

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Posouzení diferenciálního rozpočtu leukocytů na
automatickém analyzátoru a mikroskopicky**

Bakalářská práce

Autor práce: Iva Bambulová
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Václava Lorencová

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2013

Abstrakt

Vyhodnocení krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem leukocytů patří k základním hematologickým vyšetřením. Z diagnostického hlediska je informace o přesném počtu leukocytů a jejich procentuálním zastoupení v krvi pacienta velmi cenná, tak jako i pro řady informací o efektu léčby chorobných stavů. Ve své bakalářské práci se věnuji mikroskopickému a přístrojovému vyšetření diferenciálního rozpočtu leukocytů a jejich srovnání z hlediska náročnosti provedení a získání co nejpřesnějších výsledků. V dnešní době se spolu s rozvojem vědy a techniky využívají ke stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů moderní hematologické analyzátoři, ovšem manuální stanovení pomocí mikroskopu zůstává i nadále základem dobré práce hematologické laboratoře. Cílem každého laboratorního stanovení je produkovat přesné výsledky pro klinické použití. Analýzy jsou většinou automatické a mezi jejich přednosti patří především rychlejší analýza, přesnost, spolehlivost a potřeba malého množství vzorku. Hlavními cíly mé bakalářské práce je vyhodnocení rozdílů za použití dvou různých metod, mikroskopické a přístrojové. Bakalářská práce je již tradičně rozdělena na část teoretickou a praktickou.

V teoretické části bakalářské práce je vysvětlen význam diferenciální rozpočet leukocytů, podrobným způsobem je zde popsána morfologie jednotlivých typů leukocytů. Zmínila jsem se o nenádorových a nádorových změnách v počtu leukocytů. V neposlední řadě je zde uveden přehled laboratorních metod, které se používají pro vyšetření krevního obrazu v rutinní hematologické laboratoři. Ke stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů se využívá metoda optická, metoda elektrické impedance, cytochemický průkaz či digitální morfologie.

V praktické části práce je popsán metodický postup vyšetření diferenciálního rozpočtu leukocytů, který jsem v rámci této práce použila. Při mikroskopickém stanovení jsem vytvořila krevní nátěr, který jsem obarvila dle návodu. Preparáty se prohlíží za použití imerzního oleje pod světelným mikroskopem. K záznamu

jednotlivých typů leukocytů se používají záznamové přístroje – leukomaty. Automatické stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů jsem prováděla na 5ti – populačním hematologickém analyzátoru Sysmex XE – 2100, založeném na principu průtokové cytometrie s možností měření vzorků z podavače uzavřeným způsobem nebo s otevřeným způsobem měření. Vyšetření diferenciálních rozpočtů leukocytů jsem realizovala v biochemicko - hematologické laboratoři synlab czech s.r.o v Českých Budějovicích. Zde jsem vyšetřila pod odborným dohledem 100 patientských náhodně vybraných vzorků venózní krve, u kterých jsem porovnávala diferenciální rozpočty leukocytů a rozdily mezi metodami. Vzorky jsem vyšetřila v měsících duben, květen roku 2012.

Výsledky získané při mikroskopickém vyšetření a naměřené pomocí analyzátoru byly statisticky zpracovány do přehledných tabulek a grafů v počítačovém programu. V grafickém znázornění porovnávám počty buněk diferenciálního rozpočtu ve 100 vzorcích na analyzátoru a pod mikroskopem. Stanovila jsem hypotézu, zda budou počty mikroskopických diferenciálů stejné jako počty od automatického analyzátoru. Vlastním měřením byly získány laboratorní výsledky, které byly po konzultaci s vedoucím práce interpretovány. Na základě výsledků jsem hypotézu zamítla.

Vlastním laboratorním vyšetřením bylo prokázáno, že klasické mikroskopické hodnocení má nepostradatelný význam při analýze patologických buněk. Záleží také na zkušenostech laboratorního pracovníka. K přednostem hematologického analyzátoru patří především rychlejší analýza, přesnost a potřeba malého množství biologického vzorku. Během praktické části bakalářské práce jsem získala praktické dovednosti při práci s biologickým materiálem a osvojila jsem si principy laboratorních metod. Výsledky mé práce lze využít obecně v klinických laboratořích při posuzování výhod, nevýhod a souvislostí mezi jednotlivými sledovanými analytickými metodami.

Abstract

Evaluation of blood count with differential leukocyte budget is a basic haematological test. From a diagnostic point of view is the information about the exact number of leukocytes and their percentage representation in the patient's blood very valuable as well as a range of informations on the effect of disease states. In my bachelor's thesis I devote to instrumentative and microscopic examination of the differential leukocyte budget and their comparing in terms of difficulty and obtaining the most accurate results. Nowadays, with the development of science and technology are used to determine differential leukocyte budget modern haematological analyzers, but the manual setting by using a microscope remains the basis of good work in haematological laboratory. The goal of each laboratory determination is to produce accurate results for clinical use. The analyzes are mostly automatic and their advantages are faster pace of analysis, accuracy, reliability and need of small volume of sample. The main objective of my thesis is to evaluate the distinction by using two different methods, microscopical and instrumentative. The thesis is traditionally divided into theoretical and practical part.

The theoretic part of the thesis explains the meaning of the differential leukocyte count, there is a detailed morfology description of different leukocyte types. I mentioned the non-neoplastic and neoplastic changes in the number of leukocytes. Last but not least, there is an overview of laboratory methods that are used for blood counts in routine haematological laboratory. To determine differential leukocyte budget is used optical method, electrical impedance method, cytochemical method or digital morphology.

The practical part describes the examination methodology of the differential leukocyte budget, which I have used in this work. I made a blood smear by microscopic assessment, which I dyed according the instructions. Preparates are viewed with oil

immersion under a light microscope. To record different leukocyte types are used recording devices - leucomats. I made automatic assessment of differential leukocyte budget in 5 - population haematological analyzer Sysmex XE - 2100 based on the principle of flow cytometry with sample measurements from the feeder closed or open way. Examination of differential leukocyte budgets was realized in biochemical and haematological laboratory synlab czech s.r.o in Czech Budweis. Here I investigated 100 randomly selected patient samples of venous blood under the professional supervision and I compared the differential leukocyte budgets and differences between methods. I investigated samples in April and May of 2012.

Results obtained by microscopic examination and by measurements on analyzer were statistically compiled into tables and graphs in a computer program. In the graphical representation comparing the differential cell counts in 100 samples of the budget of the analyzer under a microscope. I set the hypothesis that the numbers of microscopic differentials equal to those of the automatic analyzer. Laboratory results were obtained by the measurement and that results were interpreted after consultation with the supervisor. Based on the results, I rejected the hypothesis.

Own laboratory investigation showed that classic microscopic assessment has essential importance in the analysis of pathological cells. It also depends on the experience of the laboratory worker. The advantages of the haematologic analyzer are particularly rapid analysis, accuracy and need of small volume of biological sample. During the practical part of the thesis I gained practical skills in working with biological material and I embraced the principles of laboratory methods. The results of my work can be used widely in clinical laboratories in assessing the advantages and disadvantages of relationships between monitored by analytical methods.

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

.....

(podpis)

Poděkování

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala své vedoucí práce MUDr. Václavě Lorencové za cenné rady a čas, které mi po dobu bakalářské práce věnovala. Velký dík patří biochemicko – hematologické laboratoři synlab czech s.r.o. za umožnění výzkumu praktické části bakalářské práce.

OBSAH

ÚVOD	10
1. SOUČASNÝ STAV	11
1.1. Fyziologie, funkce a vývoj leukocytů	11
1.2. Diferenciální rozpočet leukocytů	12
1.3. Morfologie jednotlivých typů leukocytů v diferenciálním rozpočtu	13
1.4. Změny v počtu leukocytů	15
1.4.1. Nenádorové choroby leukocytů	15
1.4.2. Nádorové choroby leukocytů	16
1.5. Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů	16
1.5.1. Manuální metoda pomocí mikroskopu	18
1.5.1.1. Barvicí technika	18
1.5.2. Optická metoda	19
1.5.3. Metoda elektrické impedance	20
1.5.4. Cytochemická metoda	21
1.5.5. Digitální morfologie	22
2. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY	23
2.1. Cíl práce	23
2.2. Hypotézy	23
3. METODIKA	24
3.1. Preanalytická fáze	24
3.1.1. Příjem biologického materiálu do laboratoře	25

3.1.2.	Důvody pro odmítnutí zpracování biologického materiálu.....	27
3.1.3.	Vkládání identifikačních údajů do laboratorního informačního systému (LIS).....	28
3.1.4.	Vkládání biologického materiálu do analyzátoru.....	29
3.2.	Analytická fáze	29
3.2.1.	Stanovení diferenciálního rozpočtu pomocí automatického analyzátoru	30
3.2.2.	Stanovení diferenciálního rozpočtu pomocí mikroskopu.....	34
3.2.2.1.	Zhotovení a barvení krevního nátěru	34
3.3.	Postanalytická fáze.....	36
4.	VÝSLEDKY.....	37
4.1.	Srovnání dvou různých metod.....	40
4.2.	Vyhodnocení patologických buněk.....	40
5.	DISKUSE	41
6.	ZÁVĚR	43
7.	POUŽITÉ ZDROJE	44
8.	KLÍČOVÁ SLOVA	49
9.	PŘÍLOHY.....	50

Úvod

V lidské krvi se nachází základní typy leukocytů: neutrofilů, bazofilů, eozinofilů, lymfocytů, monocytů. Liší se jejich morfologie, struktura, jádro, velikost, afinita pro imunitní funkce. Metoda pro stanovení početního zastoupení jednoho typu leukocytů v krvi se nazývá diferenciální rozpočet leukocytů. Z diagnostického hlediska je informace o přesném počtu leukocytů nebo zastoupení jednotlivých morfologických typů v krvi pacienta velmi cenná. Různé patologické stavy organismu mohou mít vliv na změny počtu a rozpočtu leukocytů.

V současné době je analýza diferenciálního počtu leukocytů prováděna pomocí hematologických analyzátorů, které využívají různých principů automatického stanovení krevních buněk, ovšem nelze opomenout ani mikroskopické hodnocení nátěru periferní krve, jež se nadále v rutinní praxi používá.

Cílem každého laboratorního stanovení je produkovat přesné výsledky pro klinické použití. Analýzy jsou většinou automatizovány a mezi jejich přednosti patří především rychlejší analýza, přesnost, spolehlivost a potřeba malého množství vzorku.

Zavedení průtokové cytometrie do praxe přineslo velký pokrok při analýze diferenciálního počtu leukocytů v periferní krvi. Vzhledem k neobyčejně pestrému využití a specifčnosti stanovení jednotlivých leukocytárních populací, je metoda průtokové cytometrie doporučována odborníky jako referenční metoda pro stanovení diferenciálního počtu leukocytů do budoucna. Tato rychlá a kvantitativní technika může být užitečná i v diferenciální diagnostice akutních leukémií.

V biochemicko – hematologické laboratoři synlab czech s.r.o. v Českých Budějovicích se ke stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů používá analyzátor společnosti Sysmex XE – 2100, který je založen na principu průtokové cytometrie.

1. Současný stav

1.1. Fyziologie, funkce a vývoj leukocytů

Bílé krvinky neboli leukocyty jsou krevní buňky, které jsou nezbytnou součástí buněčné složky krve. Leukocyty jsou bezbarvé, obsahují jádro, plazmu, eventuelně granulaci, mají nepravidelný tvar. Počet leukocytů u zdravého, dospělého člověka je $4,0 - 10,0 \times 10^9/l$ krve, u novorozenců až $20 \times 10^9/l$. Zralé bílé krvinky se dělí na polymorfonukleáry, které mají členité jádro a granulaci v plazmě. Podle barvitelnosti granul se člení na neutrofilní tyče a granulocyty, eozinofilní granulocyty, bazofilní granulocyty. Druhou skupinu tvoří mononukleáry, které mají nečlenité, kompaktní jádro. Sem spadají lymfocyty, monocyty a plazmatické buňky (*Beutler et al., 2001*)

Úlohou leukocytů je obrana proti cizorodým látkám a mikroorganismům, které vnikají do organismu ať z vnějšího či vnitřního prostředí. Zneškodňování těchto látek se děje dvěma hlavními způsoby. Jedním je fagocytóza, což je pohlcování a rozkládání pohlcovaných částic. Při tomto procesu se uplatňují hlavně neutrofilní segmenty a monocyty. Druhým způsobem je zneškodnění a rozložení cizorodých částic pomocí protilátek. Rovněž důležitou společnou funkcí leukocytů je zneškodňování látek a abnormálních buněk, které vznikají v organismu samém při procesech látkové výměny, při rozpadu tkání a při chorobných procesech (*Sakalová et al., 1995*).

Na činnosti leukocytů závisí vrozená a získaná imunitní odpověď. Na získané imunitní odpovědi se podílejí zejména lymfocyty, které poskytují celoživotní imunitu. Vrozená imunita zahrnuje granulocyty a makrofágy (*Janeway et al. 2005*).

Vývoj leukocytů se nazývá leukopoéza. Leukocyty vznikají v krevtovorných orgánech. Mateřská buňka leukocytů je pluripotentní kmenová krevtovorná buňka. Při vývoji je dalším stupněm určená, už určitou úlohou pověřená kmenová buňka,

společná pro všechny druhy bílých krvinek. Pokračující diferenciací vzniká společná mateřská buňka. Bílá krevní složka má několik druhů buněk, takže její vývojová řada není jednotná. Rozeznáváme tři hlavní typy bílých krvinek: granulocyty, lymfocyty a monocyty. Podle tohoto rozdělení rozlišujeme vývojovou řadu leukocytů na řadu myeloidní, lymfocytární a monocytární (*Hrubíško, 1981*).

1.2. Diferenciální rozpočet leukocytů

Metoda pro stanovení procenta přítomnosti jednoho typu leukocytů v krvi se nazývá diferenciální rozpočet leukocytů. Z diagnostického hlediska je informace o přesném počtu leukocytů nebo jejich procentuálním zastoupení v krvi pacienta velmi cenná (*Mirčić, 2006*).

Významnou součástí základního laboratorního vyšetření u pacientů je posouzení bílého krevního obrazu. Diferenciální rozpočet leukocytů stanovuje zastoupení jednotlivých podtypů leukocytů, ke kterým patří neutrofilů, lymfocytů, monocytů, eozinofilů, bazofilů (*Krč, 2004*).

Mikroskopický diferenciální rozpočet leukocytů se v běžné laboratorní praxi provádí zhodnocením 100 leukocytů. Výsledek se vyjadřuje procentuálním zastoupením, eventuálně relativním počtem a absolutním počtem, který je vztažen k celkovému počtu leukocytů (tab. 1). I při fyziologickém celkovém počtu leukocytů může být určitá linie zmnožena nebo naopak zastoupena menší měrou. U některých onemocnění bývá charakteristická změna v procentuálním zastoupení určitých typů leukocytů.

Tab. 1 Fyziologické hodnoty diferenciálního rozpočtu leukocytů u dospělého člověka

Leukocyty	% zastoupení	Absolutní počet
Neutrofilní segmenty	45 - 70	2,00 – 7,00
Neutrofilní tyče	0 - 4	0,00 – 0,40
Lymfocyty	20 - 45	0,80 – 4,00
Monocyty	2 - 12	0,08 – 1,20
Eozinofily	0 – 5	0,00 – 0,50
Bazofily	0 - 2	0,00 – 0,20

1.3. Morfologie jednotlivých typů leukocytů v diferenciálním rozpočtu

V diferenciálním rozpočtu je fyziologicky nejvíce zastoupený **neutrofilní granulocyt** (neutrofilní segment, neutrofil), který je 10 – 15 μm velký. V obvodové krvi se jich nachází 45 – 70 %. Jádru se skládá z 2 – 5 fragmentů, navzájem spojených úzkým můstkem chromatinu. Pokud je více jak 5 fragmentů, mluvíme o hypersegmentaci jádru. Jaderný chromatin je hutný, shluklý. Plazma neutrofilního granulocytu se barví růžově, obsahuje granula. Granulocyty představují první obrannou linii těla proti vniklým bakteriím. Mají vlastnost chemotaxe (Novotný, 2005).

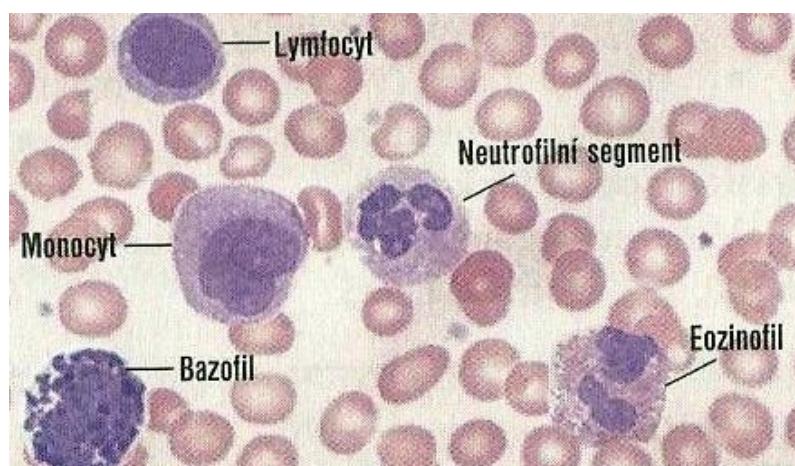
Eozinofilní granulocyt (eozinofil) je často větší než neutrofil (10 – 18 μm). Jádru je chudší na chromatin, takže má světlejší barvu. Tvarem se podobá brýlovitým, činkovitým segmentům. Plazma je vyplněná hrubými eozinofilními granulacemi, které se barví hnědočerveně. V obvodové krvi bývá 0 – 5 % eozinofilů.

Bazofilní granulocyt (bazofil) má velké, málo se barvící jádro s malým množstvím chromatinu. Jádru je většinou tvořeno dvěma skoro polokulovitými segmenty, jindy má podobu jetelového lístku. Plazma je růžová se zvláštním hnědým

odstínem, obsahující červenomodrá granula. Má nejmenší zastoupení v obvodové krvi 0 -2 %.

Lymfocyt je druhá nejvíce zastoupená buňka v diferenciálním rozpočtu, v krvi zaujímá 20 – 45 %. Může být velikostně různorodá, proto je rozdělujeme na malé, střední a velké. Jádro má oválný, někdy promáčklý tvar, je bohaté na chromatin, barví se modrofialově. Cytoplazma je modrá, směrem k jádru se zesvětluje.

Monocyt je největší bílou krvinkou v obvodové krvi. Má tvar kulatý nebo vejčitý, jádro je poměrně velké, uložené lehce excentricky, připomínající tvar ledviny, či fazole. Jádro má málo chromatinu, proto se barví světle modrofialově. Plazmy je hodně a je kouřově modrá. Za fyziologických podmínek může mít vakuoly. Monocyt patří k hlavnímu obrannému systému fagocytárním a mění svůj tvar podle pohlcované látky. V obvodové krvi činí 2 – 12 % (Donner, 1985).



Obr. 1 Morfologické typy leukocytů

(Zdroj: Pecka, 2010)

1.4. Změny v počtu leukocytů

Za chorobných stavů nastávají změny v bílém krevním obrazu. Změny mohou být jednak kvantitativní, ty se týkají změn v počtu leukocytů a jednak mohou být kvalitativní, u nichž může jít o změny ve vzájemném poměru jednotlivých druhů leukocytů anebo o změny jejich funkce. Změny bývají vrozené či získané. Získané změny jsou buď přechodné, např. zvýšení počtu leukocytů při infekčních chorobách, anebo trvalé, např. změny bílého krevního obrazu při leukémii (*Hrubíško, 1981*).

1.4.1. Nenádorové choroby leukocytů

Pod pojmem leukocytózy se rozumí zmnožení, zvýšení počtu leukocytů nad $10^x \cdot 10^9/l$. U lehkých leukocytóz jde většinou o zvýšení počtu neutrofilů, tedy neutrofílie, která provází bakteriální a mykotické infekce, záněty, při intoxikaci těžkými kovy nebo léky (*Češka a kol., 2010*). Zvláštním případem leukocytózy je tzv. leukemoidní reakce, při níž dochází ke zvýšení počtu leukocytů i k posunu v diferenciálním rozpočtu. Přítomny mohou být i méně zralé formy, které se za normálních okolností v krvi nevyskytují (metamyelocyty, myelocyty).

Posun doleva je posun v diferenciálním rozpočtu k nezralým formám, bývá např. u bakteriálních infekcí, zánětů žil, u nemoci pojiva.

V případě, kdy je snížený počet leukocytů pod $4^x \cdot 10^9/l$ hovoříme o leukopenii. Snížení se může týkat kteréhokoliv druhu bílých krvinek, ale nejčastěji se jedná o neutropénii či agranulocytózu. Jako agranulocytózu označujeme náhlé snížení až vymizení granulocytů z krevního obrazu, provázené obvykle projevy prudké infekce (*Penka, 2001*).

Změny v počtu ostatních typů bílých krvinek mají menší význam. Monocytóza se vyskytuje u infekcí ve 2. fázi, u hematologických chorob jako doprovodný příznak dalších nemocí, je běžná u tuberkulózy. Eozinofílie provází infekce vyvolané parazity, alergická onemocnění, kožní choroby (*Kubisz a kol., 2006*).

S lymfocytózou se setkáváme hlavně u virových onemocnění. Nejčastější nenádorovou chorobou leukocytů je infekční mononukleóza („studentská nemoc“), způsobená virem Epstein a Barrové (EBV). Vyskytuje se hlavně u mladých lidí, kteří nemají protilátky proti EBV. V krevním obrazu nacházíme na začátku onemocnění mírnou leukocytopenii, která přechází do leukocytózy. V diferenciálním rozpočtu nacházíme velké množství lymfocytů, s přítomností reaktivních lymfocytů, což jsou transformované T - lymfocyty. Reaktivní lymfocyty nejsou vždy snadno identifikovatelné, mohou být zaměněny s monocytoidními buňkami nebo mladými lymfocyty (*Lexová, 2000*).

1.4.2. Nádorové choroby leukocytů

Mezi nádorové choroby leukocytů se řadí leukémie. Představují stavy s chorobně změněnou, nádorovou krvetvorbou. Podstatou leukémie je nekontrolovatelné bujení hemopoetických buněk, které je charakterizované zástavou vyžrávání a nekontrolovatelnou proliferací buněk bílé řady. Výsledkem je hromadění nádorových buněk, které postupně vytlačují normální krvetvorbu. Proliferace vzniká jako následek mutace v jediné hemopoetické kmenové buňce z které se pak formuje leukemický klon. Buňka, která podlehe leukemické transformaci, může být myeloidní prekurzorová buňka či lymfoidní prekurzor anebo buňka, která je schopna diferenciaci do obou řad (myeloidní a lymfoidní). Z hlediska průběhu se leukémie dělí na akutní, chronické (*Friedmann, 1994*).

1.5. Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů

Existují studie, které testovaly přesnost a spolehlivost některých hematologických analyzátorů při stanovení diferenciálního počtu leukocytů a označení významných patologických abnormalit. Prokázaly velmi dobrý vztah naměřených výsledků pomocí analyzátorů s výsledky odečtenými při mikroskopickém hodnocení diferenciálního

rozpočtu. Stále je otevřenou otázkou kdy analyzovat diferenciální rozpočet leukocytů na analyzátoru či odečítat mikroskopicky (*Hyun, 1991*).

Kdy tedy „sáhnout“ po přístrojovém a kdy zvolit mikroskopický diferenciál? Kterým číslem „věřit“? Ve většině případů je preferován diferenciál přístrojový. Není to proto, že by si snad laboratoř chtěla ušetřit práci. Důvodem je jednak rychlost – jeden vzorek změřen za 30-60 s – a hlavně přesnost. Čím větší počet buněk je hodnocen, tím je výsledek přesnější. Při mikroskopickém hodnocení je diferenciál běžně počítán na 100 leukocytů, což trvá zhruba 5 minut (*Hrabcová, 2010*).

V moderních nemocnicích nahradily hematologické automatizované přístroje ruční metody pro stanovení hematologických parametrů i mikroskopické počítání diferenciálního rozpočtu leukocytů. Důvodem je přesnější detekce vzorků s distribučními nebo morfologickými odchylkami, než tradičním počítáním očima (*Pierre, 2002*).

V současné době je analýza diferenciálního počtu leukocytů prováděna pomocí hematologických analyzátorů, které využívají různé principy stanovení krevních buněk. I přes nevýhody má klasické mikroskopické hodnocení nepostradatelný význam při analýze patologických buněk (*Barnes, 2005*).

Základem správně provedených kontrolních procesů v hematologické laboratoři je důsledné dodržování nastavených jednoznačných pravidel vnitřní (interní) kontroly kvality, která laboratoři dávají integritu, minimalizují chyby, zabezpečují shodu a spolehlivost. Cílem každého laboratorního stanovení je produkovat přesné výsledky pro klinické použití. Analýzy jsou většinou automatické a mezi jejich přednosti patří především rychlejší analýza, přesnost, spolehlivost a potřeba malého množství vzorku (*Buttarrelo, 2004*).

1.5.1. Manuální metoda pomocí mikroskopu

Mikroskopickou techniku rozpoznávání různých typů bílých krvinek poprvé zavedl Paul Ehrlich v roce 1878. Rozpoznával krvinky obarvené pomocí anilinových barviv.

Krevní nátěry se provádí z kapilární nebo žilní krve. Jako antikoagulační přísady se používá soli K_2 i K_3 EDTA. Nátěry je nezbytné provést do 5 hodin po odběru (uvádí Česká hematologická společnost ČLS JEP), jinak může dojít ke změnám v některých krevních buňkách. K hodnocení je nutné použít kvalitní nátěry.

Pro morfologické hodnocení jednotlivých buněčných typů bílé řady se hodnotí zvlášť buňka, jádro a plazma. U buňky se hodnotí tvar, velikost, vzhled, umístění v nátěru a porovnává se s ostatními buňkami. U jádra se posuzuje tvar, uložení, uspořádání chromatinu, velikost, vzhled a velikost jadérek. U plazmy se sleduje barvitelnost, množství, vzhled, perinukleární vyjasnění, granulace a inkluze. Při hodnocení periferního krevního obrazu se dále zjišťuje zastoupení normoblastů, které je nutné, pro následný přepočítání leukocytů. Prozkoumává se také posun v rámci vyžívání buněčných forem (Pecka, 2006).

1.5.1.1. Barvicí technika

Techniku barvení mikroskopických preparátů pomocí speciálních barviv zavedl poprvé Artur Pappenheim. Používal anilinová barviva s obsahem azuru.

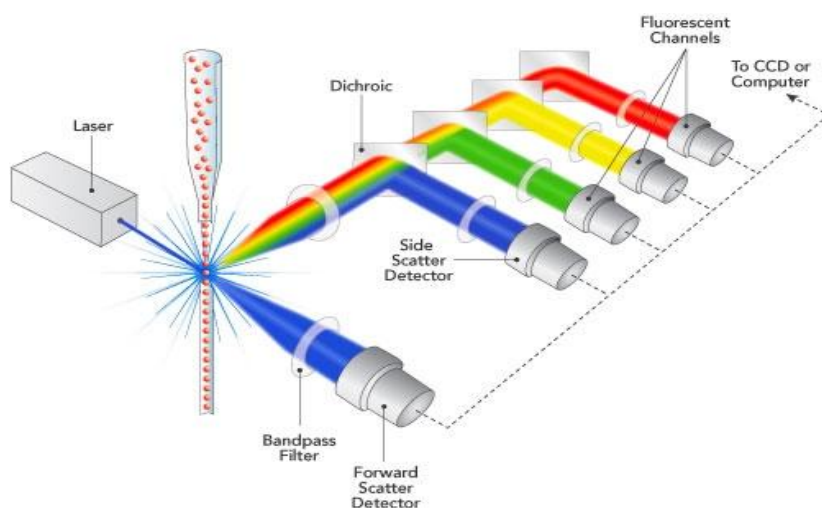
Nátěry periferní krve jsou barveny panoptickým barvením dle Pappenheima s použitím barviv May – Grünwald a Giemsa Romanovski. Pappenheimova metoda se skládá ze zhotovení, fixace, barvení a hodnocení nátěru. Při barvení dochází k odlišení jednotlivých struktur podle jejich pH (Budayová, 2007).

Rozpočet leukocytů se provádí nejméně na 100 jaderných buněk leukocytární řady. Preparáty se prohlíží pod světelným mikroskopem, nejprve při malém zvětšení (100 – 200 násobné). K záznamu jednotlivých buněčných typů se dnes používají speciální

záznamové přístroje - leukomaty, které v konečné fázi provedou i kalkulaci výsledku (Pecka, 2010).

1.5.2. Optická metoda

Optická detekce využívá principu průtokové cytometrie. Průtoková cytometrie je využívána k analýze chemických a fyzikálních vlastností buněk. Při analýze prochází měřený vzorek před samotným procesem měření preanalytickou úpravou. Buňky jsou následně obarveny fluorescenčním barvivem. Takto připravené jsou vstřikované pomocí hydrodynamické fokusace do průtokové komory, zde jsou prosvíceny laserovým paprskem. Každá buňka vykazuje specifické charakteristiky signálů, které jsou zaznamenány fotodetektory. Lineárně rozptýlené záření, které dopadá na detektor, umístěný v ose dopadajícího paprsku se nazývá Forward scatter (FS). Tento parametr určuje velikost částice. Čím větší je rozptyl světla, tím větší je částice. Bočně rozptýlené záření, které dopadá na detektor umístěný kolmo na osu dopadajícího paprsku, se nazývá Side scatter (SS). Je to parametr, který určuje granularitu částice (Roubalová, 2012).



Obr. 2 Schéma průtokové cytometrie

(Zdroj: Roubalová, 2012)

Jako příklad bych uvedla analyzátor Sysmex XE – 2100. Jedná se o plně automatický hematologický analyzátor využívající fluorescenční průtokovou cytometrii ke stanovení pětipopulačního diferenciálu. *Sysmex XE - 2100* má další diferenciální parametr a to parametr nezralých granulocytů.

Ve srovnání počtu nezralých granulocytů na analyzátoru *Sysmex XE - 2100* k manuální metodě byl korelační koeficient malý. *Sysmex XE - 2100* prokázal srovnatelný výkon s manuální metodou pro nezralé granulocyty (*Field, 2006*).

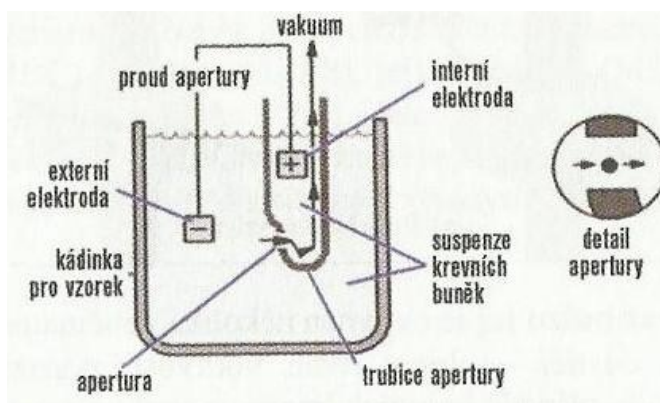
V posledních několika letech se intenzivně zkoumají povrchové buněčné markery, s využitím vysoce specifických monoklonálních protilátek. Pomocí protilátek označujeme v buněčných populacích ty buňky, které mají na svém povrchu sledovaný znak. Tyto cytoplazmatické znaky jako tzv. diferenciační znaky (*Clusters of Differentiation - CD*) umožňují určovat specifické buněčné subpopulace - například $CD4^+$ T lymfocyty značené monoklonální protilátkou proti znaku $CD4$ na jejich povrchu (*Brown, 2000*). Pomocí navázaných fluorescenčních barviv rozdělujeme populaci na jednotlivé subpopulace. Pro stanovení jednotlivých populací leukocytů se kombinují různé monoklonální protilátky. Tento postup je běžně užíván při typizaci leukémií (*Boudal, 2008*).

1.5.3. Metoda elektrické impedance

Elektrická impedance je metoda pro stanovení počtu a velikosti částic v kapalině. U impedančního principu se naředěná suspenze krevních částic vhájí do měřicí kyvety. Uvnitř i vně kyvety je polarizované stejnosměrné elektrické pole. Buňka v detekční komůrce, naplněné vodivým roztokem prochází měřicí aperturou, kterou prochází stejnosměrný proud mezi dvěma elektrodami. Každá buňka suspendovaná ve vodivé kapalině funguje jako izolátor. Buňka průchodem přes aperturu způsobí změnu v odporu mezi elektrodami, tato změna iniciuje vznik signálu, který je přímo úměrný velikosti buňky. Nevýhodou impedančního systému je, že je měřena prakticky každá

částice nebo změna prostředí v daném systému, tedy i prachové částice, krystalky v roztoku nebo vzduchové bubliny (Penka, 2011).

Na principu elektrické impedance pracuje analyzátor Beckman Coulter LH 750. Tento analyzátor využívá k identifikaci buněk kombinaci tří měření: objemu, vodivosti, rozptylu. Tyto parametry může využít i pro vyhodnocení jejich morfologických změn (Miguel et al. 2007).



Obr. 3 Impedanční princip

(Zdroj: Pecka, 2010)

1.5.4. Cytochemická metoda

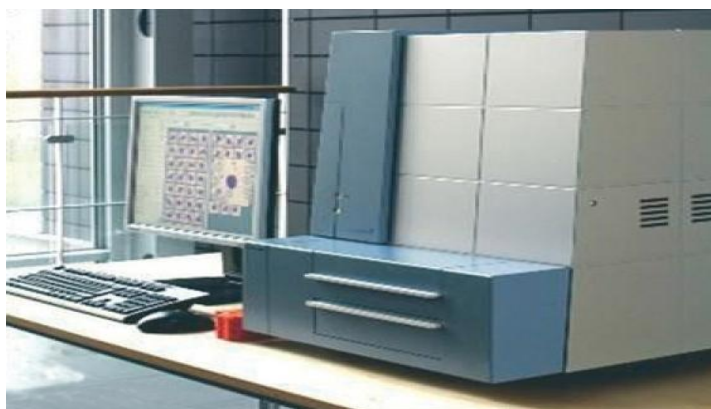
Průkaz bílých krvinek podle aktivity jejich nitrobuněčných lysozomálních enzymů pomocí cytochemie zavedl Hayohe v r. 1958.

Cytochemické metody se používají k průkazu látek specifických chemických reakcí. Cytochemický průkaz hodnocené složky může probíhat buď přímo, kdy cytochemická reakce prokazuje přímo hledanou složku nebo nepřímo, kdy hledaná složka (enzym) přeměňuje substrát na produkt a z množství obarveného produktu se usuzuje na aktivitu enzymu. Tuto metodu lze využít ke sledování nezralých buněk u akutních myeloidních leukémií. K diferenciálu bílých krvinek je určena peroxidázová metoda, protože v několika typech leukocytů je přítomen aktivní enzym peroxidáza. Peroxidázy jsou enzymy, které mají ve své molekule zabudovanou strukturu hemu.

Leukocyty jsou klasifikovány podle charakteristických vlastností projevovaných buněčnými složkami při aplikaci cytochemických barviv na buňky. V přítomnosti peroxidu vodíku a příslušného chromogenu peroxidáza vytváří tmavě zbarvený materiál, který se sráží uvnitř buněk. Normální neutrofilů a eozinofilů vykazují vysoké úrovně aktivity peroxidázy. Aktivita enzymů odpovídá zralosti buněk (*Pecka, 2006*).

1.5.5. Digitální morfologie

Dnešní medicína je založena na vyspělých informačních a komunikačních technologiích včetně digitalizace obrazu a jeho analýzy. Jedním z automatizovaných systémů pro digitální hodnocení krevních obrazů je přístroj CellaVision DM96 firmy Sysmex. Slouží k rozřazení a diagnostice leukocytů v krevním nátěru barveném metodou May Grünwald a Giemsa Romanowski. K detekci a snímání buněk slouží kamera připojená na upravený mikroskop uvnitř přístroje. Tyto dvě části zaznamenávají jednotlivé buňky a pomocí počítačového systému jsou informace přeneseny do přídatného počítače. Zařízení pracuje na klasickém principu využití lomu světla, kdy je obraz zvětšován dvěma sadami spojných čoček, objektivem a okulárem. Obraz buněčného nátěru je přenášen elektronicky kamerou do počítače, kde je následně zpracován. Přítomná kamera skenuje buňky a rozděljuje je na jednotlivé obrázky, které si lze v počítači následně prohlédnout. Celý proces se nazývá digitální morfologie. Vše je automatizováno a elektronicky zpracováno (*Cornet, 2007*).



Obr. 4 CellaVision DM96

(Zdroj: *Cornet, 2007*)

2. Cíl práce a hypotézy

2.1. Cíl práce

Cílem bakalářské práce je:

- vyhodnocení rozdílů za použití dvou rozdílných metod
- vyhodnocení diferenciálního počtu leukocytů pomocí automatického analyzátoru a mikroskopického odečtu

2.2. Hypotézy

Hypotéza 1. Počty subpopulací leukocytů z mikroskopických diferenciálů budou stejné jako počty z automatického analyzátoru.

3. Metodika

V praktické části popisují postupy stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů na automatickém analyzátoru a při mikroskopickém odečtu. Vyšetřila jsem 100 vzorků venózní krve v biochemicko – hematologické laboratoři synlab czech s.r.o. v Českých Budějovicích, z nichž jsem získala data potřebná k výsledkům.

3.1. Preanalytická fáze

Pro získání spolehlivého výsledku laboratorního vyšetření je nutné dodržet veškeré podmínky před vlastním analytickým stanovením. Preanalytická fáze zahrnuje přípravu pacienta, vlastní odběr, zaslání označeného, odebraného materiálu včetně správně vyplněné žádanky o laboratorním vyšetření do laboratoře, transport, eventuelně skladování před provedením analýzy. Z hlediska možného ovlivnění výsledků je preanalytická část nejdůležitější.

Laboratorní preanalytická fáze začíná příjmem biologického materiálu do laboratoře a končí vložení analytických vzorků do příslušného analyzátoru.

Tato fáze zahrnuje kroky:

- Příjem a identifikace biologického materiálu
- Vložení identifikačních údajů do LIS
- Označení biologického vzorku čárovým kódem
- Roztřídění analytických vzorků pro jednotlivá pracoviště
- Vložení analytického vzorku do analyzátoru

(Dastych, 2008)

Faktory ovlivňující preanalytickou fázi:

- Příprava pacienta před odběrem – pacient by měl být správně poučen a připraven, před odběrem je doporučeno být nalačno a nekouřit
- Odběr biologického materiálu – vlastní odběr může být ovlivněn dobou odběru, polohou pacienta při odběru, typem odběrových zkumavek, druhem odebírané krve a technikou odběru
- Biologické vlivy – mohou být neovlivnitelné (věk, pohlaví, rasa, gravidita) a ovlivnitelné (hmotnost, životní styl, cvičení, léky, alkohol, stres)
- Transport biologického materiálu – se zajišťuje prostřednictvím vlastní svozové služby, která je vybavena pro přepravu biologického materiálu a dodržuje podmínky nutné pro transport
- Uchovávání materiálu před analýzou – podmínky uchovávání vzorku mají stejně jako transport vliv na stabilitu analytů

3.1.1. Příjem biologického materiálu do laboratoře

Většina laboratoří má vyčleněné příjmové pracoviště. Na příjmovém pracovišti je laboratorní práce velmi zodpovědná. Nejzávažnější chybou, která může nastat, je záměna vzorků.



Obr. 5 Příjmové pracoviště

(Zdroj: vlastní foto)

Svoz biologického materiálu pro laboratorní vyšetření zajišťuje laboratoř synlab czech s.r.o. prostřednictvím vlastní svozové služby, která je vybavena pro přepravu biologického materiálu a dodržuje podmínky nutné pro transport biologického materiálu dle doporučení odborných společností. Auta svozové služby jsou vybavena chladicími boxy, ve kterých je udržována a pravidelně kontrolována předepsaná teplota. Při transportu materiálu na některá speciální vyšetření musí být použita ledová lázeň. Odvoz vzorků z ordinace je prováděn v předem sjednaných termínech. Z transportních boxů vyjme přebírající pracovník – pracovník příjmu biologický materiál se žádankami.

Vzorky pro vyšetření celkového krevního obrazu (tj. počet erytrocytů, hemoglobinu, hematokritu, trombocytů a leukocytů, včetně 5ti – populačního diferenciálního rozpočtu leukocytů) se odebírají do zkumavky s antikoagulačním přípravkem K_2 nebo K_3EDTA (vakuety s fialovým uzávěrem). Nejprve přiřazujeme biologický materiál k laboratorním žádankám (*příloha č. 1*). Při přiřazování pečlivě dbáme na shodu údajů na zkumavce biologického materiálu a na žádance. Žádanka musí být řádně vyplněná, a to i z důvodu úhrady vyšetření, které se vyžaduje od zdravotní pojišťovny. Identifikační údaje musí být jednoznačně shodné. Pokud nesouhlasí jméno, příjmení, rodné číslo, materiál se dále zpracovat nemůže, hrozí poškození pacienta. Kontrolujeme nejen údaje na žádance, ale i druh odběrové zkumavky a množství odebraného biologického materiálu vzhledem k požadovaným

vyšetřením. Dochází i k chybnému odběru, kdy je odběr proveden do nesprávné zkumavky. Stává se, že biologického materiálu ve zkumavce je málo, pak laboratoř požádá o nový odběr.



Obr. 6 Odběrové zkumavky s EDTA

(Zdroj: vlastní zdroj)

3.1.2. Důvody pro odmítnutí zpracování biologického materiálu

Laboratoř odmítne přijmout biologický materiál a žádanku pokud:

- žádanka neobsahuje všechny nutné údaje o pacientovi a zadávajícím lékaři (rodné číslo pojištěnce, příjmení a jméno, diagnóza, zdravotní pojišťovna, identifikační číslo zařízení (IČZ) lékaře a jeho odbornost, datum a čas odběru) a pokud není možné je doplnit telefonickým kontaktováním ordinace lékaře
- laboratoř požadovaná vyšetření neprovádí ani nezajišťuje přesměrování vzorků do smluvních laboratoří
- žádanky nebo odběrové zkumavky jsou silně znečištěny biologickým materiálem (údaje jsou nečitelné)
- biologický materiál je nedostatečně označen, neshoduje se s údaji na žádance nebo identifikační údaje zcela chybí; v těchto případech nelze materiál zpracovat, protože hrozí záměna a poškození pacientů

V případech dodání biologického materiálu bez žádanky je možné po telefonické domluvě s ordinací zadávajícího lékaře vypsát žádanku náhradní a požadovaná vyšetření provést, lékař musí v těchto případech zaslat do laboratoře dodatečnou žádanku (Zahradníková, 2008).

3.1.3. Vkládání identifikačních údajů do laboratorního informačního systému (LIS)

S neustálým rozvojem informační technologie se do většiny laboratoří zavedl tzv. laboratorní informační systém. Tento systém nám pomáhá shromáždit a zpracovat laboratorní data, vytvořit laboratorní výsledky a v tištěné podobě je předat ošetřujícímu lékaři nebo je lze i zaslat elektronicky. Laboratoř synlab czech s.r.o. využívá laboratorní informační systémy PROMED a SELMA. Selma umožňuje příjem vzorků, zápis žádanek. Promed komunikuje s analyzátory a se Selmou.

Po kontrole přijatého materiálu vložíme údaje ze žádanky do laboratorního informačního systému. Ten každému pacientovi přidělí laboratorní číslo a současně zaznamená datum a čas zápisu. Do systému vložíme jméno a příjmení, rodné číslo, název klinického pracoviště, číselný kód diagnózy, kód pojišťovny a identifikační číslo ordinujícího lékaře. Poté navolíme požadovaná vyšetření, která vkládáme do systému prostřednictvím zkratk názvů jednotlivých vyšetření.

Je zapotřebí si uvědomit, že při ručním zadávání dat do počítače mohou vzniknout nechtěné překlipy či dokonce chyby, které musíme minimalizovat pravidelnými kontrolami všech vložených údajů. Po důkladné kontrole ručně zadaných údajů vytiskneme z laboratorního informačního systému samolepící štítky s identifikací pacienta a čárovým kódem.



Obr. 7 Samolepící štítek - DIFF

(Zdroj: vlastní foto)

3.1.4. Vkládání biologického materiálu do analyzátoru

Zkumavky označené čárovým kódem, umístíme do speciálních stojánek. Stojánky vložíme do pracovní části analyzátoru Sysmex XE - 2100. Stiskneme tlačítko START a tím se zahájí vlastní analýza. Na vstupu stojánku do pracovní části analyzátoru dochází k načtení identifikačního čárového kódu a následně k přenosu informace o požadovaných analýzách z laboratorního informačního systému. Další zpracování a doprava analytického vzorku je zajištěna automatizovatelnými prvky uvnitř analyzátoru. Výsledek analýzy je opět automaticky přenesen do laboratorního informačního systému a po technickém uvolnění laborantem a lékařské validaci vytisknut v podobě laboratorního výsledku.



Obr. 8 Zkumavky ve speciálním stojánku
(Zdroj: vlastní foto)

3.2. Analytická fáze

Analytický proces probíhá automatizovaným nebo manuálním provedením jednotlivých metod. Pro správný a přesný výsledek analýzy je nezbytně nutné dodržení zásad správné laboratorní práce. Dbá se na manipulaci a uchovávání vzorků před analýzou, skladování a kontrolu používaných reagenčních setů. Kontroluje se údržba a sledování správné funkce analytické instrumentální techniky (Dastych, 2008).

3.2.1. Stanovení diferenciálního rozpočtu pomocí automatického analyzátoru

Vlastní měření vzorků bylo provedeno na hematologickém analyzátoru Sysmex XE – 2100. Jedná se o plně automatický hematologický analyzátor využívající fluorescenční průtokovou cytometrii ke stanovení pětipopulačního diferenciálu. Pětipopulační diferenciál rozlišuje v bílé řadě lymfocyty, monocyty, bazofily, eozinofily a neutrofilů. Sysmex XE - 2100 má další diferenciální parametr a to parametr nezralých granulocytů (immature granulocyte = IG). V případě nezralých granulocytů, patologických vzorků, jiných buněčných typů nebo abnormalit, analyzátor poskytuje informace formou textového hlášení. Nedílnou součástí analyzátoru je PC, LCD monitor, podavač s prostorovou čtečkou čárového kódu jednotlivého vzorku, tiskárna. Automatická analýza umožňuje výkon až 150 krevních vzorků za hodinu.



Obr. 9 Hematologický analyzátor Sysmex XE – 2100

(Zdroj: <https://www.sysmex.com/us/en/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx>)

Sysmex XE – 2100 může analýzu provést ve 4 režimech - automatickém, manuálním, kapilárním a uzavřeném systému. V manuálním režimu se ručně odstraní uzávěr zkumavky a vzorek se nasaje pipetou pro sání plné krve. V kapilárním režimu se analýza vzorku provede po zředění dilučním roztokem v poměru 1:5. Tento režim se používá pro analýzu krve z prstu. Krev se nasává stejným způsobem jako u manuálního

režimu. V automatickém režimu podavač automaticky míchá, saje a analyzuje vzorky bez odstranění zátky ze zkumavky. Podavač může pojmout a zpracovat až 100 vzorků najednou. V uzavřeném režimu podavač saje vzorek bez otevření zkumavky. Míchání a kontinuální analýzu nelze provádět automaticky.

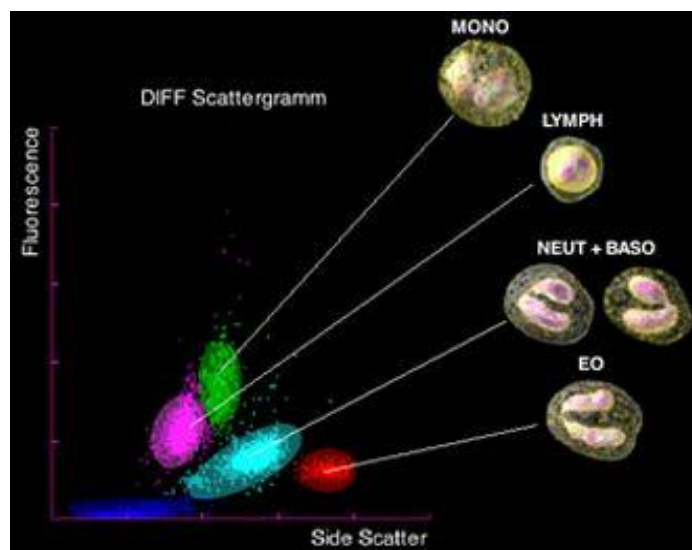
- Automatická analýza

Krev na hematologické vyšetření krevního obrazu se odebírá zásadně do zkumavky s antikoagulačním činidlem K_2 nebo K_3EDTA (vakueta s fialovým uzávěrem). Vzorky jsou označeny čárovým kódem. Před vložením biologických vzorků do analyzátoru je musíme nechat promíchat několikanásobným otočením zkumavky o 180° ve vertikální ose, aby došlo k plynulému promísení obsahu zkumavky. Poté zkumavky dáme do speciálního stojánku, stojánek vložíme do zásobníku po pravé straně analyzátoru, odkud je automaticky posouván. Vzorek je automaticky aspirován pomocí jehly, která pronikne víčkem vakuety a současně je identifikován čárový kód. Hodnocení velikosti a počtu, hustoty jádra, cytoplazmy, granul a obsahu nukleových kyselin v buňkách leukocytů probíhá v „DIFF“ kanálu.

- DIFF kanál

Do měřicího kanálu DIFF je vstřikováno společně s buněčnou suspenzí činidlo Stromatolyser - 4DL, které způsobuje hemolýzu červených krvinek a trombocytů. U bílých krvinek toto činidlo způsobí jemnou perforaci buněčné membrány avšak jejich tvar a velikost zůstávají pro následné měření zachovány. Následně dávkované fluorescenční barvivo Stromatolyser - 4DS díky perforované membráně leukocytů snadno pronikne do buňky a naváže se na DNA, RNA obsažené v jádře, cytoplazmě a v dalších buněčných organelách. Buňka prochází průtokovou kyvetou a reaguje s laserovým paprskem. Signály z buňky jsou zpracovány detektory Side Fluorescence a Side Scatter. Po změření všech vzorků je kazeta posouvána směrem od místa aspirace a nakonec je uložena do zásobníku na levé straně analyzátoru.

Výsledkem je rozptylový graf buněčných populací – scattergram. Měřené parametry: WBC, NEUT, LYMPH, MONO, EO, BASO, další informační parametr IG (immature granulocyte) jsou vyjádřeny v procentech a v absolutních hodnotách. WBC udává celkový počet leukocytů, NEUT % udává počet neutrofilů na 100 leukocytů (WBC), stejným způsobem jsou vyjádřeny parametry LYMPH % (lymfocyty), MONO % (monocyty), EO % (eozinofily), BASO % (bazofily).



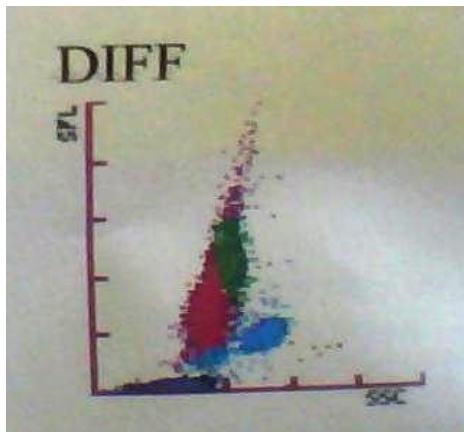
Obr. 10 Scattergram DIFF kanálu

(Zdroj: <http://www.sysmex-europe.com/index.asp?id=105>)

Analyzátor upozorňuje hlášením na možnou patologii nebo interferenci měření

- WBC Blasts ? suspektní přítomnost blastů
- Imm Gran? suspektní přítomnost nezralých forem myeloidní řady (promyelocytů, metamyelocytů nebo myelocytů)
- Left Shift ? posun doleva (přítomnost tyčí)
- Atypical Lympho? přítomnost atypických lymfocytů – aktivované lymfocyty, plazmatické buňky, virocyty
- NRBC? přítomnost normoblastů
- Abn Lympho/Blasts přítomnost atypických lymfocytů (př.vlasaté buňky..), a/nebo blastů

Na obr. 11 uvádím příklad, kdy analyzátor upozornil na možnou patologii: Lymphocytosis, Monocytosis, Basophilia, Blasts?, Atypical Lympho?, Abn Lympho/Blasts?, NRBC?



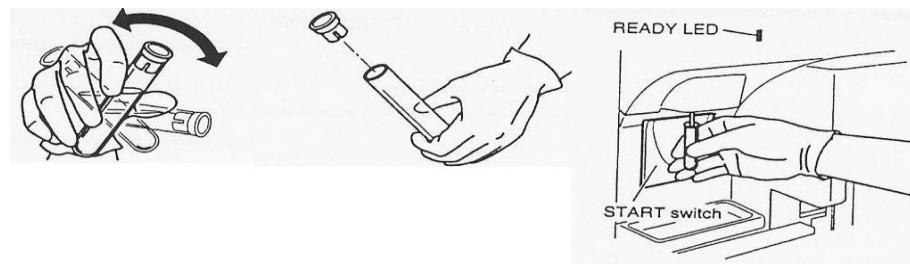
Subpopulace leukocytů	% zastoupení
Neutrofily	22
Lymfocyty	65
Monocyty	12
Eozinofily	0
Bazofily	1

Obr. 11 Scattergram DIFF

(Zdroj: vlastní foto + měření z analyzátoru)

- Manuální analýza

V tomto režimu musíme nechat biologický vzorek ručně promíchat, pomocí čtečky načteme ID číslo pacienta. Na displeji analyzátoru zvolíme tlačítko MANUAL. Odstraníme zátku ze zkumavky, vložíme vzorek k pipetě pro ruční sání. Poté stiskneme tlačítko START, vzorek neodkládáme dokud svítí READY LED dioda, protože se krev nasává. Po zhasnutí diody odejmeme zkumavku a nasávací pipeta se automaticky opláchne.



Obr. 12 Manuální analýza

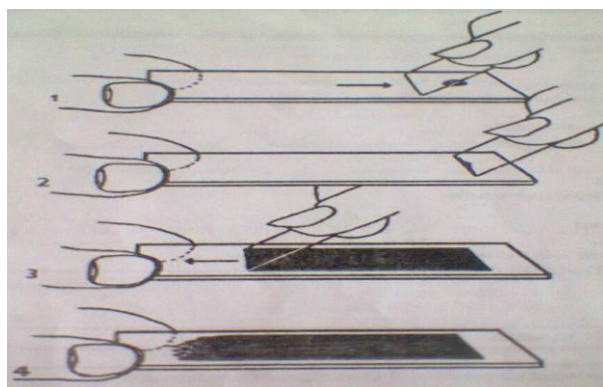
(Zdroj: Sysmex XE – 2100 Operator's Manual, 1999)

3.2.2. Stanovení diferenciálního rozpočtu pomocí mikroskopu

Při diferencování se zjišťuje početní zastoupení jednotlivých morfologických typů buněk bílé krevní řady v obarveném nátěru. Při pozorování nátěru mikroskopem jsou v celkovém počtu 100 leukocyty tříděny podle typu. Současně se posuzuje i morfologie elementů všech krevních řad. Správně obarvený nátěr by měl mít růžovofialovou barvu. Přebarvené nátěry jsou modrofialové, málo obarvené jsou červenorůžové. Při mikroskopickém odečtu jsem používala světelný mikroskop Olympus CX21 a k záznamu jednotlivých buněčných typů leukomat Super L2, který v konečné fázi provedl kalkulaci výsledku.

3.2.2.1. Zhotovení a barvení krevního nátěru

Na odmaštěné podložní sklíčko nanese dostatečně velkou kapku krve. Umístíme ji při okraji kratší strany podložního sklíčka (asi 1/8 délky podložního sklíčka). Roztírací sklíčko posuneme směrem ke kapce vzorku, kratší hranu roztíracího sklíčka ponoříme do kapky a vzorek necháme rozlít po celé kratší hraně roztíracího sklíčka (úhel mezi podložním a roztíracím sklíčkem musí být 30 - 45°). Kapku poté roztáhneme směrem k druhému konci podložního sklíčka (maximálně do 3/4 délky). Při přesunu vyvíjíme takový tlak, aby byl nátěr rovnoměrný a přiměřeně se ztenčoval. Nátěr se nechá zaschnout na vzduchu při pokojové teplotě. Označíme jej číslem vzorku.



Obr. 13 Provedení krevního nátěru na podložním skle

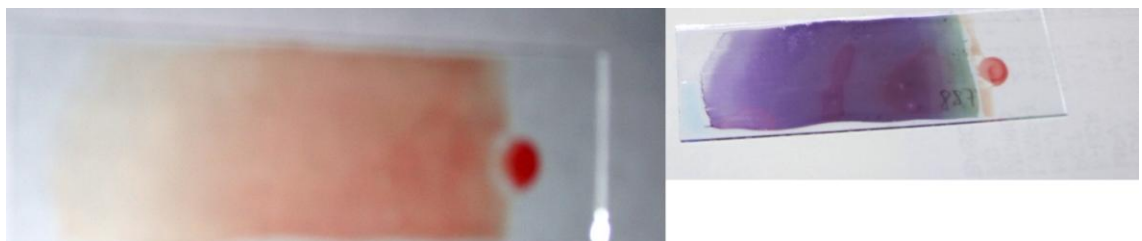
(Zdroj: Budayová, 2007)

V hematologické laboratoři synlab czech s.r.o. se používá k barvení krevních nátěrů barvicí set LEUKODIFF 200, jehož výsledky jsou dobře srovnatelné s Pappenheimovou metodou. Souprava obsahuje fixační roztok metylalkohol, barvicí roztoky Eosin a Azur. Uschlý krevní nátěr fixujeme metanolem po dobu 5 minut. Po vyjmutí z metanolu sklíčko s nátěrem ponoříme do roztoku Eosin po dobu 1 sekundy a vyjmeme. Tento krok zopakujeme ještě 3 x (celkem tedy 4 x). Poté sklíčko ponoříme po dobu 1 sekundy do roztoku Azur a po vyjmutí tento krok zopakujeme ještě 5 x (celkem tedy 6 x). Po obarvení preparát omyjeme pod mírně tekoucí studenou vodou a necháme zaschnout (*Kronika, 2011*).



Obr. 14 Barvicí set LEUKODIFF 200

(Zdroj: vlastní foto)



Obr. 15 Krevní nátěr a obarvený krevní nátěr

(Zdroj: vlastní foto)

Abychom dosáhli požadovaného výsledku, musíme mít osvojené správné zacházení s mikroskopem. V první řadě zapneme zdroj světla. Na pohyblivý stolek, který je v dolní poloze, položíme sledovaný preparát. Upevníme preparát proti pohybu svorkami. Na revolverovém měniči nastavíme potřebný objektiv. Mikroskopování s imerzním objektivem má specifické pracovní postupy. Přímo na preparát kápneme kapku imerzního oleje a nastavíme na revolverovém měniči imerzní objektiv (100x). Hrubým posunem jedeme k preparátu tak dlouho, dokud nedojde ke spojení čelní čočky objektivu s olejovou kapkou. Potom nahlížíme do okuláru a jemně ostříme otáčením mikrometrického šroubu.

Zaznamenáváme všechny leukocyty zachycené při meandrovitém pohybu preparátu v části nátěru, kde nedochází k překryvu erytrocytů, do leukomatu Super L2 podle jednotlivých druhů až do celkového počtu 100. Po ukončení mikroskopování sjedeme stolcem dolů a setřeme imerzní olej čistícím roztokem z objektivu i preparátu.



Obr. 16 Mikroskop Olympus CX21 a leukomat Super L2

(Zdroj: vlastní foto)

3.3. Postanalytická fáze

Zahrnuje lékařskou kontrolu a interpretaci výsledků, stanovení ve vztahu k fyziologickým hodnotám a příslušné diagnóze. Laboratorní výsledky jsou v tištěné podobě k dispozici druhý den od příjmu biologického materiálu do laboratoře.

4. Výsledky

V období duben, květen roku 2012 jsem v biochemicko – hematologické laboratoři synlab czech s.r.o. stanovila 100 diferenciálních rozpočtů leukocytů pomocí automatického analyzátoru Sysmex XE – 2100 a mikroskopu. Naměřené laboratorní hodnoty diferenciálního rozpočtu leukocytů na hematologickém analyzátoru a při mikroskopickém odečtu byly zpracovány do přehledných tabulek a grafů v počítačovém programu Microsoft Excel 2007. Tabulku s naměřenými výsledky nebylo možné vzhledem k jejímu rozsahu zahrnout přímo do textu (*příloha č. 2*). Ze získaných dat byly vypočítány základní statistické parametry (aritmetický průměr, směrodatná odchylka, t test). Ze 100 náhodně vybraných vzorků byly vyhodnoceny grafy v závislosti na pohlaví a věku pacientů. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí chí kvadrát testu v kontingenční tabulce.

Tabulka 1 Statistické vyhodnocení ze 100 vzorků

	Neutrofilly		Lymfocyty	
	Analyzátor	Mikroskop	Analyzátor	Mikroskop
Aritmetický průměr	46,9	48,8	41,0	43,1
Směrodatná odchylka	15,5	15,8	16,8	16,2
t test		0,9%		0,4%

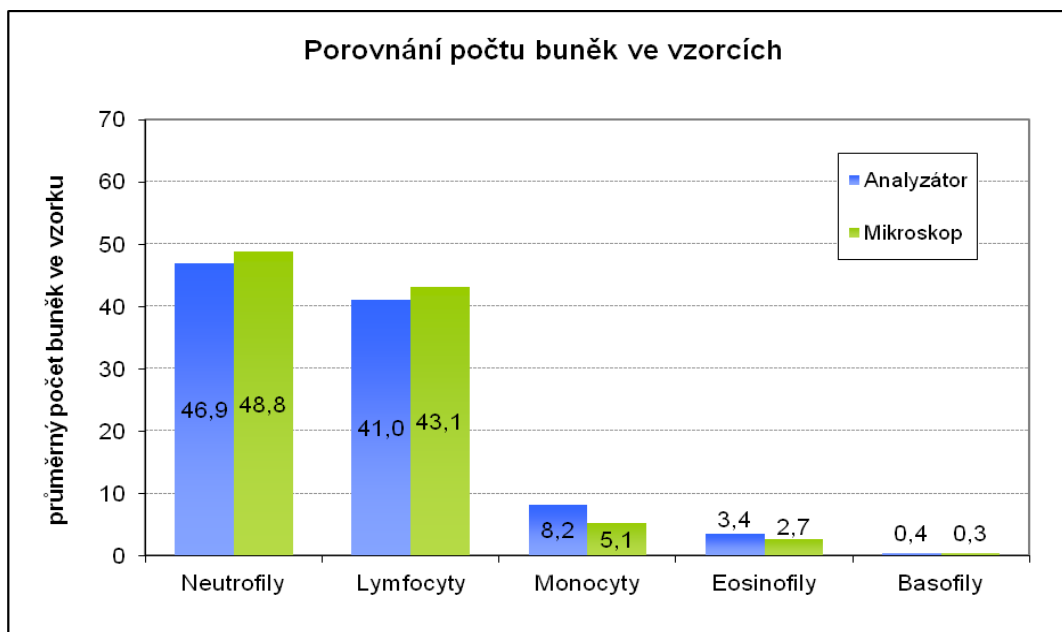
	Monocyty		Eozinofily	
	Analyzátor	Mikroskop	Analyzátor	Mikroskop
Aritmetický průměr	8,2	5,1	3,4	2,7
Směrodatná odchylka	3,0	3,4	2,9	2,7
t test		0,0%		0,3%

	Bazofily	
	Analyzátor	Mikroskop
Aritmetický průměr	0,4	0,3
Směrodatná odchylka	0,7	0,9
t test		20,6%

(Zdroj: vlastní výzkum)

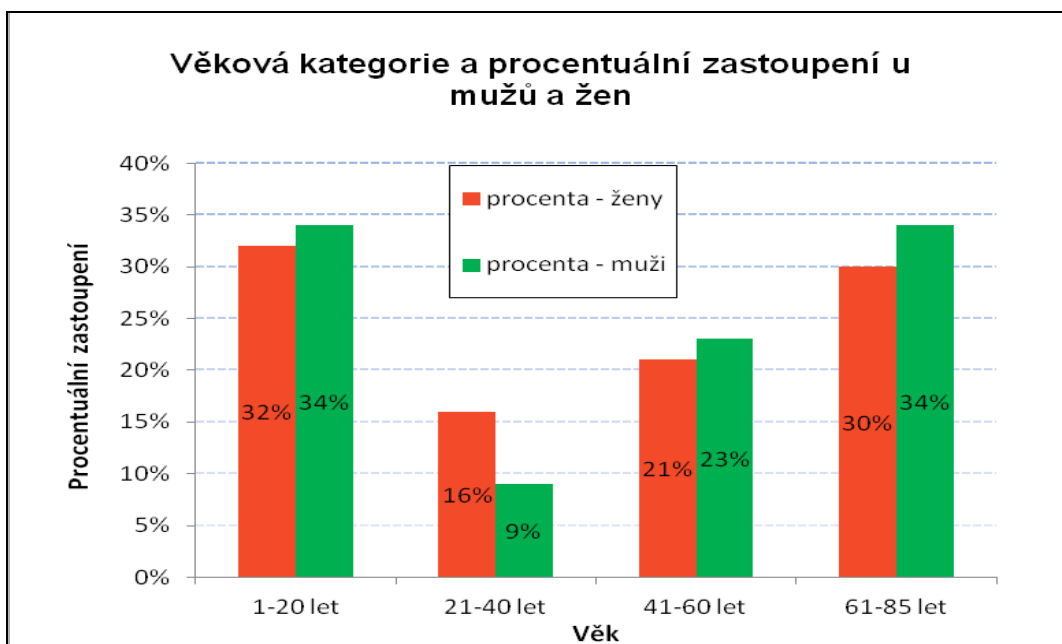
Tab. 1 znázorňuje základní statistické parametry (aritmetický průměr, směrodatná odchylka, t test) ze 100 náhodně vybraných patientských vzorků.

Graf 1 Porovnání počtu buněk



(Zdroj: vlastní výzkum)

Graf 2 Věk a procentuální zastoupení u obou pohlaví



(Zdroj: vlastní výzkum)

Graf 2 znázorňuje procentuální zastoupení mužů a žen v závislosti na věku. Jelikož jsem měla náhodně vybráno 100 patientských vzorků, pro zajímavost jsem uvedla graf.

Tabulka 2 Kontingenční tabulka

	Typ buněk					Celkem
	Neutrofilly	Lymfocyty	Monocyty	Eozinofily	Bazofily	
Analyzátor	4691	4101	821	343	44	10000
Mikroskop	4876	4311	514	268	31	10000
Celkem	9567	8412	1335	611	75	20000
Analyzátor (%)	49,0%	48,8%	61,5%	56,1%	58,7%	
Mikroskop (%)	51,0%	51,2%	38,5%	43,9%	41,3%	
Celkem	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	4783,5	4206	667,5	305,5	37,5	
	4783,5	4206	667,5	305,5	37,5	
chi kvadrát test		0,00%	P = dosažená hladina významnosti			

(Zdroj: vlastní výzkum)

Tab. 2 popisuje kontingenční tabulku, která mi pomohla vyřešit hypotézu. V tabulce porovnávám dvě skupiny. První skupinou je diferenciál leukocytů stanovený analyzátozem a druhou skupinou je diferenciál leukocytů stanovený pomocí mikroskopu. Uvedené hodnoty jsou součty neutrofilů, lymfocytů, monocytů, eozinofilů a bazofilů ve 100 vzorcích.

Chi kvadrát test určil dosaženou hladinu významnosti $p = 0,00\%$. Pokud je p (=dosažená hladina významnosti) větší než 5%, nulová hypotéza je správná a data se neliší. Jakmile ale $p < 5\%$, nulovou hypotézu zamítáme a říkáme, že data se liší.

Moje hypotéza zněla: počty subpopulací leukocytů z mikroskopických diferenciálů budou stejné jako počty z automatického analyzátoru → Hypotézu zamítám, a konstatuji, že $p = 0,00\%$ svědčí o velkém rozdílu mezi porovnávanými skupinami.

4.1. Srovnání dvou různých metod

Vzhledem k neustále se rozvíjejícím technologiím se dnes již upouští od 3 populačního diferenciálu, při kterém byly leukocyty rozděleny na lymfocyty, monocyty a granulocyty. Stanovení 5 populací je již rutinní záležitostí. Ve většině případů je preferován diferenciál přístrojový. Ne, že by si laboratoř chtěla ušetřit práci, ale důvodem je rychlost, kdy jeden vzorek je změřen během pár minut. Čím větší počet buněk je hodnocen, tím je výsledek přesnější. Při mikroskopickém hodnocení je diferenciál běžně počítán na 100 leukocytů, což trvá více jak pár minut. Hematologické analyzátory se postupně vylepšují, dokáží vyhodnotit stále více a více parametrů a lze na nich stanovit stále větší počet vzorků. Dodnes zůstává referenční metodou stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů metoda manuální. Přes veliký pokrok techniky tu stále zůstává významná část krevních obrazů, která se musí hodnotit mikroskopicky. Analyzátory zatím nejsou schopny určit nezralé či abnormální buňky. Příkladem uvádím i DIF u vzorků zvířat, protože analyzátor nemusí správně vyhodnotit jejich buňky z důvodu morfologické odlišnosti.

4.2. Vyhodnocení patologických buněk

Již jsem se zmínila, že analyzátor není zcela schopen vyhodnotit patologické buňky. Analyzátor reaguje formou textového upozornění na abnormální či patologické buňky. Tím je důvod zhotovit nátěr a prohlédnout ho pod mikroskopem. Většinou se jedná o neutrofilní tyče, metamyelocyty, myelocyty, promyelocyty, blasty, případně atypické nebo reaktivní formy lymfocytů.

5. Diskuse

Studiemi je dokázáno, že 80% chyb v měření je způsobeno preanalytickou částí vyšetření (tzn. špatným odběrem krve, dlouhou časovou prodlevou od odběru vzorku po jeho zpracování apod.). Správně by se měly odebírat 2 ml nebo 4 ml krve do zkumavky s antikoagulantem K_2 , K_3 EDTA, promíchat a bez další manipulace odeslat do laboratoře. Nedodržení správného postupu při transportu a skladování vzorků může také zásadně ovlivnit spolehlivost laboratorních výsledků (*Hrubíško, 1981*). Stabilizovaná krev se při hematologických vyšetřeních zpracovává obvykle čerstvá, dle doporučení České hematologické společnosti ČLS JEP by krevní obraz měl být vyšetřen do 5 hodin od odběru.

Cílem práce bylo vyhodnotit rozdíly za použití dvou rozdílných metod. Starší analyzátory poskytovaly pouze třípopulační diferenciál, rozlišující populaci krevních buněk s malým, středně velkým a velkým jádrem. Třípopulační diferenciál tedy v žádném případě nedokáže přesně odlišit lymfocyty, neutrofile a tzv. střední populaci krevních buněk. Moderní analyzátory v dnešní době poskytují pětipopulační diferenciál, který rozlišuje v bílé řadě neutrofile, eozinofily, bazofily, monocyty a lymfocyty. Nejsou ovšem schopny stanovit nesegmentované formy neutrofilů - tyče (*Pecka, 2006*).

Za různých patologických stavů mohou být v periferní krvi přítomny patologické buňky, které analyzátory registrují a upozorňují na ně formou hlášení. Tyto vzorky je potom třeba překontrolovat mikroskopicky. Mají též schopnost upozornit a separovat erythrocyty rezistentní na lýzu, což je velmi užitečné, neboť jejich přítomnost může ovlivnit falešně vyšší počet leukocytů (*Mellors, 1995*).

Je zřejmé, že výsledek krevního obrazu je závislý na přítomnosti řady jiných interferujících faktorů, které mohou ovlivnit jak absolutní počty krevních buněk, ale i diferenciální počet leukocytů. Falešně nízké hodnoty bílých krvinek se vyskytují jen vzácně - a to především v souvislosti s aglutináty neutrofilů vzniklé většinou

v přítomnosti autoprotilátek po proběhlé infekci. Naopak falešně vysoké hodnoty leukocytů způsobuje přítomnost krevních agregátů, kryoglobulinů, lipidů, paraproteinů a normoblastů (*Geneviève, 2012*).

Výhodou hematologického analyzátoru je rychlé a velmi přesné vydávání výsledků diferenciálního rozpočtu leukocytů. Výsledky pro fyziologické vzorky periferní krve jsou běžně vydávány z analyzátoru. Výhodou mikroskopu je především možnost přesného morfologického popisu všech nalezených buněčných elementů, jeho funkce je v klinické laboratoři stále nenahraditelná. Dále mikroskop umožňuje analyzovat vzorek v jakémkoliv místě nátěru. Lze tak vyloučit artefakty a narušené buňky z rozpočtu. Nevýhodou je časově náročnější proces, který provází samotné mikroskopování (*Hrabcová, 2010*).

6. Závěr

Přístrojový diferenciální rozpočet leukocytů není vhodný u pacientů s posunem k mladším vývojovým formám či s přítomností atypických buněk. Tedy například u hematologických nemocných. Z infekčních chorob pak nezachytí například typické změny provázející infekční mononukleózu.

Vyhodnocená data jsou též v souladu s literárními údaji o lehce vyšší hodnotě monocytů a eozinofilů v případě vyšetření na hematologických analyzátoch. Z naměřených dat a výsledků jsem mou stanovenou hypotézu zamítla.

Z uvedené zkušenosti v rámci snahy o standardizaci činností také vyplývá, že je vhodné, aby si laboratoř stanovila základní kritéria, kdy na podkladě výsledků z analyzátoru přistoupí k provedení nátěru a mikroskopickému zhodnocení diferenciálního rozpočtu.

V průběhu laboratorní praxe k bakalářské práci jsem si osvojila praktické dovednosti při manipulaci s biologickým materiálem od jeho příjmu až po jeho vložení do analyzátoru, rovněž jsem se naučila správnému zhotovování, hodnocení krevních nátěrů. Výsledky mé bakalářské práce lze využít obecně v klinických laboratořích při posuzování výhod, nevýhod a souvislostí mezi jednotlivými sledovanými analytickými metodami.

7. Použité zdroje

- 1) BARNES, PW., MCFADDEN, SL., MACHIN, SJ., SIMSON, E. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Laboratory Hematology*. 2005, roč. 11, č. 2, s. 83 – 90.
- 2) BEUTLER, E. et al. *Williams Hematology*. 5. vydání. New York: McGraw-Hill, 2001, s. 753 – 915. ISBN 0-07-070386-8
- 3) BOUDAL, P. Koncept Hematoflow – diferenciál leukocytů a průtoková cytometrie. *In Vitro Diagnostika* [online]. 2008, roč. 2, č. 8, s. 9 – 10 [cit. 2013-18-04]. Dostupné z: http://www.immunotech.cz/pdf/IVD_8.pdf
- 4) BROWN, M., WITTEWER, C. Flow Cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*. 2000, roč. 46, č. 8, s. 1221 – 1229.
- 5) BUDAYOVÁ, E. *Pracovní sešit hematologie*. 7. přepracované vydání. Hradec Králové: Vyšší odborná škola zdravotnická a střední zdravotnická škola, 2007, s. 22 – 27. ISBN 978-80-903414-5-6.
- 6) BUTTARELLO, M. Quality specification in haematology: the automated blood cell count. *Clinica Chimica Acta*. 2004, roč. 46, č. 1, s. 45 – 54.
- 7) CORNET, E., PEROL., J.-P, TROUSSARD, X. Performance evaluation and relevance of the CellaVisionTM DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2008, roč. 30, č. 6, s. 536 – 542.

- 8) ČEŠKA, R. a kol. *Interna*. 1. vydání. Praha: Triton, 2010, s. 676. ISBN 978-80-7387-423-0.
- 9) DASTYCH, M., BREINEK, P. a kol. *Klinická biochemie*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2008, s. 19 - 22. ISBN 978-80-210-4572-9.
- 10) DONNER, L. *Klinická hematologie*. 1. vydání. Praha: Avicenum, 1985, s. 21 – 28; 333 – 340.
- 11) FIELD, D., TOUBE, E., HEUMANN, S. Performance evaluation of the immature granulocyte parameter on the Sysmex XE-2100 automated hematology analyzer. *Laboratory Hematology*. 2006, roč. 12, č. 1, s. 11 – 14.
- 12) FRIEDMANN, B. *Hematologie v praxi*. Praha: Galen, 1994, s. 126 – 132. ISBN 80-85824-05-1.
- 13) GENEVIÉVE, F., GODON, A., MARTEAU-TESSIER, A., ZANDECKI, M. Automated hematology analysers and spurious counts Part 2. Leukocyte count and differential. *Annales de Biologie Clinique* 70, 144 – 154, 2012.
- 14) HRABCOVÁ, R. Diferenciál leukocytů: analyzátor versus mikroskop. *News Spadia* [online]. 2010, roč. 7, č. 6, s. 2.
Dostupné z: http://www.spadia.cz/news/2010/201007_News_06.pdf
- 15) HRUBIŠKO, M. a kol. *Hematologie a krevní transfuze I*. Praha: Avicenum, 1981, s. 141.
- 16) HYUN, B.H., GULATI, G.L., ASHTON, J.K. Differential leukocyte count: manual or automated, what should it be? *Yonsei Medical Journal*. 1991, roč. 32, č. 4, s. 283 – 291.

- 17) JANEWAY, CH., TRAVERS, P., WALPORT, M., SHLOMCHIK, M. *Immunobiology: the immune system in health and diseases*. New York: Garland Science Publishing, 2005, s. 9. ISBN 0-8153-3642-X.
- 18) KRČ, I. Hodnocení bílého krevního obrazu v ambulantní praxi. *Interní medicína* [online]. 2004, roč. 6, č. 3, s. 144 – 146. [cit. 2013-18-04]
Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2004/03/09.pdf>
- 19) KRONIKA, J. *Obsluha a údržba analyzátoru SYSMEX XE – 2100*. Verze č. 1. České Budějovice: synlab czech s.r.o., 2010, s. 1-11.
- 20) KRONIKA, J. *Barvení krevních nátěrů*. Verze č. 1. České Budějovice: synlab czech s.r.o., 2011, s. 1.
- 21) KUBISZ, P. a kol. *Hematológia a transfuziológia*. Bratislava: Grada Slovakia, 2006, s. 71 – 78. ISBN 80-8090-000-0.
- 22) LEXOVÁ, S. a kol. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2000, s. 87 – 90. ISBN 80-7013-304-X.
- 23) MELLORS, I., McARDLE, P., BELL, D. Pseudoleucocytosis due to incomplete erythrocyte lysis. *Clinical laboratory Hematology* 17, 347 – 348, 1995
- 24) MIGUEL, A., ORERO, M., SIMON, R., COLLADO, R., PEREZ, P.L., PACIOS, A., IGLESIAS, R., MARTINEZ, A., CARBONEL, F. Automated neutrophil morphology and its utility in the assessment of neutrophil dysplasia. *Laboratory Hematology*. 2007, roč. 13, č. 3, s. 98 – 102.

- 25) MIRČIĆ, S. JORGOVANOVIČ, N. Automatic classification of leukocytes. *Journal of automatic control*. 2006, roč. 16, č. 1, s. 29 – 32.
- 26) NOVOTNÝ, I., HRUŠKA, M. *Biologie člověka*. 4. rozšířené a upravené vydání. Praha: Fortuna, 2005, s. 39 – 40. ISBN 978-80-7373-007-9.
- 27) PENKA, M. a kol. *Hematologie a transfuzní lékařství I*. 1. vydání. Praha: Grada, 2011, s. 61 – 62; 208. ISBN 978-80-247-3459-0.
- 28) PENKA, M. a kol. *Hematologie I. Neonkologická hematologie*. 1. vydání. Praha: Grada. 2001, s. 83 – 89; 191. ISBN 80-24700-23-9.
- 29) PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patofyziologie krevní buňky*. Český Těšín: Finidr, 2006, s. 304. ISBN 80-86682-02-1.
- 30) PECKA, M., BLÁHA, M. *Praktická hematologie: laboratorní metody*. 1. vydání. Český Těšín: Infiniti art, 2010, s. 39 – 49; 72 – 84; 145 – 149; 222 – 228. ISBN 978-80-903871-9-5.
- 31) PIERRE, R.V. Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. *Clinical Laboratory Medicine*. 2002, roč. 22, č. 1, s. 279 – 297.
- 32) ROUBALOVÁ, L. Průtoková cytometrie. *Laboratorní technologie Stapro* [online]. 2012, roč. 22, č. 2, s. 5 – 9. [cit. 2013-18-04]
Dostupné z: <http://web2.stapro.cz/bullfons/22012/lab01.pdf>
- 33) SAKALOVÁ, A., LIPŠIČ, T. *Hematológia a transfuziológia: teória a cvičenia*. 1. vydání. Martin: Osveta, 1995, s. 71 – 85. ISBN 8021704446.

- 34) SYSMEX XE – 2100 Operator's Manual – Revised November 1999; Sysmex Corporation Kobe, Japan
- 35) ZAHRADNÍKOVÁ, H. Příručka pro odběr primárních vzorků. Verze č. 1. České Budějovice: Laboma s.r.o., 2010, s. 1 – 11.

Obrázky převzaté z internetu:

- 36) Obrázek analyzátoru Sysmex XE – 2100:

<https://www.sysmex.com/us/en/Products/Hematology/XESeries/Pages/XE-2100-Hematology-Analyzer.aspx>

- 37) Obrázek scattergramu DIFFU:

<http://www.sysmex-europe.com/index.asp?id=105>

8. Klíčová slova

Diferenciální rozpočet leukocytů

Hematologické analyzátory

Krevní nátěr

Leukocyty

Optická metoda

Key words

Differential count of leucocytes

Hematology analyzers

Blood smear

Leukocytes

Optical method

Příloha č. 2

Tabulka naměřených výsledků – analyzátor

	Neutrofilý %	Lymfocyty %	Monocyty %	Eosinofily %	Basofily %
Pacient(100)	Analyzátor				
N.H.,2001,Ž	48	33	10	9	0
G.G.,1971,Ž	52	38	8	2	0
M.T.,1957,Ž	58	30	9	2	1
T.D.,2003,M	41	37	8	14	0
J.J.,1995,M	33	50	10	6	1
V.D.,1991,Ž	48	43	6	2	1
L.K.,2005,Ž	46	38	9	7	0
A.M.,2001,M	39	34	9	16	2
M.S.,2006,M	44	43	10	2	1
I.B.,1991,Ž	58	31	7	4	0
K.K.,1991,Ž	61	32	6	1	0
L.F.,1990,Ž	50	35	5	10	0
A.Ž.,1956,Ž	55	30	10	3	2
A.B.,1940,M	38	44	11	7	0
N.K.,2001,Ž	33	52	9	5	1
R.K.,1940,Ž	75	13	10	2	0
A.M.,1975,Ž	45	44	6	4	1
J.M.,2002,M	46	41	10	2	1
M.K.,1927,Ž	4	94	2	0	0
J.V.,2004,M	63	27	8	2	0
D.B.,1998,Ž	48	40	10	2	0
E.N.,1958,Ž	43	51	5	1	0
M.N.,2007,Ž	42	45	11	2	0
L.K.,1956,M	9	88	2	1	0
M.P.,1933,M	9	88	3	0	0
D.S.,1939,M	10	82	6	2	0
M.P.,1970,Ž	61	28	8	3	0
Š.E.,1996,Ž	22	65	12	0	1
P.O.,1959,M	50	36	8	6	0
M.M.,1954,Ž	39	40	17	3	1
N.K.,1999,Ž	65	25	8	2	0
R.D.,1989,Ž	49	39	9	2	1
V.B.,1994,M	44	46	8	2	0
J.B.,1973,Ž	53	36	9	2	0
D.N.,2005,M	37	48	8	6	1

M.Z.,2010,M	45	48	5	1	1
M.S.,2004,Ž	36	54	7	2	1
A.L.,1964,Ž	52	32	9	6	1
E.N.,2004,Ž	35	53	9	2	1
M.B.,1995,Ž	53	34	10	2	1
D.D.,2000,Ž	34	50	6	9	1
J.P.,1972,M	41	46	11	2	0
L.Š.,2004,Ž	34	52	11	2	1
J.P.,1948,M	49	41	8	2	0
H.CH.,1957,Ž	48	38	9	5	0
B.P.,1934,Ž	5	94	1	0	0
F.K.,1949,M	53	38	8	1	0
M.P.,1934,Ž	71	19	7	2	1
H.M.,1947,Ž	41	46	10	2	1
J.T.,1972,Ž	54	38	6	2	0
M.Š.,2008,M	46	47	5	2	0
J.K.,2002,M	39	51	6	3	1
P.T.,1997,M	54	34	7	4	1
T.K.,2007,Ž	49	37	9	5	0
J.K.,1971,Ž	69	23	7	1	0
M.H.,1997,Ž	53	36	8	2	1
N.M.,2010,Ž	29	61	6	4	0
K.S.,2000,Ž	50	33	10	7	0
K.K.,1997,Ž	48	42	6	4	0
O.G.,1979,M	37	51	9	3	0
P.N.,1964,M	54	35	7	3	1
D.Š.,1951,Ž	52	27	17	4	0
M.F.,1953,Ž	53	37	7	3	0
J.L.,1948,Ž	61	31	6	2	0
A.H.,1950,Ž	56	32	7	4	1
M.G.,1951,Ž	38	52	5	4	1
M.F.,1992,M	41	32	17	6	4
M.S.,1994,M	49	31	10	8	2
V.K.,1946,M	65	24	7	4	0
K.J.,1941,M	67	18	10	4	1
K.T.,1951,M	60	31	8	1	0
M.K.,1975,M	53	35	7	5	0
F.M.,1945,M	60	30	8	2	0
M.Š.,1943,Ž	48	40	7	4	1
V.P.,1927,M	60	22	10	7	1

M.M.,1931,Ž	61	25	12	2	0
J.J.,1943,Ž	57	32	9	2	0
J.M.,1943,Ž	65	25	6	3	1
L.Š.,1945,Ž	60	22	13	5	0
A.N.,1940,Ž	68	19	8	4	1
A.O.,2011,M	24	67	7	2	0
N.K.,2007,Ž	41	50	5	3	1
J.S.,1987,M	47	38	13	2	0
Š.P.,1951,M	57	33	7	2	1
L.K.,1956,M	9	85	5	1	0
J.H.,1933,M	8	87	4	1	0
P.D.,1950,M	73	19	8	0	0
O.R.,1976,Ž	44	32	9	15	0
M.Š.,1971,Ž	34	56	9	1	0
P.P.,1928,M	46	41	12	1	0
M.V.,1966,M	42	38	18	2	0
A.V.,1955,M	65	25	9	1	0
J.V.,1938,Ž	40	46	10	4	0
F.P.,1942,M	87	10	1	2	0
F.O.,1962,M	64	27	6	3	0
P.M.,1956,M	36	47	11	6	0
V.S.,1955,M	50	36	8	5	1
J.M.,1936,M	54	37	8	1	0
V.L.,1964,M	47	42	8	3	0
J.K.,1960,Ž	52	41	5	2	0

Tabulka výsledků – mikroskopický odečet

	Neutrofilly	Lymfocyty	Monocyty	Eosinofily	Basofily
Pacient(100)	Mikroskop				
N.H.,2001,Ž	44	40	6	9	1
G.G.,1971,Ž	53	39	6	2	0
M.T.,1957,Ž	56	40	4	0	0
T.D.,2003,M	40	44	3	13	0
J.J.,1995,M	34	56	8	2	0
V.D.,1991,Ž	50	29	11	7	3
L.K.,2005,Ž	53	34	9	4	0
A.M.,2001,M	46	29	4	16	5
M.S.,2006,M	44	46	7	3	0
I.B.,1991,Ž	59	29	8	4	0
K.K.,1991,Ž	59	31	4	4	2
L.F.,1990,Ž	51	32	9	5	3
A.Ž.,1956,Ž	56	36	7	1	0
A.B.,1940,M	51	44	3	2	0
N.K.,2001,Ž	30	54	8	5	3
R.K.,1940,Ž	73	21	1	2	3
A.M.,1975,Ž	47	43	4	2	4
J.M.,2002,M	37	53	6	4	0
M.K.,1927,Ž	16	79	3	2	0
J.V.,2004,M	59	36	2	3	0
D.B.,1998,Ž	54	40	4	2	0
E.N.,1958,Ž	56	37	3	2	2
M.N.,2007,Ž	57	36	6	1	0
L.K.,1956,M	13	82	4	1	0
M.P.,1933,M	11	83	6	0	0
D.S.,1939,M	11	86	2	1	0
M.P.,1970,Ž	65	27	2	6	0
Š.E.,1996,Ž	23	54	23	0	0
P.O.,1959,M	47	39	8	6	0
M.M.,1954,Ž	40	36	17	7	0
N.K.,1999,Ž	70	24	4	2	0
R.D.,1989,Ž	50	43	4	3	0
V.B.,1994,M	49	46	3	2	0
J.B.,1973,Ž	64	34	1	1	0
D.N.,2005,M	38	55	3	4	0
M.Z.,2010,M	32	62	2	3	1
M.S.,2004,Ž	49	46	5	0	0

A.L.,1964,Ž	55	30	9	6	0
E.N.,2004,Ž	36	58	6	0	0
M.B.,1995,Ž	51	40	8	1	0
D.D.,2000,Ž	50	46	3	1	0
J.P.,1972,M	39	53	7	1	0
L.Š.,2004,Ž	45	46	7	2	0
J.P.,1948,M	55	39	6	0	0
H.CH.,1957,Ž	43	46	4	7	0
B.P.,1934,Ž	3	94	1	2	0
F.K.,1949,M	58	33	9	0	0
M.P.,1934,Ž	69	24	5	2	0
H.M.,1947,Ž	23	68	9	0	0
J.T.,1972,Ž	44	48	3	5	0
M.Š.,2008,M	45	51	2	2	0
J.K.,2002,M	45	48	3	4	0
P.T.,1997,M	62	36	1	1	0
T.K.,2007,Ž	42	50	1	7	0
J.K.,1971,Ž	65	34	1	0	0
M.H.,1997,Ž	58	39	2	1	0
N.M.,2010,Ž	33	62	1	4	0
K.S.,2000,Ž	51	40	3	6	0
K.K.,1997,Ž	55	39	4	2	0
O.G.,1979,M	26	70	2	2	0
P.N.,1964,M	56	35	7	2	0
D.Š.,1951,Ž	59	29	9	3	0
M.F.,1953,Ž	60	32	5	3	0
J.L.,1948,Ž	64	29	5	2	0
A.H.,1950,Ž	65	27	6	2	0
M.G.,1951,Ž	30	65	4	1	0
M.F.,1992,M	51	39	7	2	1
M.S.,1994,M	59	35	4	2	0
V.K.,1946,M	60	29	9	2	0
K.J.,1941,M	68	21	8	3	0
K.T.,1951,M	67	27	2	4	0
M.K.,1975,M	62	33	5	0	0
F.M.,1945,M	51	39	4	5	1
M.Š.,1943,Ž	49	42	6	3	0
V.P.,1927,M	66	25	9	0	0
M.M.,1931,Ž	69	28	3	0	0
J.J.,1943,Ž	61	34	4	1	0

J.M.,1943,Ž	71	23	5	1	0
L.Š.,1945,Ž	64	22	11	3	0
A.N.,1940,Ž	65	24	7	4	0
A.O.,2011,M	40	53	3	4	0
N.K.,2007,Ž	45	44	8	3	0
J.S.,1987,M	50	44	6	0	0
Š.P.,1951,M	49	43	5	3	0
L.K.,1956,M	8	87	4	1	0
J.H.,1933,M	5	92	3	0	0
P.D.,1950,M	62	36	2	0	0
O.R.,1976,Ž	52	41	4	3	0
M.Š.,1971,Ž	34	64	2	0	0
P.P.,1928,M	62	38	0	0	0
M.V.,1966,M	41	45	12	2	0
A.V.,1955,M	76	21	2	1	0
J.V.,1938,Ž	40	54	6	0	0
F.P.,1942,M	74	24	2	0	0
F.O.,1962,M	55	38	2	5	0
P.M.,1956,M	40	48	5	7	0
V.S.,1955,M	58	32	6	4	0
J.M.,1936,M	57	37	6	0	0
V.L.,1964,M	49	41	6	2	2
J.K.,1960,Ž	42	52	3	3	0