachové částice, krystalky v roztoku nebo vzduchové bubliny (Pecka, 2006).



Obr. 2 Impedanční princip

Aby při vstupu do měřicí apertury nedocházelo k souběžnému vstupu několika částic vedle sebe, neuspořádaně tj. ke koincidenci používá se systémů, které usměrňují proud částic. K usměrnění je nejvíce využívána hydrodynamická fokusace, kdy ředěná suspenze v izotonickém roztoku vstupuje velmi malou tryskou do středu širší měřicí kyvety, po jejímž obvodu zároveň protéká vyšší rychlostí vodící kapalina. Vzhledem k různým rychlostem a speciálnímu tvarování měřicí kyvety nedochází díky laminárnímu toku k vzájemnému promíchání obou kapalin a buňky jsou unášeny laminárním proudem nosné tekutiny jedna za druhou. Buňky jsou tak usměrněny do tenkého proudu, prostupují průtokovou komůrkou a v ní jsou jednotlivě analyzovány.



Obr. 3 Hydrodynamická fokusace

3.2.2 Optická metoda stanovení počtu krevních buněk

V systému dochází k nasávání suspenze krevních buněk, které jsou ve speciálním zařízení řazeny jednotlivě za sebou. V detekční části je umístěn zdroj monochromatického záření nebo slabý laserový zdroj. Buňka, která vstoupí do cesty světelnému záření, snižuje jeho optickou hustotu dopadající na fotobuňku a je zaznamenána jako částice. Tímto systémem je možné sestavit distribuční křivky závislosti četnosti na objemu buněk – tzv. histogramy, které reprezentují Gaussovo rozdělení.

Optickou metodu lze také využít ke stanovení nezralé frakce trombocytů (IPF – Immature Platelet Fraction) dříve označované jako retikulotrombocyty, tyto IPF mohou o 1 – 2 dny předpovídat nastupující obnovu produkce trombocytů. Vysoké procento IPF se vyskytuje například u diseminované intravaskulární koagulace (DIC) a imunní trombopenie (ITP). Nízké procento IPF poukazuje na sníženou produkci krevních destiček v kostní dřeni, značí dřevňový útlum.

3.2.3 Imunologické stanovení počtu krevních buněk

Při imunologickém stanovení počtu krevních destiček se využívá specifické protilátky proti povrchovému antigenu CD61. Jde o specifický glykoprotein GP IIIa z komplexu GP IIb/IIIa (*Pecka a kol., 2010*).

3.3 Interference spojené s měřením na analyzátoch krevních buněk

Interference jsou určité součásti či složky biologického vzorku, které zabraňují tomu, aby byl přesně určen jeden nebo více parametrů. Neovlivňují všechny technologie stejně. Některé z nich závisí přímo na vyšetřovací technologii (impedanční, optická, imunologická), jiné jsou na způsobu stanovení nezávislé. Při vyšetření na analyzátoch krvinek se vyskytuje těsná provázanost jedněch parametrů s jinými (některé se vypočítávají z měřených parametrů) (*Pecka, 2010*).

Obecně rozeznáváme interference plazmatického a buněčného původu a oba typy mohou ovlivnit nejen absolutní počet krevních buněk, ale i diferenciální rozpočet. Mezi nejčastější plazmatické látky, které mohou ovlivnit stanovení, patří kryoproteiny, gamapatie, lipidy a heparin.

Problémy při počítání trombocytů často působí přítomnost agregátů trombocytů (clumps) (*Matýšková a kol., 2005*). Tyto clumps se objevují také v přítomnosti EDTA-závislých autoprotilátek, které prokazatelně směřují proti 78 kDa podjednotce glykoproteinu IIb v membráně krevní destičky. Nejpravděpodobnější hypotézou je, že tyto protilátky jsou výsledkem přirozeného odstranění starých nebo poškozených destiček. U všech analyzátorů způsobují destičkové agregáty snížení počtu trombocytů a mohou ovlivnit i počet leukocytů (*Szczepliński et al., 2009*). Většina analyzátorů na tyto problémy upozorní hlášením „clumps“ a atypickými histogramy leukocytů a trombocytů.

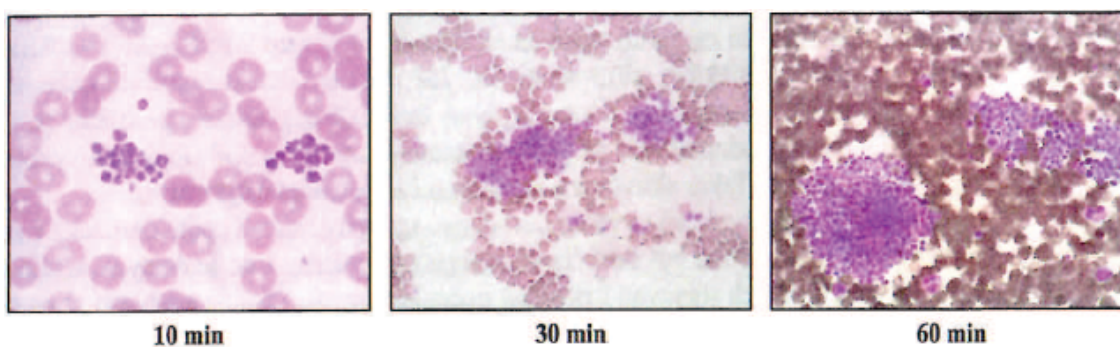
Počet trombocytů ovlivňují (především u impedanční analýzy) také atypické buněčné elementy jako např. mikrocyty, fragmenty erytrocytů (schistocyty), Howel-

Jolly tělíska, bazofilní tečkování, fragmenty leukocytární cytoplasmy, makrotrombocyty. Dokonalejší optická analýza dokáže ale většinu jmenovaných atypií ošetřit (Matýšková a kol., 2005).

3.3.1 Interference při stanovení počtu trombocytů

PTCP také někdy nazývána arteficiální trombocytopenie, laboratorní trombocytopenie, falešná trombocytopenie. V řadě případů není známý přesný původ tohoto fenoménu. Častěji se vyskytuje u traumat, septických stavů, u infekčních onemocnění vyvolaných některými viry – HIV (Human Imunodeficiency Virus), CMV (cytomegalovirus), EBV (Epstein-Baarové Virus), u některých autoimunitních onemocnění (idiopatická trombocytopenická purpura), u maligních onemocnění (mnohočetný myelom, chronická B-lymfocytární leukemie). PTCP je laboratorní fenoménem *in vitro* zjišťovaným snížením počtu krevních destiček při jejich normální hodnotě *in vivo*. PTCP může být vyvolána několika příčinami:

- Makrotrombocyty nebo mikrotrombocyty
- Destičkovým satelismem
- Tvorbou agregátů krevních destiček – ta bývá většinou způsobena protilátkami, v menší míře se na tomto fenoménu mohou podílet i interakce léků. Mezi protilátky, které vyvolávají falešné snížení počtu krevních destiček, se řadí chladové aglutininy nebo protilátky, které jsou aktivní v přítomnosti anebo nepřítomnosti EDTA. Ve všech případech dochází ke shlukování trombocytů, které je závislé na čase. Čím později od odběru krevního vzorku je stanoven počet trombocytů, tím je výraznější snížení jejich počtu.



Obr. 4 Tvorba agregátů krevních destiček v závislosti na čase

Agregáty krevních destiček se tvoří v nesrážlivé krvi z několika příčin. Může jít o spontánní nebo jinak aktivovanou agregaci např. díky zvýšené aktivitě krevních destiček (syndrom lepivých destiček), přítomnosti interferenčních látek, přítomnosti protilátek nezávislých na EDTA (chladové protilátky, tepelně nezávislé IgM). Rovněž mohou být příčinou chyby v preanalytické fázi (chyby při odběru, dlouhá doba odběru, nedostatečné promíchání vzorku) (*Pecka a kol., 2010*).

Zajímavostí je, že u nemocných s Glanzmannovou trombastenií, v přítomnosti EDTA dependentních protilátek, k PTCP nedochází. U tohoto onemocnění totiž chybí membránové glykoproteiny IIb/IIIa v destičce, které vystavují v přítomnosti EDTA jinak skryté antigenní determinanty (*Pegels et al., 1982*).

4 Metodika

4.1 Cíle práce a hypotézy

Cílem mé bakalářské práce je:

- stanovení počtu krevních destiček více metodami
- určení příčiny zjištěných rozdílů v počtu trombocytů
- určení algoritmu pro jejich spolehlivé počítání

Moje hypotéza je zaměřena na specifické situace, ve kterých může být přístrojové stanovení hladin trombocytů výrazně odlišné od skutečnosti. Pro získání jejich skutečného počtu je nutné užití alternativní metody. Za alternativní metodu je považováno mikroskopické stanovení nebo stanovení počtu trombocytů z citrátu sodného.

Hypotéza I. Použitím alternativních metod dostaneme u části populace jiné výsledky.

Hypotéza II. Tyto alternativní metody nám pomáhají pro rozlišení pravé a falešné trombocytopenie.

4.2 Biologický materiál v hematologické laboratoři

Pro vyšetření krevního obrazu (KO) přichází do hematologické laboratoře odběrová zkumavka s krví pacienta nejčastěji s protisrážlivým činidlem EDTA (vakueta s fialovým uzávěrem). Tento biologický materiál musí být řádně označen, minimálně rodným číslem a příjmením pacienta. K materiálu musí být žádanka, na které je uvedeno požadované vyšetření. Je označena jménem a příjmením pacienta, rodným číslem, oddělením nemocnice, číslem pojišťovny, kódem diagnózy, datem a časem odběru, podpisem odebírající sestry a podpisem ošetřujícího lékaře. Na zkumavku i žádanku se nalepí stejný čárový kód, pod kterým je tento vzorek pacienta dále veden. Aby došlo k rovnoměrnému promísení nesrážlivé krve s antikoagulantem ve zkumavce, nechá se asi 10 minut na speciálním valivém zařízení Coulter Mixer. Dochází na něm nejen k otáčení, ale i k naklánění. Mezitím laborantka zapíše údaje ze žádanky do LIS (Laboratorní Informační Systém), zkumavky se umístí do speciální kazety a před vlastní analýzou se ještě otočením o 180° promíchají, následně se vkládají do analyzátoru. Vakueta s modrým uzávěrem je běžně určena pro koagulační vyšetření, kde se nachází antikoagulant citrát sodný. Pro naše účely je tato zkumavka využita pro opakované stanovení počtu trombocytů.

4.2 Zpracování krevního vzorku

Z celkového počtu všech KO, které byly za vybrané období stanoveny, jsem nezpracovávala všechny vzorky, ale jen vybraný soubor padesáti vzorků, které přišly do laboratoře v pracovní době, mimo víkendů. Vzorky jsem vybírala podle dvou kritérií. Mezi tato kritéria patřilo hlášení analyzátoru o nalezených shlucích tzv. „Platelet Clumps“ a zároveň poprvé stanovený počet trombocytů pod $100 \times 10^9/l$.

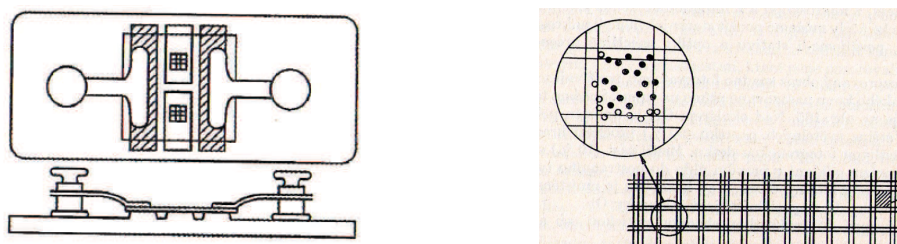
Pro nalezení případné pseudotrombocytopenie musíme mít výsledky počtu trombocytů stanovené ze zkumavek se dvěma různými antikoagulancii (EDTA a citrát sodný), pomocí analyzátoru i mikroskopu.

Krevní vzorky byly analyzovány pomocí přístroje Coulter LH 750, společnosti Beckman Coulter, jehož princip je založen na elektrické impedanci.

K vlastnímu mikroskopování byl používán světelný mikroskop společnosti Carl Zeiss. Jeho zvětšení je 40x a numerická apertura 0.65. Celkové zvětšení je 400násobné (objektiv 40x, okulár 10x). Objektivy byly použity plan-achromatické. V mikroskopu se trombocyty jeví jako malé kulaté světlolomné objekty. Aby byly dobře viditelné, musíme mikrošroubem zorné pole neustále rozostřovat a doostřovat. Pokud by erytrocyty neúplně zhemolyzovaly, pak by mohly být příčinou zkresleného počtu trombocytů.

Než se pustíme do vlastního počítání trombocytů, musíme splnit následující kroky a časové rozestupy mezi nimi. Před pipetováním do baničky pro trombocyty musíme krev znovu dobře promíchat, několikrát otočit o 180°. Do baničky se pipetuje 475 µl prokainu a 25 µl krve. Následuje promíchání a 90 - 120 minut necháme stát, aby erytrocyty zhemolyzovaly. Po uplynutí toho času naplníme Bürkerovu počítací komůrku a umístíme jí do vlhkého prostředí. To vytvoříme v Petriho misce, kam dáme navlhčenou gázu. Počítání pod mikroskopem můžeme zahájit až po 30 - 60 minutách.

Bürkerova počítací komůrka je v podstatě silné podložní sklíčko, které obsahuje 2 mřížky. Vlastní část počítací komůrky – prostor, který se naplňuje zředěnou krví je vysoký 0,1 mm. Krycí sklíčko se upevňuje dvěma kovovými pružinami z obou stran, aby pevně drželo. Celková plocha jedné mřížky tvoří 9 mm² (Čerňák a kol., 1982).



Obr. 5 Bürkerova počítací komůrka

Počítací mřížka je rozdělena trojitými čarami na 9 velkých čtverců a dvojitými čarami na 144 středních a 169 malých čtverců. Velká čtvercová pole mají plochu 1 mm^2 , střední čtverce $1/25 \text{ mm}^2$ a malé čtverce $1/400 \text{ mm}^2$. Mezi dvojitými stranami vznikají obdélníky, jejichž plocha se rovná ploše 4 malých čtverců, tj. $1/100 \text{ mm}^2$. Při počítání krevních elementů se berou v úvahu jen dvě sousední strany plošného obrazce. Počítáme všechny buňky, které leží uvnitř obrazce nebo se dotýkají těchto dvou počítaných stran, buď zevnitř, nebo vně obrazce. Počítáme úhlopříčně přes mřížku a pro trombocyty je stanoven počet 20 obdélníků (*Pecka a kol., 2010*).

5 Výsledky

V období od 23. 4. do 22. 5. 2012 jsem zpracovávala vzorky pro výzkum v rámci své praxe na OKH, Nemocnice České Budějovice a.s.

5.1 Výsledky stanovení celého souboru KO

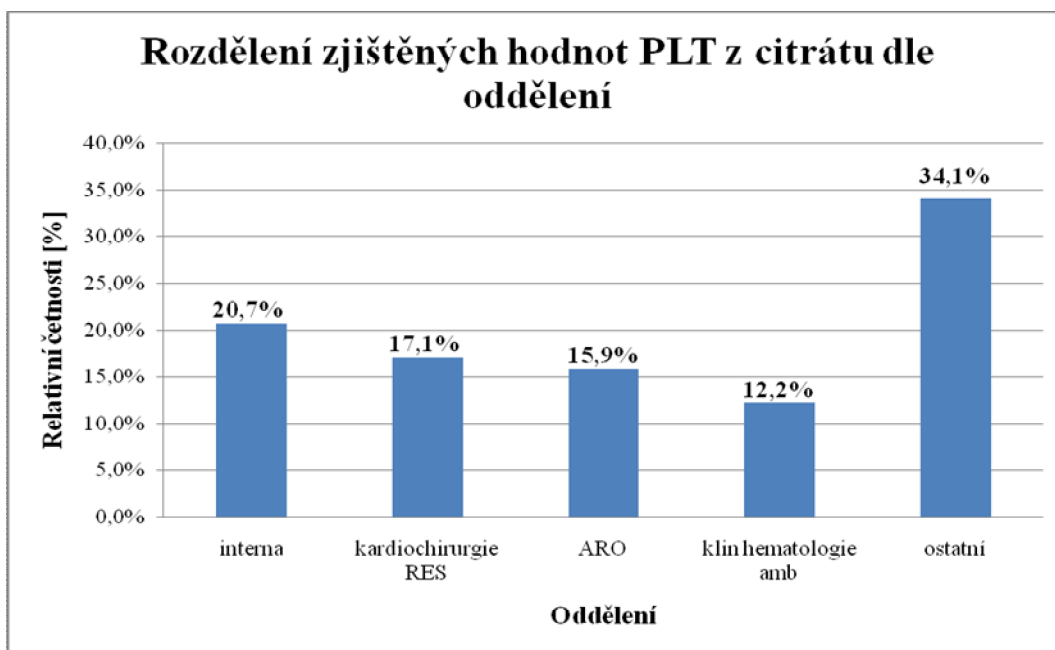
Za zvolené období bylo do hematologické laboratoře přijato 9 655 zkumavek s krevními vzorky. Celkový počet provedených KO byl nižší, nejčastějším důvodem byla sražená krev nebo svou roli sehrály i jiné faktory, díky nimž se nedal počet trombocytů stanovit.

celkový počet kreví	9 655	-
počet provedených KO	9 581	100,0 %
hodnoty PLT < 50 x 10 ⁹ /l	207	2,2 %
hodnoty PLT 50 – 100 x 10 ⁹ /l	509	5,3 %
hodnoty PLT 100 – 140 x 10 ⁹ /l	688	7,2 %
hodnoty PLT 140 – 440 x 10 ⁹ /l	7 754	80,9 %
hodnoty PLT > 440 x 10 ⁹ /l	423	4,4 %
hodnoty PLT zjištěné pomocí citrátu	82	0,9 %

Tab. 2 Výsledky stanovení krevního obrazu

Jak je z tabulky patrné, hodnoty trombocytů pod 50 x 10⁹/l se vyskytly pouze ve 2,2 % případů. Čím nižší procento, tím lépe pro všechny. Zastoupení těch, kteří mají počet trombocytů pod normou a jsou tak ohrožení krvácivými projevy dohromady dává 12,5 %. U 4,4 % jsou hodnoty nad normou – zde může vysoká hladina trombocytů

způsobit zvýšenou srážlivost a následné ucpání cév. Nejvyšší hodnoty trombocytů, konkrétně 1195 a 1025 [$\times 10^9/l$], byly zjištěny u pacientů z oddělení chirurgie.



Graf 1

Mezi oddělení, která patřila do necelého 1 % stanovení počtu trombocytů pomocí citrátu, se řadí především interna, kardiochirurgie, ARO a ambulance klinické hematologie – ta se právě zaměřuje na diagnostiku a léčbu krevních chorob včetně onemocnění srážlivosti krve.

Mezi ostatní se řadí oddělení gynekologie, infekce, traumatologie, oddělení následné péče, neurologie, kardiologie, dětské ambulance, plicní či gastroenterologické.

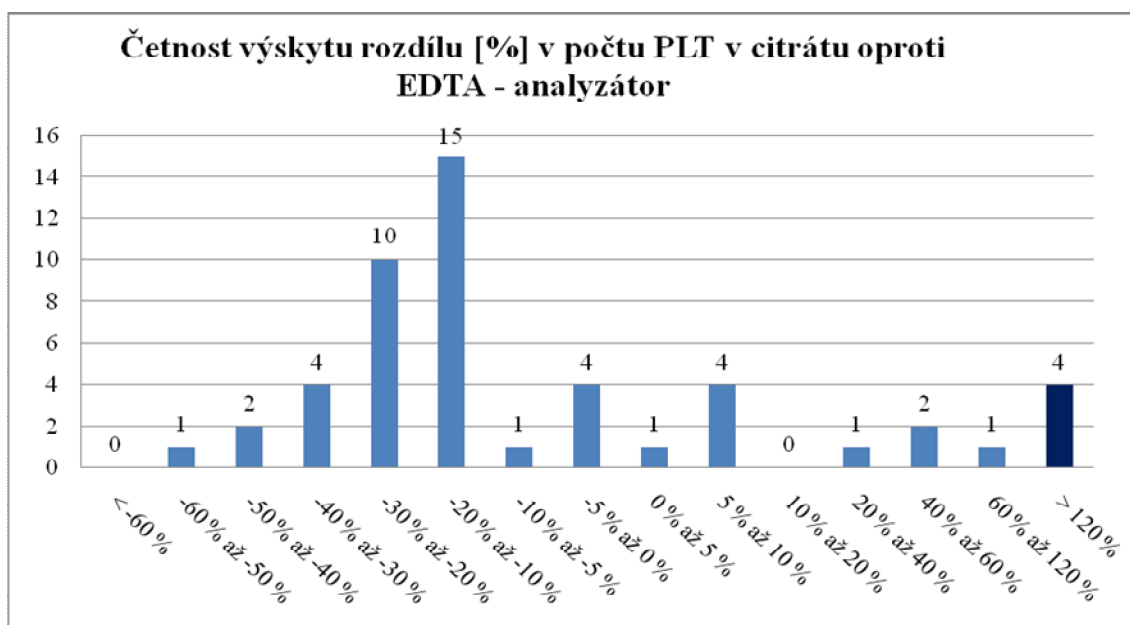
Průměrný věk celého souboru stanovených KO byl vypočten na 40,2 let. Ve vybraném souboru padesáti vzorků byl ovšem průměrný věk 60 let (ženy 59 let a muži 60,7 let). Věkový průměr na celkovém souboru 9 581 stanovení snižoval častý výskyt vzorků, které byly především z dětského oddělení a neonatologie, kde je věk dítěte velice nízký. Vyšší věkový průměr v souboru padesáti vzorků ovlivnil opakovaný

výskyt věku jednoho člověka (muž ve věku 75 let), který věkový průměr naopak zvyšoval.

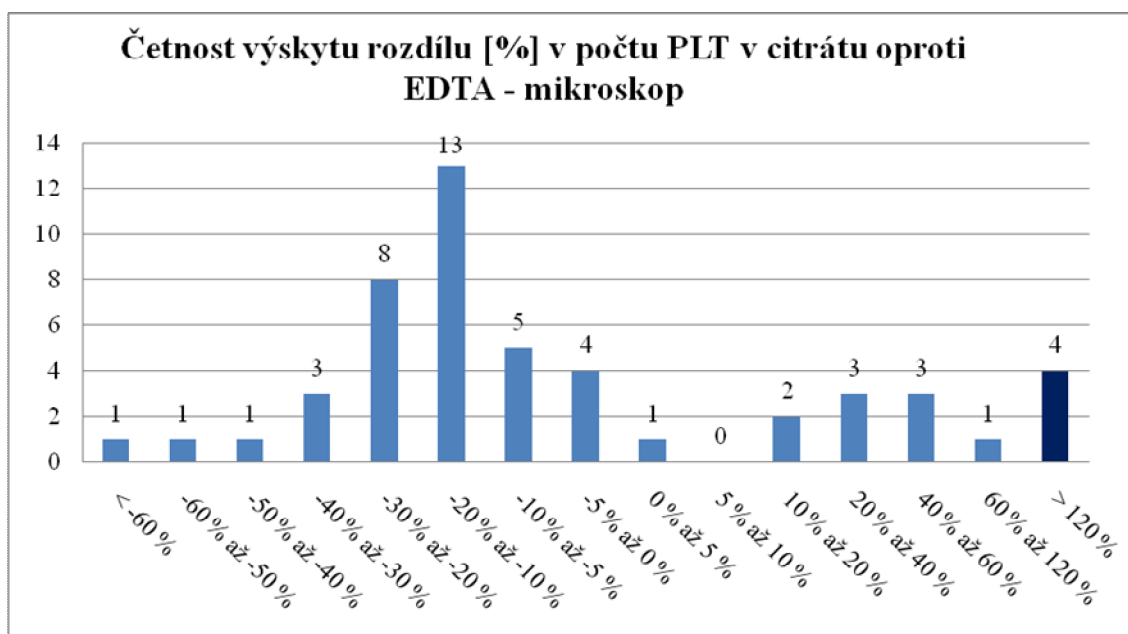
Ze souboru padesáti vzorků bylo zastoupení mužů nadpoloviční (konkrétně 60 %). U mužských vzorků byl velký věkový interval. Nejnižší věková hranice byl 1 rok života a nejvyšší věk patřil muži, kterému bylo 91 let. Ženské pohlaví bylo zastoupeno ve 40 procentech z celkového počtu vzorků a věkový interval se nacházel od 23 let do 83 let.

5.2 Výsledky stanovení vybraného souboru vzorků

K tomu, abychom zjistili rozptýl hodnot rozdílu mezi použitými antikoagulancií a mohli tak určit v kolika případech je rozdíl citrátu oproti EDTA nižší a v kolika vyšší, nám poslouží následující grafy. Pokud se rozdíl nachází v záporných hodnotách, svědčí to o tom, že nám citrát poskytuje nižší počty trombocytů, než při použití EDTA. Obecně platí, že by měl počty trombocytů mírně podhodnocovat právě díky jeho naředění.



Graf 2



Graf 3

V obou grafech jsou ose x znázorněny kategorie výskytu rozdílu v počtu trombocytů v citrátu oproti EDTA a na ose y jejich absolutní četnosti ze souboru padesáti vzorků.

U mikroskopické i přístrojové metody byl největší výskyt rozdílu mezi oběma antikoagulancii v oblasti od - 30 % do - 10 %. U těch vzorků, kde byly počty trombocytů z citrátu vyšší o více než 20 % než z EDTA, jsme mohli mít podezření na pseudotrombocytopenii. Tmavou barvou sloupečku je v grafech 2 a 3 zvýrazněn rozdíl nad 120 procent. Jedná se o vzorky číslo 8, 28, 29 a 36 a obě použité metody počítání nález PTCP vzájemně potvrzují.

V případě mikroskopie nalezneme ale i hodnotu mezi 20 % až 40 % rozdílu, která dosahuje rozdílu 28,57 %, přesto se nejedná o nález PTCP. Jde o vzorek číslo 26, u kterého byl napočten v EDTA nízký počet trombocytů, konkrétně 14 [$\times 10^9/l$] a v citrátu bylo napočteno o „pouhé“ 4 [$\times 10^9/l$] trombocyty více. Tento nepatrný rozdíl v počtu buněk stačí na to, aby se procentuální rozdíl vyšplhal do kladných čísel nad 20 procent.

V případě vzorků označených hvězdičkou (Tab. 3 a Tab. 4) se jednalo o jednoho a toho samého člověka (muž, ročník narození 1946). Během dvou dní přišly dva jeho krevní vzorky - v obou případech byl mikroskopii i analyzátořem stanoven počet trombocytů v citrátu vyšší. Nabízelo se proto sledovat další případné vzorky od tohoto člověka a ověřit, zda bude opakovaně zjištěn rozdíl vyšší než 20 %.

číslo vzorku	hodnoty PLT z EDTA [x10 ⁹ /l]	hodnoty PLT z citrátu [x10 ⁹ /l]	rozdíl citrátu oproti EDTA [%]
31*	55+shluk	67	21,82
32*	51+shluk	66	29,41
35*	44+shluk	66+shluk	50,00
40*	37+shluk	57+shluk	54,05
42*	38+shluk	59+shluk	55,26
47*	26+shluk	47+shluk	80,77

Tab. 3 Hodnoty trombocytů z mikroskopu u stejného člověka

Mikroskopie určila šest krevních vzorků, kdy se rozsah rozdílu pohyboval od 21,82 do 80,77 %. Z počátku byl rozdíl nepatrně přes 20 % - v porovnání s rozdílem vzorku zpracovávaným ke konci mého výzkumu, který ukazuje nárůst až na necelých 81 %. Ve vzorcích číslo 31 a 32 se nacházely shluky jen v EDTA, ve všech ostatních vzorcích byly shluky pozorovány za použití obou protisrážlivých přípravků.

Víme, že kvantitativní hodnocení trombocytů v případě nálezů shluků není objektivní, přesto se ale rozdíl zvyšuje.

Naproti tomu byly pomocí analyzátoru u stejného muže určeny jen čtyři krevní vzorky s rozdílem přesahující 20 %. Tab. 4 nám ukazuje, že první dva vzorky číslo 31 a 32 sice nemají nijak výrazný rozdíl citrátu oproti EDTA, ale počet trombocytů z citrátu jsou již o něco málo vyšší. Ovšem pokud vezmeme v úvahu 10 % naředění krve citrátem a provedeme následnou korekci hodnot (viz Tab. 5) tak u vzorku číslo 31 dostaneme rozdíl 20,31 %. Ve třech případech jsme obdrželi hlášení analyzátoru o nalezených shlucích v citrátu. Nejvýraznější rozdíl vidíme také u posledního vzorku, který dosahuje až 105 %.

číslo vzorku	hodnoty PLT z EDTA [x10 ⁹ /l]	hodnoty PLT z citrátu [x10 ⁹ /l]	rozdíl citrátu oproti EDTA [%]
31*	64+shluk	70	9,38
32*	62+shluk	65	4,84
35*	48+shluk	72	50,00
40*	46+shluk	68+shluk	47,83
42*	40+shluk	55+shluk	37,50
47*	39+shluk	80+shluk	105,13

Tab. 4 Hodnoty trombocytů z analyzátoru u stejného člověka

Tabulky (Tab. 8 a 9) s celkovými výsledky pro soubor padesáti vzorků jsou k nahlédnutí v příloze.

Abychom získali validní hodnoty počtu trombocytů z citrátu, je vhodné použít matematickou korekci vzhledem k ředění a navýšit tyto hodnoty o 10 %. Přepočet jsme provedli u vzorků, kde se vyskytl jev PTCP.

číslo vzorku	hodnoty PLT z EDTA [x10 ⁹ /l]	hodnoty PLT z citrátu [x10 ⁹ /l]	hodnoty PLT z citrátu navýšeny o 10 % [x10 ⁹ /l]
8	26+shluk	163	179,3
28	16+shluk	63	69,3
29	22+shluk	209	229,9
36	65+shluk	162	178,2
31*	64+shluk	70	77,0
32*	62+shluk	65	71,5
35*	48+shluk	72	79,2
40*	46+shluk	68+shluk	74,8
42*	40+shluk	55+shluk	60,5
47*	39+shluk	80+shluk	88,0

Tab. 5 Hodnoty počtu trombocytů z citrátu navýšeny o 10 %

Místo aritmetického průměru jsme na náš soubor padesáti vzorků použili hodnotu mediánu. Ten má oproti průměru tu výhodu, že není ovlivněn extrémně odlehlými hodnotami, v našem případě vysoce kladnými. Medián rozdílu u analyzátoru byl roven minus 16,99 %. U mikroskopie byl medián rozdílu roven minus 10,28 %.

V průměru jsem pomocí mikroskopu počítala oproti analyzátoru o 9,77 buněk méně v případě EDTA a o 9,14 buněk méně v případě citrátu.

Průměrná hodnota počtu trombocytů z EDTA získána analyzátozem byla 57,56 buněk, v případě mikroskopu 50,28 buněk. U citrátu sodného byla průměrná hodnota počtu trombocytů stanovená pomocí analyzátoru rovna 59,10 buněk a pomocí

mikroskopu rovna 53,00 buněk. Z tohoto porovnání je jasně patrné, že manuálním počítáním dospíváme ve většině případů k nižším výsledkům.

U přístrojového stanovení byly v 70 % případů (35 vzorků) počty trombocytů vyšší z EDTA a ve dvou případech se hodnoty rovnaly. Mikroskopické stanovení podalo skoro srovnatelné výsledky, v 72 % případů (36 vzorků) byly z EDTA počty trombocytů vyšší a v jednom případě byly hodnoty shodné.

Ve dvou případech bylo požadováno mikroskopické stanovení počtu trombocytů z prstu (Tab. 6), kdy se krev odebírá rovnou do baničky s prokainem a neuzívá se tak žádný protisrážlivý přípravek, který by mohl výsledek ovlivnit. V tabulce vidíme, že se počty trombocytů z prstu téměř shodují s hodnotami z citrátu, které naměřil analyzátor.

číslo vzorku	hodnoty PLT z EDTA [x10 ⁹ /l]	hodnoty PLT z citrátu [x10 ⁹ /l]	hodnoty PLT z prstu [x10 ⁹ /l]
10	11+shluk	9	10
45	52+shluk	35	33

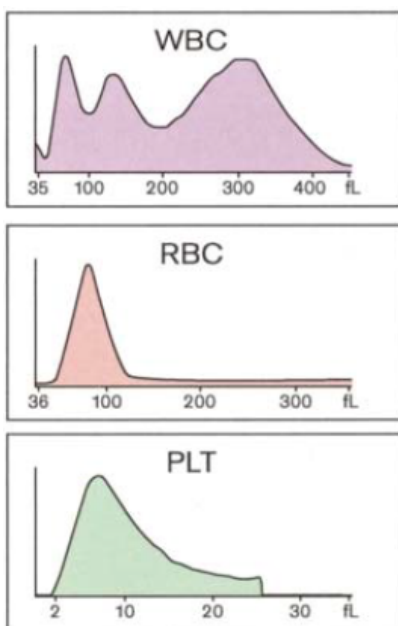
Tab. 6 Hodnoty počtu trombocytů získané z prstu

5.3 Histogram a parametry krevní destičky (EDTA versus citrát)

5.3.1 Interference v histogramu PLT

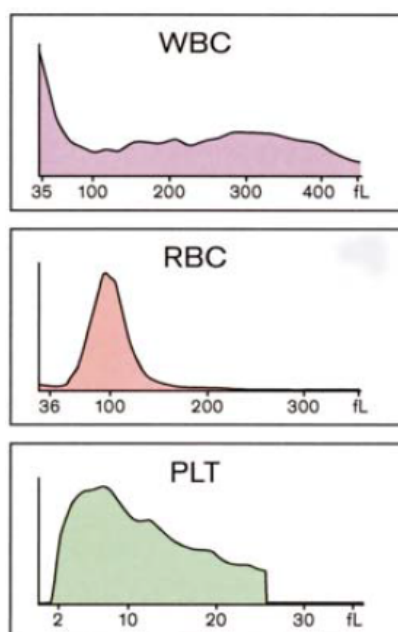
Mezi nejčastější interference v histogramu trombocytů patří obrovské trombocyty (Giant Platelets) a agregáty trombocytů.

Obrovský trombocyt je trombocyt, jehož velikost je výrazně větší než velikost průměrného trombocytu ve vzorku (MPV typicky cca 10 fl) a přibližuje se velikosti průměrného erytrocytu (střední objem erytrocytu – MCV typicky 75 – 90 fl). Obrovské trombocyty tvoří obvykle populaci zcela vlevo na histogramu WBC (White blood cell, bílé krvinky). Histogram PLT zřetelně obsahuje abnormálně vysoký počet velkých a velmi velkých trombocytů, protože pravý okraj tohoto histogramu nepřisedá k ose x .



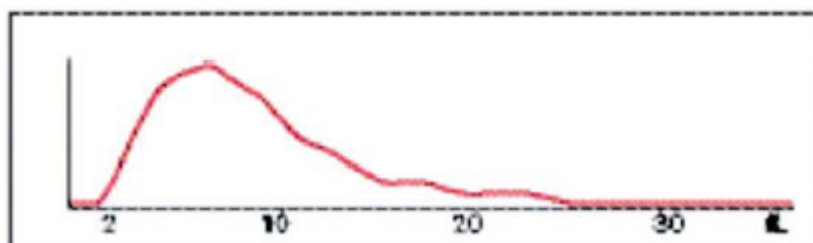
Obr. 6 Histogram WBC, RBC a PLT v případě obrovských trombocytů

Agregát trombocytů je skupina dvou a více vzájemně přilnutých trombocytů (EDP či špatné promíchání po odběru). Přesné určení shluků je obtížné vzhledem k nepředvídatelné a proměnné velikosti těchto útvarů. Shluky trombocytů pozorujeme opět jako populaci zcela vlevo na histogramu WBC. Histogram PLT zcela vpravo má nenulové hodnoty.



Obr. 7 Histogram WBC, RBC a PLT v případě agregátů trombocytů

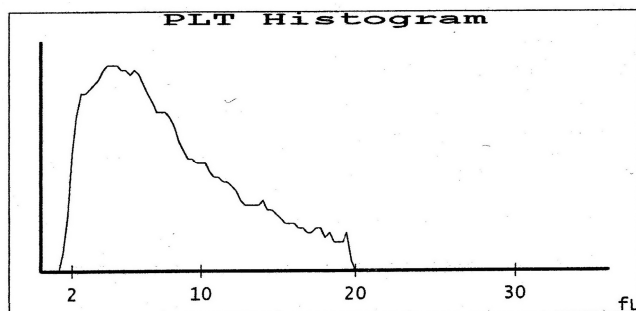
Navíc u vzorku se shluky trombocytů vždy chybí velikostní kontinuita PLT (chybí typické prosedání za vrcholem) (Boudal, 2011).



Obr. 8 Normální histogram PLT

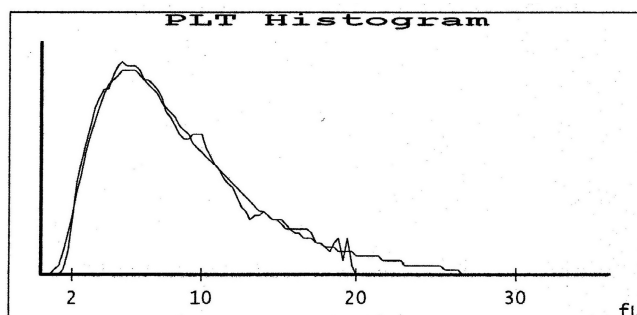
5.3.2 Srovnání histogramů PLT a WBC u vzorku číslo 36

Histogram PLT – použit antikoagulant EDTA (počet trombocytů $65 \times 10^9/l$)



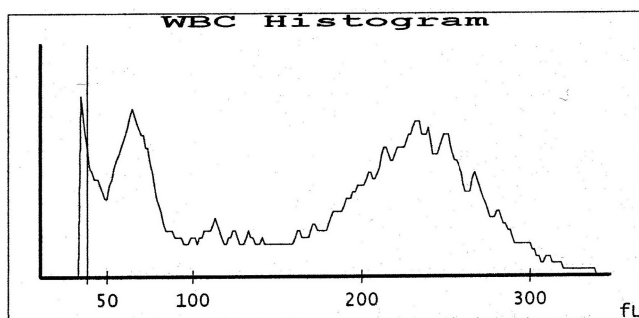
Obr. 9

Histogram PLT – použit antikoagulant citrát sodný (počet trombocytů $162 \times 10^9/l$)



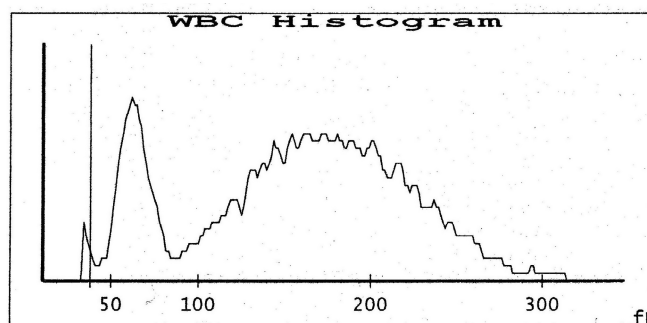
Obr. 10

Histogram WBC – použit antikoagulant EDTA



Obr. 11

Histogram WBC – použit antikoagulant citrát sodný



Obr. 12

5.3.3 Parametry krevní destičky u vzorku číslo 36

	PLT [x10 ⁹ /l]	MPV [fl]	Pct [%]	PDW
EDTA	65	8,6	0,055	18,5
citrát	162	10,0	0,161	18,8

Tab. 7 Parametry krevní destičky

Tímto vzorkem číslo 36 se zabývám více do hloubky, protože chci doložit, jak je PTCP vidět v histogramech. Na histogramu WBC (Obr. 11) jsou mezi leukocytární populaci zařazeny právě trombocyty. To je způsobeno vzniklými shluky, díky kterým dosahují trombocyty většího objemu. Parametry krevní destičky v EDTA jsou oproti citrátu, kde se shluky netvořily, odlišné.

6 Diskuse

Pokud porovnáme mikroskopické a přístrojové stanovení, pak se dostaneme k reálné reprodukovatelnosti v případě mikroskopu až 30 %, v případě analyzátoru k 5%. Výhodou mikroskopování je ten fakt, že buňky skutečně vidíme. Nevýhoda u analyzátoru spočívá v tom, že nad ním člověk nemá vizuální kontrolu (*ústní sdělení školitele*).

Jak potvrdil výzkum v mé práci, tak bylo a stále je nejběžnějším řešením PTCP odběr periferní krve do citrátu sodného. Možná je tak hojně využíván také díky jeho velké dostupnosti, oproti jiným antikoagulanciím. Nicméně se z tohoto odběru mohou vydávat jen počty trombocytů, jiné parametry krevního obrazu ne.

S cílem vyhnout se agregaci byla navržena různá další antikoagulancia, včetně ACD, theofilinu nebo $MgSO_4$ (*Zanddecki et al., 2007*). Účinnou metodou, pro stanovení přesného počtu krevních destiček v případě PTCP, by měl být přídavek aminoglykosidů (*van der Meer et al., 2002*). Odběr do zkumavek TromboExact, které mají definovaný obsah Mg^{2+} , byl zaražen mezi rutinně prováděné odběry periferní krve u pacientů s podezřením na PTCP. Z tohoto speciálního odběru již lze vydávat kompletní výsledek krevního obrazu. Při tomto odběru není vzorek naředěn, protože se ve zkumavce nachází protisrážlivé činidlo ve velmi malém objemu, podobně jako ve zkumavkách s EDTA (*Hrdličková a kol., 2010*).

Pokud by ale došlo k agregaci trombocytů, mohl by být nesprávný nejen počet trombocytů, ale i údaje o počtu bílých krvinek a diferenciál WBC, protože shluklé destičky mají podobnou velikost jako leukocyty (*Wu et al., 2011*). Velikost shluků někdy dosáhne 35 fl a na hematologickém analyzátoru mohou být chybně označeny jako malé lymfocyty (*Szczepiński et al., 2009*). Toto tvrzení jsem si v mé práci ověřila. Na obr. 11 a 12 máme histogram WBC a ten se nám liší v závislosti na použitém antikoagulanciu. V případě EDTA ukazuje histogram, že se zcela vlevo nachází velké množství krevních buněk, které analyzátor určil jako leukocyty, ale jejich objem je menší než 50 fl. U citrátu toto nepozorujeme.

Podle různých studií může být PTCP častější u mužů a/nebo u starších pacientů (*Zandecki et al., 2007*). Přesto, že se na vybraném souboru padesáti vzorků nedají provádět statisticky významná vyhodnocení, tak se dle výsledků měření shodují se skutečností častějšího výskytu v mužské populaci, u lidí staršího věku – v průměru kolem 60 let.

Výskyt PTCP je uváděn asi u 0,1 – 2 % vyšetření (*Penka a kol., 2001*). Nicméně v Polsku byla PTCP identifikována jen u 12 případů z 83 486, což je pouhých 0,014 % (*Froom et al., 2011*). V mé práci jsem dospěla k 0,052 % výskytu PTCP (5 případů nálezu PTCP z celkového počtu 9 581), z toho byl tento jev dokazován opakovaně u stejného člověka. Ale také určitou roli sehrála náhoda, kdy ve zvoleném časovém období není jisté, jestli bude výskyt hojný či nikoliv. V mém souboru padesáti vzorků, do kterého byly vybrány krevní vzorky již s určitým podezřením, byla specifická hlášení PTCP 10 %.

Diagnóza je mnohem častější ve studiích trombocytopenických pacientů, kteří jsou vedeni na hematologických klinikách, kde je rozmezí 7,5 – 17 % (*Froom et al., 2011*). Ve vybraném období bylo 596 odběrů z oddělení hematologické ambulance, z toho byl u 11 pacientů stanoven počet trombocytů právě díky citrátu. Procentuálně se jedná o 1,85 % případů. Zda jim ale byla diagnostikována PTCP, můžeme jen spekulovat.

Autoři Wu et al. (2011) uvádí, že při agregaci malých shluků krevních destiček je může analyzátor počítat jako obří krevní destičky. Proto se u pacientů s EDTA-závislou pseudotrombocytopenií bude MPV a PDW zvyšovat, zatímco hodnota Pct se bude snižovat.

Podle výsledků mé práce se ztotožňují pouze se dvěma změnami parametrů krevní destičky. A to, že se hodnota Pct snížila 3x oproti dolní fyziologické mezi (0,055 oproti 0,15). Destičky tedy zaujímají menší část objemu z celkového objemu plazmy. Jelikož se v podstatě jedná o trombocytopenii v případě použití EDTA, není snížení hodnoty Pct nic neobvyklého. Šíře distribuce destiček je zvýšena na 18,5 %, vyšší procento značí větší variabilitu ve velikosti krevních destiček. Naproti tomu MPV, tedy průměrný objem buňky v hodnocených trombocytech, zůstal nezměněn. To znamená, že v případě

mého zkoumaného vzorku PTCP číslo 36 nejspíše nedošlo k vzájemné agregaci malých shluků trombocytů.

7 Závěr

Všechny stanovené cíle jsem naplnila. Pomocí přístrojové a mikroskopické techniky jsem stanovila počet trombocytů v padesáti vzorcích (podezřelých z PTCP) standardně v EDTA a zároveň i v citrátu, v některých případech byly mikroskopicky stanoveny i počty trombocytů z prstu. Naměřená data se liší. Tímto jsem si ověřila první hypotézu.

Sama jsem si potvrdila hypotézu, že za specifických okolností může být přístrojové stanovení hladin trombocytů odlišné od skutečnosti. Jsou to situace vyvolané použitím EDTA jako antikoagulancia. Lidská populace je variabilní a krev každého člověka reaguje spolu s antikoagulantem jinak. Stanovením v jiném antikoagulantu a mikroskopií jsem si ověřila druhou hypotézu, protože tyto alternativní metody odhalí případný nesprávný výsledek v počtu trombocytů.

Pro určení algoritmu pro spolehlivé počítání trombocytů je zaveden následující postup - odběr do EDTA, opakovaný odběr do citrátu a nakonec odběr z prstu bez protisrážlivého činidla a počítání v Bürkerově komůrce pod mikroskopem. Tento navrhovaný algoritmus je zaveden do praxe.

8 Seznam použitých zdrojů

BEUTLER, E., LICHTMAN, M., COLLER, B., KIPPS, T. *Williams Hematology*. Fifth edition. New York: Mc Graw-Hill, 1995, s. 334. ISBN 0-07-070386-8.

BOUDAL, P. Hematologický analyzátor UniCel DxH 800 Coulter. *In Vitro Diagnostika* [online]. 2011, č. 17, s. 14 - 15. Dostupné z: http://www.immunotech.cz/pdf/IVD_17.pdf

BOURKOVÁ, L., MATÝŠKOVÁ, M., KRATOCHVÍLA, J. Vnitřní kontrola kvality měření krevních obrazů na hematologických analyzátoch. *Doporučení České hematologické společnosti ČLS JEP* [online]. 2010, s. 1 - 2; 4 - 5. Dostupné z: <http://www.hematology.cz/doporuzeni-chs-kcinnostem.php>

ČERŇÁK, J., ČERŇÁKOVÁ, M., SEDLÁK, J. *Laboratorní technika I*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1982, s. 188.

DASTYCH, M., BREINEK, P. a kol. *Klinická biochemie*. 1. vydání. Brno: Masarykova Univerzita, 2008, s. 23. ISBN 978-80-210-4572-9.

DONNER, L. *Klinická hematologie*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1985, s. 387.

FRIEDMANN, B. *Hematologie v praxi*. Praha: Galén, 1994, s. 135. ISBN 80-85824-05-1.

FROOM, P., BARAK, M. Prevalence and Course of Pseudothrombocytopenia in Outpatients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2011, roč. 49, č. 1, s. 111.

GEORGE, J. Platelets. *The Lancet*. 2000, roč. 355, č. 9214, s. 1532 - 33.

GUMULEC, J., KULA, R., ŠIMETKA, O., PLEVA, L., ULLRYCHOVÁ, J. Diferenciální diagnostika trombocytopenie u kriticky nemocných pacientů. *Vnitřní lékařství* [online]. 2010, roč. 56, č. 1, s. 14 - 26. Dostupné z: <http://www.trombocytopenie.cz/clanek.php?id=16&tab=lekar>

HRDLIČKOVÁ, T., BOURKOVÁ, L., HOBLOVÁ, J., PENKA, M. Porovnání počtu trombocytů u pseudotrombocytopenií ze standardních odběrů s odběry do zkumavek TromboExact a s imunologickým vyšetřením počtu trombocytů. *Transfuze a Hematologie dnes*. 2010, roč. 16, č. 4, s. 43 - 44.

HRUBIŠKO, M. a kol. *Hematologie a krevní transfuze*. 1. české vydání. Praha: Avicenum, 1983, s. 98-103; 168-169. ISBN 08-056-83.

JABOR, A. a kol. *Vnitřní prostředí*. Praha: Grada Publishing, 2008, s. 438-439. ISBN 978-80-247-1221-5.

KOUBEK, K., HŘEBAČKOVÁ, J. Membránové molekuly krevních destiček. *In Vitro Diagnostika* [online]. 2009, č. 11, s. 16. Dostupné z: http://www.immunotech.cz/pdf/IVD_11.pdf

KRUŽÍK, P., MOOS, J., VLČEK, R. Analyzátoři buněk a částic. *In Vitro Diagnostika* [online]. 2006, č. 3, s. 4. Dostupné z: http://www.immunotech.cz/pdf/IVD_3.pdf

KUBISZ, P. a kol. *Hematológia a transfuzológia*. Praha: Grada Publishing, 2006, s. 257. ISBN 80-247-1779-4.

MATÝŠKOVÁ, M., BOURKOVÁ, L., HOBLOVÁ, J. Zajištění spolehlivosti vyšetření krevních obrazů. *Vnitřní Lékařství* [online]. 2005, roč. 51, s. 896 - 897. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=vl_05_08_19.pdf

MATÝŠKOVÁ, M., BULIKOVÁ, A., KAČÍRKOVÁ, P., BOURKOVÁ, L. Postup při hodnocení nátěru periferní krve. *Doporučení České hematologické společnosti ČLS JEP* [online]. 2003, s. 2. Dostupné z: <http://www.hematology.cz/doporučení-chs-keinnostem.php>

PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu I. Buňka a krvetvorba*. Český Těšín: Finidr, 2002, s. 152 - 154. ISBN 978-80-866-8201-3.

PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu II. Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín: Finidr, 2006, s. 103 - 114, 116, 130 - 131, 135, 137, 150 - 151. ISBN 978-80-866-8202-0.

PECKA, M., BLÁHA, M. a kol. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. 1. vydání. Český Těšín: Infinity art, 2010, s. 44 - 45; 68 - 69; 71 - 75; 77; 79 - 80; 113 - 114; 131 - 135. ISBN 978-80-903-8719-5.

PECKA, M. Pseudotrombocytopenie. *Transfuze a Hematologie dnes*. 2010, roč. 16, č. 4, s. 35 - 36.

PEGELS, JG., BRUYNES, EC., ENGELFRIET, CP., VON DEM BORNE, AE. Pseudothrombocytopenia: an Immunologic Study on Platelet Antibodies Dependent on EDTA. *Blood*. 1982, roč. 59, č. 1, s. 160.

PENKA, M., BULIKOVÁ, A., MATÝŠKOVÁ, M., ZAVŘELOVÁ, J. *Hematologie I. Neonkologická hematologie*. Praha: Grada Publishing, 2001, s. 109. ISBN 978-80-247-0023-6.

PENKA, M., TESAŘOVÁ, E. a kol. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2011, s. 78. ISBN 978-80-247-3459-0.

POLČÍK, M. Coulterova metoda – stanovení velikosti a počtu buněk. *Beckman Coulter*. 2010, s. 3.

RACEK, J. a kol. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 1999, s. 33. ISBN 80-7262-023-1.

SZCZEPIŃSKI, A., MAŚLANKA, K., MARIANŚKA, B., ZUPAŃSKA, B. EDTA-dependent Pseudothrombocytopenia – Clinical and Serological Study of 217 Cases. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2009, roč. 18, č. 4, s. 362.

VAN DER MEER, W., ALLEBES, W., SIMON, A., VAN BERKEL, Y., DE KEIJZER, MH. Pseudothrombocytopenia: a Report of a New Method to Count Platelets in a Patient with EDTA- and Temperature-independent Antibodies of the IgM Type. *European Journal of Haematology*. 2002, roč. 69, č. 4, s. 243.

WU, J., GUO, Y., ZHANG, L., CUI, W., LI, W., ZHANG, S. Clinical Utility of Automated Platelet Clump Count in the Screening for EDTA-dependent Pseudothrombocytopenia. *Chinese Medical Journal*. 2011, roč. 124, č. 20, s. 3356.

ZANDECKI, M., GENEVIEVE, F., GERARD, J., GODON, A. Spurious Counts and Spurious Results on Haematology Analysers: a Review. Part I: Platelets. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2007, roč. 29, č. 1, s. 4 – 7; 9.

9 Klíčová slova

Bürkerova komůrka

Citrát sodný

Elektrická impedance

Kyselina ethylendiamintetraoctová

Pseudotrombocytopenie

Trombocyty

Key words

Bürker chamber

Sodium citrate

Electrical impedance

Ethylenediamine tetra-acetic acid

Pseudothrombocytopenia

Platelets

10 Příloha

číslo vzorku	hodnoty PLT z EDTA [x10 ⁹ /l]	hodnoty PLT z citrátu [x10 ⁹ /l]	rozdíl hodnot PLT z citrátu oproti EDTA [x10 ⁹ /l]	rozdíl hodnot PLT z citrátu oproti EDTA [%]	věk	pohlaví
1	82+shluk	72	-10	-12,20	65	m
2	66+shluk	54	-12	-18,18	72	ž
3	86+shluk	60	-26	-30,23	40	ž
4	74+shluk	79	5	6,76	77	ž
5	84+shluk	68	-16	-19,05	62	ž
6	86+shluk	52	-34	-39,53	78	m
7	89+shluk	72	-17	-19,10	68	m
8	26+shluk	163	137	526,92	83	ž
9	86+shluk	70	-16	-18,60	78	m
10	14+shluk	10	-4	-28,57	65	m
11	39+shluk	33	-6	-15,38	62	ž
12	67+shluk	66	-1	-1,49	75	m
13	62+shluk	47	-15	-24,19	78	ž
14	86+shluk	59	-27	-31,40	63	m
15	53+shluk	44	-9	-16,98	62	ž
16	78+shluk	45	-33	-42,31	1	m
17	2+shluk	2	0	0,00	23	ž
18	96+shluk	79	-17	-17,71	73	ž
19	84+shluk	73	-11	-13,10	78	m
20	81+shluk	71	-10	-12,35	64	m
21	92+shluk	101	9	9,78	67	m
22	11+shluk	12	1	9,09	65	m
23	30+shluk	29	-1	-3,33	20	m
24	57+shluk	48	-9	-15,79	78	m
25	16+shluk	14	-2	-12,50	62	ž
26	19+shluk	18	-1	-5,26	62	ž
27	38+shluk	38	0	0,00	63	m
28	16+shluk	63	47	293,75	63	ž

29	22+shluk	209	187	850,00	24	m
30	57+shluk	24	-33	-57,89	91	m
31*	64+shluk	70	6	9,38	75	m
32*	62+shluk	65	3	4,84	75	m
33	66+shluk	36	-30	-45,45	31	m
34	70+shluk	55	-15	-21,43	31	ž
35*	48+shluk	72	24	50,00	75	m
36	65+shluk	162	97	149,23	66	m
37	44+shluk	36	-8	-18,18	31	m
38	4+shluk	3	-1	-25,00	25	ž
39	95+shluk	82	-13	-13,68	39	m
40*	46+shluk	68+shluk	22	47,83	75	m
41	56+shluk	45	-11	-19,64	35	ž
42*	40+shluk	55+shluk	15	37,50	75	m
43	54+shluk	40	-14	-25,93	73	ž
44	72+shluk	56	-16	-22,22	74	m
45	54+shluk	39	-15	-27,78	21	m
46	59+shluk	46	-13	-22,03	56	ž
47*	39+shluk	80+shluk	41	105,13	75	m
48	93+shluk	71	-22	-23,66	72	ž
49	87+shluk	55	-32	-36,78	65	m
50	61+shluk	44	-17	-27,87	69	ž

Tab. 8 Soubor padesáti vzorků zpracované analyzátořem

* krevní vzorek od stejného pacienta

číslo vzorku	hodnoty PLT z EDTA [x10 ⁹ /l]	hodnoty PLT z citrátu [x10 ⁹ /l]	rozdíl hodnot PLT z citrátu oproti EDTA [x10 ⁹ /l]	rozdíl hodnot PLT z citrátu oproti EDTA [%]	věk	pohlaví
1	76	67	-9	-11,84	65	m
2	59	51	-8	-13,56	72	ž
3	72	66	-6	-8,33	40	ž
4	74	68	-6	-8,11	77	ž
5	78	59	-19	-24,36	62	ž
6	96	54	-42	-43,75	78	m
7	72	58	-14	-19,44	68	m
8	31+shluk	143	112	361,29	83	ž
9	92	81	-11	-11,96	78	m
10	11	9	-2	-18,18	65	m
11	36	34	-2	-5,56	62	ž
12	61	59	-2	-3,28	75	m
13	57	48	-9	-15,79	78	ž
14	77	54	-23	-29,87	63	m
15	47	37	-10	-21,28	62	ž
16	68	49	-19	-27,94	1	m
17	9	8	-1	-11,11	23	ž
18	88	67	-21	-23,86	73	ž
19	80	65	-15	-18,75	78	m
20	83	65	-18	-21,69	64	m
21	81	95	14	17,28	67	m
22	12	10	-2	-16,67	65	m
23	23	27	4	17,39	20	m
24	40	39	-1	-2,50	78	m
25	11	8	-3	-27,27	62	ž
26	14	18	4	28,57	62	ž
27	32	30	-2	-6,25	63	m
28	13+shluk	61	48	369,23	63	ž
29	16+shluk	180	164	1025,00	24	m
30	48+shluk	18	-30	-62,50	91	m
31*	55+shluk	67	12	21,82	75	m
32*	51+shluk	66	15	29,41	75	m
33	56	32	-24	-42,86	31	m
34	40	27	-13	-32,50	31	ž
35*	44+shluk	66+shluk	22	50,00	75	m
36	49+shluk	150	101	206,12	66	m

37	41	30	-11	-26,83	31	m
38	2	2	0	0,00	25	ž
39	83	75	-8	-9,64	39	m
40*	37+shluk	57+shluk	20	54,05	75	m
41	42	40	-2	-4,76	35	ž
42*	38+shluk	59+shluk	21	55,26	75	m
43	32	33	1	3,13	73	ž
44	60	49	-11	-18,33	74	m
45	52	35	-17	-32,69	21	m
46	50	41	-9	-18,00	56	ž
47*	26+shluk	47+shluk	21	80,77	75	m
48	86	52	-34	-39,53	72	ž
49	59	49	-10	-16,95	65	m
50	54	45	-9	-16,67	69	ž

Tab. 9 Soubor padesáti vzorků zpracované mikroskopem

* krevní vzorek od stejného pacienta