

**BIOLOGICKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**



**PROBLEMATIKA STANOVENÍ POČTU TROMBOCYTŮ A  
SUBSTITUČNÍ LÉČBA TROMBOCYPOPENIE**

**Bakalářská práce 2007**

**Autor:** Marcela Chytilová  
**Vedoucí práce:** MUDr. Ivan Vonke

Chytilová M (2007): Problematika stanovení počtu trombocytů a substituční léčba trombocytopenie. [Platelets counting and substitution therapy. Bc. Thesis, in Czech] – 37 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Annotation:

Thrombocytopenia can be simply defined as a blood platelet count of below  $150 \times 10^9/l$ . With the routine measurement of platelet number by automated cell counters it is a relatively common finding. Before initiating further investigations it is important to confirm that a low platelet count is genuine by careful inspection. Either a small clot in the sample or platelet clumping can cause artefactual thrombocytopenia and lead to unnecessary intervention.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, na základě konzultací se svým školitelem a s pomocí uvedené literatury.

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

V Českých Budějovicích 27.4.2007

.....

Marcela Chytilová

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli, MUDr. Ivanu Vonkemu, dále MUDr. Heleně Banzetové a také laborantkám z Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a.s.

## Obsah

<b>1. Úvod a cíl práce</b> .....	5
<b>2. Fyziologie trombocytů a jejich funkce</b> .....	7
<b>3. Laboratorní vyšetření</b> .....	7
3.1. Preamalytická fáze .....	8
3.1.1. Osoba pacienta .....	8
3.1.2. Odběr vzorku .....	8
3.1.3. Transport vzorku .....	9
3.1.4. Příprava vzorku ke zpracování .....	10
3.2. Analytická fáze .....	10
3.2.1. Analytické vlastnosti laboratorní metody .....	10
3.2.2. Vlastnosti laboratorní metody z klinického hlediska .....	10
3.2.3. Referenční hodnoty laboratorního vyšetření .....	11
3.2.4. Kontrola kvality laboratorního vyšetření .....	12
3.3. Postanalytická fáze .....	13
<b>4. Trombocytopenie a substituční terapie</b> .....	14
4.1. Zvýšená destrukce trombocytů - imunitně podmíněné trombocytopenie .....	15
4.2. Zvýšená destrukce trombocytů - neimunitně podmíněné trombocytopenie .....	17
4.3. Trombocytopenie vyvolané poruchou trombocytopoezy .....	18
4.4. Pseudotrombocytopenie.....	18
4.5. Substituční léčba trombocytopenie .....	19
4.5.1. Transfuzní přípravky .....	20
4.5.2. Trombocytární koncentrát .....	20
4.5.3. Metodika podání transfuze .....	22
<b>5. Materiál a použité metody</b> .....	23
5.1. Kritéria výběru pacientů .....	23
5.2. Odběr krve a příprava ke zpracování .....	23
5.3. Laboratorní vyšetření.....	23
5.4. Indikace a metodika podání trombocytárních koncentrátů .....	25
<b>6. Výsledky</b> .....	26
6.1. Stanovení počtu trombocytů automat. analyzátozem a manuál. ref. metodou .....	26
6.2. Účinnost podání transfuzí trombocytárních koncentrátů .....	26

<b>7. Diskuse</b> .....	29
<b>8. Závěr</b> .....	33
<b>9. Příloha - Referenční hodnoty krevního obrazu</b> .....	34
<b>10. Seznam citované literatury</b> .....	35

## 1. Úvod a cíl práce

Trombocytopenie je kvantitativní porucha krevních destiček (trombocytů). Faktory, které ji vyvolávají, mohou být z vrozených či získaných příčin. (Penka et al., 2001) Závažnost trombocytopenie určuje míra poklesu počtu krevních destiček pod dolní referenční mez ( $150 \times 10^9/l$ ). U lehké trombocytopenie (pod  $100 \times 10^9/l$ ) až středně závažné formy trombocytopenie (pod  $50 \times 10^9/l$ ) je zvýšená tendence ke krvácení. Tyto formy trombocytopenie se klinicky manifestují petechiálním kožním nebo slizničním krvácením, hematomy, krvácením z dásní, epistaxí a gynekologickým krvácením různé intenzity. Těžká trombocytopenie (pod  $20 \times 10^9/l$ ) je spojována s život ohrožujícím krvácením, projevuje se spontánním krvácením z gastrointestinálního traktu, krvácením do urogenitálního traktu, krvácením do sítnice a nejméně závažnější je krvácení do centrálního nervového systému. (Ústní sdělení školitele)

Trombocytopenii je možno laboratorně diagnostikovat vyšetřením krevního obrazu. V současné době je vyšetření krevního obrazu prováděno na automatických hematologických analyzátoch, které i navzdory své správnosti a přesnosti vykazují určité procento chyb. Referenční metodou je tedy stále manuální počítání trombocytů v Bürkerově počítací komůrce s použitím mikroskopu. Tato srovnávací metoda má zcela zásadní význam při průkazu pseudotrombocytopenie. Dalším možným způsobem zjištění počtu trombocytů je odhad z nátěru při stanovení diferenciálního počtu. (Ústní sdělení školitele)

Terapií, zejména těžkých forem trombocytopenie, je kromě léků substituční léčba, tedy podávání pacientům tranfuzí trombocytárních koncentrátů. Substituční léčba má svá nezanedbatelná rizika a je velmi nákladná. Samotný počet trombocytů by neměl být jediným kritériem pro podání transfuze, neboť pravděpodobnost krvácení je závislá také na dalších faktorech (etiologie trombocytopenie, funkční stav trombocytů a klinický stav pacienta).

Podávání transfuzí krevních destiček by mělo být vyhrazeno především pro pacienty se sníženou produkcí trombocytů v kostní dřeni. U pacientů s funkční kostní dřeni a zvýšenou destrukcí trombocytů jsou dárcovské destičky rychle odstraňovány z oběhu, podobně jako destičky vlastní. Proto je podání trombocytárního koncentráту u těchto pacientů indikováno v ohrožení života, kdy i krátkodobý vzestup trombocytů po transfuzi může mít hemostatický efekt. (Penka et al., 2001)

V současné době je doporučovaná hranice pro podání profylaktické transfuze počet trombocytů nižší než  $5-10 \times 10^9/l$  u jinak stabilizovaného nekrvácejícího pacienta. Je-li větší riziko krvácení, je hranice zvýšena na  $20 \times 10^9/l$ . Vyšších koncentrací trombocytů je třeba při

provádění invazivních zákroků. Potřebná dávka destiček se řídí hmotností pacienta a zejména koncentrací, kterou chceme jejich podáním dosáhnout. Jeden koncentrát by měl u 70-ti kg příjemce zvýšit počet destiček o  $7-10 \times 10^9/l$ , měřeno hodinu po transfuzi. Obvykle je dostačujících 5 transfuzních jednotek (TU) směsného koncentrátu nebo trombokoncentrát od jednoho dárce ze separátoru. Dárce trombocytů má být AB0 a Rh kompatibilní. V naléhavých případech je možné podat destičky skupiny 0 příjemcům skupiny A nebo B. (Penka et al., 2001)

Cílem této práce je porovnání metod stanovení počtu trombocytů, návrh optimálního postupu při stanovení počtu trombocytů a minimalizace chyb. Dalším cílem je zmapovat problematiku terapie trombocytopenie trombocytárními koncentráty.

## 2. Fyziologie trombocytů a jejich funkce

Krevní destičky jsou nejmenší buňky fyziologicky přítomné v krvi. Jsou to bezjaderné buňky, které vznikají v kostní dřeni odštěpováním cytoplazmy megakaryocytů. (Kubisz et al., 2006) Je odhadováno, že se denně vytvoří 35000 trombocytů na 1  $\mu$ l krve. (Harker et al., 1969) Průměrná velikost trombocytů se pohybuje mezi 1,5 až 2,5  $\mu$ m, což odpovídá přibližně 1/3 až 1/4 velikosti erytrocytu. (Beutler et al., 2001) V neaktivním stavu mají trombocyty diskovitý tvar. V aktivním stavu mají nepravidelný tvar s cytoplazmatickými výběžky, tzv. filopodiemi. Normální počet trombocytů u dospělého člověka se pohybuje v rozmezí 150-400x10<sup>9</sup>/l, rozdíly mezi pohlavím a věkem nebyly zjištěny (s výjimkou prvních třech měsíců života). Přibližně dvě třetiny z celkového počtu trombocytů jsou zadržovány ve slezině a jedna třetina cirkuluje v krvi. (Kubisz et al., 2006) Po vyplavení z kostní dřene přežívají krevní destičky přibližně 10 dní. (Sakalová et al., 1995) Cytoplazma trombocytů obsahuje tři typy granul –  $\delta$  granula (obsahují ADP, ATP, Ca, serotonin),  $\alpha$  granula (obsahují destičkový faktor 4, PDGF, vWF, fibrinogen) a  $\gamma$  granula (totožná s lyzozomem). (Kubisz et al., 2006)

Základní funkce trombocytů spočívá v zástavě krvácení vytvořením primární cévní zátky. Důležitý je jejich podíl na obnově vnitřního povrchu cévní stěny při narušení fyziologicky probíhajícím odlučováním endotelia nebo při poškození poraněním. Trombocyty mají také schopnost fagocytozy a přenášet látky díky svým povrchovým receptorům. (Penka et al., 2001)

## 3. Laboratorní vyšetření

Hematologické laboratorní vyšetření je proces, který zahrnuje složky extralaboratorní a intralaboratorní, tedy výkony před vyšetřením, vlastní vyšetření a výkony po ukončení vyšetření. (Sakalová et al., 1995) Laboratorní vyšetření se dělí do tří fází, a to na období preanalytické (příprava pacienta, biologické faktory osoby pacienta, typ odběrové zkumavky, vlastní odběr, transport vzorku, hemolýza), analytické (vlastní metoda stanovení, přesnost a správnost) a postanalytické (správná interpretace výsledků a přenos dat). K ovlivnění výsledku laboratorního vyšetření může dojít ve všech třech fázích. Nejdůležitější, z hlediska možného ovlivnění výsledku, je období preanalytické. Uvádí se, že nerespektování preanalytických vlivů způsobuje chybný výsledek nebo jeho nesprávné hodnocení častěji než analytická chyba. (Racek et al., 2006)

### 3.1. Preanalytická fáze

Pod pojem preanalytická fáze je zahrnut soubor všech postupů a operací, kterými projde vzorek analyzovaného materiálu od okamžiku, kdy je analýza požadována, do okamžiku, kdy je vzorek vložen do analytického měřicího systému (automatického analyzátoru aj.). (Friedecký et al., 1997) Jednotlivé fáze laboratorního vyšetření se liší v časové náročnosti, finančních nákladech i frekvencí chyb. Všechna tato kritéria jsou významně vyšší v preanalytickém období, ve srovnání s obdobím analytickým a postanalytickým. (Wisser et al., 2002) V preanalytickém období mohou výsledek ovlivnit následující faktory: osoba pacienta, odběr vzorku, transport vzorku, uchování vzorku před analýzou a příprava vzorku před zpracováním.

#### 3.1.1. Osoba pacienta

Pod pojem osoba pacienta řadíme jednak faktory, které nelze ovlivnit, ale při správném hodnocení výsledku je nutné je vzít v úvahu, a jednak faktory, které jsou ve většině případů ovlivnitelné a jejichž účinek na laboratorní vyšetření lze eliminovat. (Young, 1997) Mezi neovlivnitelné faktory řadíme pohlaví. Parametry červeného krevního obrazu jsou snad nejznámějším příkladem, kde se referenční rozmezí liší u mužů a žen. (viz. Příloha – referenční hodnoty KO) Dalším neovlivnitelným faktorem je rasová příslušnost. Běžně je známá odlišná frekvence výskytu některých onemocnění či distribuce krevních skupin u příslušníků různých ras, i když žijí ve stejném prostředí. Liší se však někdy i hodnotou referenčních mezí některých laboratorních vyšetření. Například příslušníci negroidní rasy mají významně menší počet granulocytů než běloši. (Racek et al., 2006) V neposlední řadě je nutné přihlídnout k věku pacienta, neboť většina testů má v dětském věku nižší horní hranici referenčního rozmezí. V souvislosti s referenčními hodnotami je nutné zmínit, že rozložení výsledků vyšetření v referenční populaci a způsob stanovení referenčních mezí, který je v podstatě založen na principech pravděpodobnosti, vede k tomu, že množství zdravých jedinců (obvykle 5 %) má hodnoty ležící mimo referenční rozmezí. (Racek et al., 2006)

Mezi ovlivnitelné faktory patří např. vliv kouření. Kuřáci mívají vyšší hladinu hemoglobinu. Na výsledek může mít značný vliv také podávání léků (např. erythropoetin, další růstové faktory).

#### 3.1.2. Odběr vzorku

Obvykle se odebírá venózní krev z loketní žíly. Důležitá je poloha pacienta při odběru krve i určitou dobu před ním. Vstoje dochází k přesunu tekutiny z intravazálního prostoru



do intersticia a koncentrace vysokomolekulárních látek (a látek na ně vázaných) v krvi včetně hematokritu může stoupnout až o 10-15 %. (Racek et al., 2006) Z tohoto důvodu se doporučuje odebírat krev vleže a při opakovaném odběru alespoň neměnit polohu pacienta. Mezi zásady správného odběru patří rychlý a šetrný vpich s krátkým zaškrcením žíly, opatrné nasátí krve, kterou necháme volně vtékat do zkumavky (vyhneme se přílišnému podtlaku, který by mohl vést k mechanické hemolýze), dále přesné dodržení objemu (jednorázové zkumavky plníme po značku) a dokonalé a šetrné promíchání vzorku ihned po odběru. Odebírá-li se krev ze zavedené jehly, ze které kape infuze, nastávají největší chyby, jestliže není nejprve dostatek krve odpuštěn. Zásadně by se tedy měla užít k odběru jiná žíla. (Sakalová et al., 1995) Před samotným odběrem nejprve popíšeme odběrovou nádobku jménem pacienta a znovu zkontrolujeme, tím vyloučíme možnost záměny. Ideální je identifikace pacienta pomocí čárového kódu (bar-kódu) či dokonce pomocí tzv. dot-kódu, což je vlastně dvourozměrný čárový kód umožňující uchování velkého množství informací o nemocném. (Racek et al., 2006)

### **Odběr krve do EDTA**

Krev odebíráme do odběrových zkumavek s antikoagulancii (protisrážlivými látkami). Účinek většiny těchto médií spočívá ve vazbě vápníku v krvi, který je potřebný pro její srážení. EDTA (etylen-diamino-tetraoctová kyselina) se ve formě didraselné a tridraselné soli ( $K_2$ ,  $K_3$ -EDTA) používá velmi často. EDTA chelatačně váže vápník. Možnou chybou je nesprávný poměr EDTA/krev. V případě menšího množství antikoagulancia dojde ke sražení krve ve vzorku, je-li antikoagulancia naopak větší množství, dojde ke snížení hematokritu, zvýšení střední koncentrace hemoglobinu, fragmentaci trombocytů a vytvoření artefaktů v morfologii buněk.

EDTA může u některých pacientů in vitro způsobit agregaci trombocytů a falešnou trombocytopenii (pseudotrombocytopenii), proto je nutné každou trombocytopenii ověřit. (Sakalová et al., 1995)

### **Odběr krve do citrátu**

Odběr krve do citrátu se používá především na hemokoagulační vyšetření. Citrát váže vápník ve formě soli.

#### **3.1.3. Transport vzorku**

Vlastnosti vzorku se po odběru mění v závislosti na čase a prostředí, které je vždy odlišné od krevního oběhu. Ve vzorku se degradované látky nenahrazují, krvinky metabolizují a mění se složení. Rozdílná teplota způsobuje další změny. Působení času, ale i

vnitřní a vnější faktory, je proto nutné omezit na nejmenší možnou míru. Transport vzorku má být rychlý, s co nejkratší časovou prodlevou mezi odběrem a příjmem vzorku. Vzorek nevystavujeme nízkým ani vysokým teplotám (transport v termoboxech) a nadměrným otřesům, tím zabráníme mechanické hemolýze. (Guder et al., 1996) Během přepravy musíme zabránit poškození, úniku obsahu a kontaminaci okolí. (Sakalová et al., 1995)

#### **3.1.4. Příprava vzorku ke zpracování**

Při příjmu a registraci vzorku je důležité přiřadit vzorky k žádankám o vyšetření, posoudit kvalitu odebraného vzorku i úplnost žádanky. Vzorku krve je přiděleno laboratorní číslo, kód, který může vyjadřovat pořadové číslo příjmu nebo pořadové číslo určitého druhu vyšetření. Stejný kód se připisuje přímo na žádanku a pod tímto kódem jsou informace o pacientovi také vedeny v laboratorním informačním systému.

### **3.2. Analytická fáze**

Analytická fáze je charakterizována vlastní laboratorní metodou, kde zásadní roli hraje správnost a přesnost metody, dále je charakterizována stanovením referenčního rozmezí, zhodnocením klinické senzitivity a specifity. (Racek et al., 2006)

#### **3.2.1. Analytické vlastnosti laboratorní metody**

Mezi analytické vlastnosti laboratorní metody patří přesnost a správnost. Přesnost metody je definována jako míra shody mezi výsledky získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek. Počet stanovení je minimálně dvacet; provádějí se buď najednou v jedné sérii nebo každý den jedno stanovení po dobu minimálně jednoho měsíce, nebo se stejný vzorek rozešle k analýze do různých laboratoří. Podle těchto podmínek rozlišujeme přesnost v sérii, v čase a mezilaboratorní. Správnost je definována jako shoda mezi výsledkem měření a skutečnou hodnotou. (Racek et al., 2006)

#### **3.2.2. Vlastnosti laboratorní metody z klinického hlediska**

Pro správné hodnocení je třeba znát nejen parametry analytické, ale i vlastnosti klinické, které mají vztah ke stanovení diagnózy. Vyšetřované osoby mohou z hlediska přítomnosti určité nemoci patřit k jedné ze dvou populací, k nemocným nebo zdravým. V ideálním případě dává laboratorní test pozitivní výsledek u všech nemocných, zatímco všichni zdraví jedinci mají výsledek testu negativní. Převážná většina testů však dává pozitivní výsledek i u malé části zdravých osob, zatímco určitý podíl nemocných má zase

výsledek testu negativní. Z tohoto hlediska se vyšetřovaní jedinci rozpadají na čtyři subpopulace, kde se projeví správná pozitivita (nemocní s pozitivním testem), falešná pozitivita (zdraví s pozitivním testem), správná negativita (zdraví s negativním testem) a falešná negativita (nemocní s negativním testem). (Racek et al., 2006)

Diagnostická citlivost metody je definována jako podíl počtu nemocných s pozitivním testem a celkového počtu testovaných nemocných. Je tedy ukazatelem spolehlivosti metody odhalit nemoc. Udává pravděpodobnost, že výsledek testu bude pozitivní, je-li vyšetřovaná osoba nemocná. Její hodnota se pohybuje od 0 do 1 (0-100 %), diagnosticky cenné testy mají samozřejmě vysokou citlivost. (Ekins et Edwards, 1997)

Diagnostická specifita je definována jako podíl počtu zdravých osob s negativním testem a celkového počtu testovaných zdravých jedinců. Diagnostická specifita je tedy měřítkem spolehlivosti metody vyloučit přítomnost nemoci, vyjadřuje pravděpodobnost negativního výsledku u zdravé osoby. Její hodnota se opět pohybuje v rozmezí od 0 do 1 (0-100 %) a i zde je žádoucí, aby metoda měla co nejvyšší specifitu. (Racek et al., 2006)

Diagnostická senzitivita se týká pouze populace nemocných, zatímco diagnostická specifita vyjadřuje výsledky metody ve vztahu ke zdravým jedincům. V praxi však vyšetřujeme populaci smíšenou, tvořenou zdravými i nemocnými osobami, proto nelze tyto dvě laboratorní metody nikdy oddělit. Rozhodující pro poměr diagnostické senzitivity a specifity je určení takové hodnoty testu, od které bude výsledek považován za pozitivní (tzv. cutt-off value, diskriminační hodnota). (Ekins et Edwards, 1997)

### **3.2.3. Referenční hodnoty laboratorního vyšetření**

Každý, kdo se setká s výsledkem laboratorního vyšetření, hodnotí, zda je změřená hodnota fyziologická, snižená či naopak zvýšená. Výsledek je tedy třeba porovnat s rozmezím fyziologických hodnot. Podle toho, jak se toto rozmezí určuje, hovoříme nejčastěji o referenčních hodnotách a určujeme referenční meze, které vymezují referenční interval. Velmi často nás zajímají obě hodnoty, dolní i horní referenční mez. Referenční (fyziologické) rozmezí je definováno jako takové hodnoty laboratorního testu, mezi nimiž leží většina hodnot získaná měřením referenční populace. Za většinu je obvykle považováno 95 % výsledků. Referenční populace je pak soubor jedinců, kteří splňují určité předpoklady, nejčastěji je to nepřítomnost nemoci. Často bývají také zohledňovány i jiné podmínky, které vedou k třídění na subpopulace, např. podle věku, pohlaví a rasy. (Racek et al., 2006)

Protože obvykle nelze vyšetřit celou referenční populaci, provádíme náhodný výběr a získáme tak výběrovou referenční skupinu. U ní měříme výběrové referenční hodnoty a

určujeme výběrové referenční rozložení a výběrové referenční meze. Je-li výběrová referenční skupina dostatečně velká a byl-li správně proveden náhodný výběr, odpovídá odhad referenčních mezí u výběrové skupiny skutečným referenčním mezím u celé referenční populace s co nejmenší nejistotou. Stanovit referenční rozmezí můžeme dvěma způsoby – přímou a nepřímou metodou.

### **Přímá (induktivní) metoda**

Přímá metoda odhadu referenčního rozmezí bývá užívána častěji a je založena na předpokladu získání výběrové referenční skupiny s příslušnými předpoklady, nejčastěji se jedná o soubor zdravých jedinců. V praxi se volí obvykle dárci krve, u kterých se předpokládá, že jsou vyšetřeni a výskyt závažnější choroby je u nich málo pravděpodobný. Nevýhodou tohoto výběru je především věková struktura dárců (spíše mladší jedinci), která neodpovídá např. struktuře hospitalizovaných pacientů (obvykle starší osoby). Výpočet referenčních mezí provedeme tak, že seřadíme všechny výsledky vzestupně podle velikosti a na obou koncích vyčleníme příslušné procento výsledků. Nejčastěji se pracuje s referenčním rozmezím, kde je zahrnuto 95 % výsledků, proto na obou koncích „odřízneme“ 2,5 % výsledků (Gaussova křivka).

### **Nepřímá (deduktivní) metoda**

Nepřímá metoda odhadu referenčních mezí bývá používána v případě, že nemáme k dispozici data z vhodné výběrové referenční populace, ale pouze data získaná vyšetřením pacientů. Jedná se tedy o výsledky smíšené populace zdravých i nemocných jedinců. Nevýhodou této metody je bezesporu potřeba získat velké množství dat (řádově až desetitisíce), jejichž sběr a zpracování trvá dlouhou dobu. Další nevýhodou této metody stanovení je nemožnost odhadu rozložení výsledků zdravých osob. Oproti tomu výhodou je získání dat z populace, kterou hodnotíme. Velké množství výsledků umožňuje posoudit, zda jsou referenční meze závislé např. na věku či pohlaví. (Solberg et al., 1989)

V referenčních mezích se nachází 95 % všech výsledků referenční populace – nejčastěji zdravých jedinců. To však znamená, že u 5 % zdravých jedinců najdeme výsledek mimo referenční rozmezí. Toto je pouze známkou individuality těchto jedinců, nikoliv přítomností onemocnění. (Racek et al., 2006)

## **3.2.4. Kontrola kvality laboratorního vyšetření**

Zajištění analytické spolehlivosti laboratorních vyšetření patří k základním povinnostem každé laboratoře. Z velké části je jí dosaženo prováděním kontroly kvality. Pod kontrolou kvality si představíme provádění analýz kontrolních vzorků, jejich správné

hodnocení a v případě potřeby včasná reakce laboratoře na zjištěné závady. Podle toho, zda je kontrola prováděna samotnými pracovníky laboratoře či nezávislým kontrolním orgánem, rozlišujeme interní (vnitřní) a externí (vnější) kontrolu kvality. (Racek et al., 2006)

### **Vnitřní kontrola kvality (Internal Quality Control, IQC)**

Vnitřní kontrola kvality je zaměřena na sledování kontroly přesnosti laboratorní metody a správnosti. U kontroly přesnosti laboratorní metody je s každou sérií stanovení prováděna analýza kontrolního vzorku. Změřené hodnoty se musí co nejméně lišit od dlouhodobého průměru, protože je stále používán stejný kontrolní vzorek. Mimo rozmezí smí ležet jen 5 % výsledků kontrolních vzorků (jeden z dvaceti). Jiným způsobem kontroly přesnosti je opakování analýzy kteréhokoli vzorku pacienta a porovnání míry shody těchto výsledků. Správnost metody je kontrolována pomocí komerčně vyráběných kontrolních vzorků s atestem, tj. uvádějících rozmezí, ve kterém se má výsledek pohybovat. (Sakalová et al., 1995)

### **Vnější kontrola kvality (External Quality Control, EQC)**

Externí hodnocení kvality je založené na porovnání výsledků dosažených v laboratoři s výsledky ostatních laboratoří. Organizuje ho pověřená instituce, v České republice je to Systém externí kontroly kvality (SEKK). Cílem je zlepšení analytické činnosti, projevující se dosažením maximální shody výsledků měření stejných vzorků v různých laboratořích.

Diskutovaná kontrola kvality laboratorního vyšetření, ať vnitřní (IQC) či vnější (EQC), je jen součástí širší problematiky označované pojmem správná laboratorní práce, SLP (Good laboratory practice, GLP). Systém SLP lze definovat jako organizační postupy a podmínky plánování, provádění, sledování, zaznamenávání a vydávání výsledků laboratorní činnosti a důsledné používání těchto dokumentů v praxi. Pro zajištění spolehlivosti výstupů z laboratoře nestačí totiž jen bezprostřední kontrola jednotlivých analytických metod, resp. jejich výsledků. Relevantnost výsledků produkovaných laboratoří závisí i na dalších okolnostech, např. na respektování preanalytických vlivů, organizaci práce a manipulaci se vzorky, správné dokumentaci výsledků i jejich interpretaci. (Racek et al., 2006)

### **3.3. Postanalytická fáze**

Postanalytická fáze může být zatížena chybou při přenosu zjištěných dat a jejich špatnou interpretací.

#### 4. Trombocytopenie a substituční terapie

Trombocytopenie je kvantitativní porucha krevních destiček. O trombocytopenii hovoříme při snížení počtu trombocytů v periferní krvi pod dolní hranici normy, která je  $150 \times 10^9/l$ . (Kubisz et al., 2006) Při poklesu trombocytů pod  $50 \times 10^9/l$  dochází často k vzniku hematomů, pokles pod  $20 \times 10^9/l$  je spojen s vážným až život ohrožujícím krvácením. Trombocytopenie může být vyvolána zvýšenou destrukcí destiček nebo jejich zvýšenou spotřebou např. při koagulaci, resp. jejich zvýšenou sekvestrací ve slezině, nebo i jinými ztrátami. K poklesu trombocytů dochází i tehdy, nestačí-li kostní dřeň vytvářet dost trombocytů, tedy za snížené trombocytopenie. (Friedmann et Vaňásek, 1994) K trombocytopenii může docházet z vrozených nebo získaných příčin. K nejzávažnějším trombocytopeniím patří idiopatická trombocytopenická purpura (ITP), trombocytopenie provázející dřeňový útlum (idiopatický, polékový) nebo útlak kostní dřeně nádorovou nebo leukemickou infiltrací. (Penka et al., 2001)

Nejčastějším společným příznakem trombocytopenií je petechiální typ krvácení do kůže, spontánní tvorba modřin a krvácení ze sliznic, zejména z dásní a nosu. (Friedmann et Vaňásek, 1994) Trombocytopenie se projevují také krvácením z gastrointestinálního traktu a gynekologickými krváceními. (Penka et al., 2001) Krvácení do kloubů je vzácné. (Friedmann et Vaňásek, 1994) Častější je krvácení do spojivkového vaku, do sklivce a do sítnice. (Howard et Hamilton, 1997) Nejzávažnější komplikací je nitrolebeční krvácení, které může vést ke smrti. Krvácení z povrchových řezných ran je prodloužené (chybění primární hemostatické zátky), u těžké trombocytopenie dochází ke krvácení i z míst injekčních vpichů. (Friedmann et Vaňásek, 1994)

Za lehkou trombocytopenii považujeme hodnoty krevních destiček kolísající pod  $100 \times 10^9/l$ , za středně těžkou počet trombocytů kolísající kolem  $50 \times 10^9/l$  a za těžkou trombocytopenii považujeme hodnoty pod  $20 \times 10^9/l$ . (Penka et al., 2001)

Klasifikace trombocytopenií je založena na příčinách jejího vzniku. Trombocytopenie jsou rozdělovány podle zvýšené destrukce trombocytů a to na imunitně i neimunitně podmíněné, dále na trombocytopenie ze zvýšených ztrát a také na trombocytopenie způsobené poruchou trombocytopenie. (Beutler et al., 2001)

#### **4.1. Zvýšená destrukce trombocytů - imunitně podmíněné trombocytopenie**

Mezi imunitně podmíněné trombocytopenie je řazena idiopatická trombocytopenická purpura, alloimunní novorozenecká trombocytopenie a polékové, potransfuzní a heparinem indukované trombocytopenie.

##### **Idiopatická trombocytopenická purpura – ITP**

ITP je trombocytopenie způsobená zkráceným přežíváním trombocytů v důsledku navázání specifických autologních antitrombocytových protilátek (většinou typu IgG<sub>3</sub>) na povrch trombocytů (hlavně membránový glykoprotein - GP). Touto vazbou poškozené trombocyty jsou předčasně sekvestrovány RES, hlavně slezinou. Zkrácené přežívání trombocytů aktivuje zpětnou vazbou trombocytopenie a megakaryocytopenie v kostní dřeni. U ITP rozlišujeme formu akutní a chronickou. (Kubisz et al., 2006)

##### **Akutní forma ITP**

Akutní forma této nemoci je obvyklá v dětství (Howards et Hamilton, 1997) a někdy bývá nazývána také jako postinfekční trombocytopenie. (Beutler et al., 2001) Infekční onemocnění, které předchází purpuře o několik týdnů, (Beutler et al., 2001) často bývá virové. Jako příčina vzniku se předpokládá účinek imunokomplexů tvořených virem a proti němu vznikající protilátkou. Onemocnění se vyskytuje především u dětí ve věku 2-7 let a trvá několik dní až měsíců. (Penka et al., 2001) Počet trombocytů je často nižší než  $20 \times 10^9/l$ . (Howards et Hamilton, 1997) Onemocnění se projevuje petechiemi, purpurou, krvácením do sliznic. Často jsou pozorovány spontánní remise (80 %), zřídka recidivy (20 %). (Penka et al., 2001)

##### **Chronická forma ITP**

První popis chronické formy ITP je připisován Werlhofovi na případu mladé ženy z roku 1735, u které se náhle začaly objevovat kožní petechie a krvácení ze sliznic. (Jones et Tocantins, 1933) Chronická forma ITP postihuje spíše dospělé středního věku, pouze asi jedna třetina nemocných je starších 45 let. (Penka et al., 2001) Jednoznačně převažuje onemocnění žen, ve třetí a čtvrté dekádě je poměr žen k mužům asi 4:1. (Friedmann et Vaňásek, 1994) Za příčinu je považován vznik autoprotilátek typu IgG proti povrchovým antigenům trombocytů (GPIIb/IIIa). Změněné trombocyty jsou ve zvýšené míře vychytávány monocytárně-makrofágovým systémem. Na počátku mohou být nemocní bez příznaků (Howards et Hamilton, 1997), nebo se ITP projevuje krvácivými projevy různé intenzity. (Kubisz et al., 2006) Vážné spontánní krvácení je obvykle limitováno snížením počtu krevních destiček pod  $10 \times 10^9/l$ . (Howards et Hamilton, 1997)



## **Diagnostika ITP**

V krevním obraze nalézáme normální morfologii a normální zastoupení červených i bílých krvinek (Kubisz et al., 2006), přítomná je trombocytopenie s morfologicky většími destičkami. (Howards et Hamilton, 1997) Doba krvácení je prodloužená, čas přežívání trombocytů je naopak zkrácen a ve zvýšené míře jsou trombocyty destruovány v RES a slezině. U poloviny případů jsou prokazatelné protilátky cirkulující v krvi, resp. navázané na trombocyty proti trombocytům. (Kubisz et al., 2006) Důležité při stanovování diagnózy je vyloučení jiné příčiny trombocytopenie, odlišení od pseudotrombocytopenie, polékových trombocytopení aj. (Penka et al., 2001)

## **Léčba ITP**

Terapie ITP zahrnuje snahu o potlačení tvorby protilátek proti trombocytům (kortikoidy, imunoglobuliny, imunosupresivní léčba), event. potlačení sekvestrace – splenektomií. V případě závažného krvácení je indikována transfuze trombocytárního koncentrátu. (Penka et al., 2001)

## **Alloimunní novorozenecká trombocytopenie**

Toto onemocnění je způsobeno mateřskými protilátkami proti trombocytům, které jsou přeneseny přes placentu. (Moulinier, 1953) Trombocytopenie bývá zjištěna krátce po porodu a přetrvává několik týdnů až měsíců. Novorozenci jsou ohroženi zejména krvácením do mozku. (Mueller-Eckhardt et al., 1989)

## **Potransfuzní purpura**

Potransfuzní purpura se objevuje přibližně týden po podání krevní transfuze. (Shulman et al., 1993) Je to velmi vzácné onemocnění a postihuje téměř vždy ženy. Vzácné je proto, že asi jen 2 % populace nemá na svých destičkách antigen P1<sup>A1</sup>. Tito jedinci tvoří protilátky proti uvedenému antigenu, který dovede s protilátkou vytvořit komplex, který má velkou afinitu k vlastním trombocytům nemocného. (Friedmann et Vaňásek, 1994) Potransfuzní purpura je zřídka provázena fatálním krvácením a upravuje se do 1-5 týdnů. (Penka et al., 2001)

## **Polékové trombocytopenie**

Polékové trombocytopenie vznikají asi za týden při kontinuálním podávání, při nárazovém podávání za několik hodin. Léků, které způsobují pokles počtu trombocytů je popsáno mnoho, k nejčastějším patří některá antiepileptika (např. kyselina valproová),



analgetika i některá antibiotika (cefalosporiny). (Penka et al., 2001) Ke vzniku polékové trombocytopenie mohou vést dva mechanismy. V prvním případě může jít o vazbu léku na bílkovinný nosič v plazmě, čímž se vytvoří tzv. primární antigen. Někdy je to však možné i bez bílkovinného nosiče. Tento antigen vyvolá tvorbu protilátek, protože množství léku potřebné pro vyvolání trombocytopenie je zcela nepatrné. (Friedmann et Vaňásek, 1994) Léčba většinou není nutná, opatřením je ukončení podávání preparátu a nahrazení jej lékem nepříbuzným. (Penka et al., 2001)

### **Heparinem indukovaná trombocytopenie - HIT**

Heparinem indukovaná trombocytopenie je komplikací léčby heparinem. (Penka et al., 2001) Léčba heparinem měla široké klinické uplatnění do doby, nežli byla poprvé popsána trombocytopenie jako vedlejší efekt léčby. (Gollub et al., 1962) Mezi lety 1969 až 1974 byla u pěti pacientů prokázána těžká trombocytopenie související s heparinovou terapií. (Klein et Bell, 1974) Údaje o výskytu HIT se značně liší a pohybují se mezi 1-30 % osob léčených heparinem. U HIT rozlišujeme dva typy, HIT I. a HIT II.typu.

#### **HIT I.typu**

Trombocytopenii zde navozuje přímý účinek vysokomolekulární frakce heparinu, který vede ke zvýšené agregaci krevních destiček a tím i k jejich zvýšené konzumpci se současným snížením počtu trombocytů. Zjišťována bývá v přímé souvislosti s podáváním léku.

#### **HIT II.typu**

Zde dochází k závažnému poklesu počtu trombocytů (pod  $50 \times 10^9/l$ ) a může dojít k bezprostřednímu ohrožení života. Vzniká pravděpodobně v souvislosti s výskytem autoprotilátek proti komplexu heparinu a destičkového faktoru 4, který představuje antiheparinovou aktivitu destiček. (Penka et al., 2001) HIT II.typu je život ohrožujícím stavem.

### **4.2. Zvýšená destrukce trombocytů - neimunitně podmíněné trombocytopenie**

Mezi neimunitně podmíněné trombocytopenie řadíme například trombotickou trombocytopenickou purpuru a hemolyticko-uremický syndrom.

## **Trombotická trombocytopenická purpura (TTP) a hemolyticko-uremický syndrom (HUS)**

Trombotická trombocytopenická purpura (TTP) a hemolyticko-uremický syndrom (HUS) byly popsány jako odlišné choroby, ale v současnosti jsou považovány za totožnou nemoc. (Streiff et Bell, 1993) Klasifikace na TTP a HUS zůstává z historických důvodů. (Beutler et al., 2001) TTP je známá také jako syndrom Moschowitzové. Je to vzácná, ale vážná choroba, která postihuje v dospělosti mladší jedince. Projevuje se hemolytickou anémií, horečkou, trombocytopenií, neurologickými poruchami a postižením ledvin. (Friedmann et Vaňásek, 1994) HUS narozdíl od TTP postihuje spíše děti do 1 roku. Klinicky se projevuje akutním selháním ledvin, hemolytickou anémií s fragmentovanými erytrocyty a trombocytopenií.

### **4.3. Trombocytopenie vyvolané poruchou tvorby krevních destiček**

Mezi trombocytopenie způsobené poruchou tvorby krevních destiček patří několik hereditárních syndromů, například trombocytopenie s aplazií radia (TAR). Tato nemoc je provázena malformacemi srdce, ledvin a zejména chyběním obou kostí vřetenních. (Friedmann et Vaňásek, 1994) Dále sem řadíme Mayovu-Hegglinovu anomálii (autozomálně dominantní dědičnost) s megatrombocytární trombocytopenií nebo Wiskottův-Aldrichův syndrom (recesivní dědičnost vázaná na X chromozom) s mikrocytární trombocytopenií. (Penka et al., 2001) Zmíněné choroby nejsou příliš časté.

Nedostatečná trombopoéza se projevuje také působením řady léků (tiazidová diuretika, estrogeny) a po jejich vysazení zpravidla trombocytopenie rychle ustoupí. (Penka et al., 2001) Hypoprodukční trombocytopenie může být také vyvolána toxickým účinkem alkoholu na kostní dřeň a vitaminovou deprivací u alkoholiků. Ke vzniku trombocytopenie vede také nedostatek železa, vit B<sub>12</sub> atd. Vedle zmíněných patologických stavů může být trombocytopenie důsledkem působení řady myelosupresivních vlivů, např. ionizačního záření nebo organických rozpouštědel. V terapii krvácivých projevů jsou účinné trombocytární koncentráty.

### **4.4. Pseudotrombocytopenie**

Pseudotrombocytopenie bývá označována jako laboratorní fenomén in vitro zjišťovaný snížením počtu trombocytů při jejich normální hodnotě in vivo. (Penka et al., 2001) V roce 1973 Schreiner a Bell poprvé popsali pseudotrombocytopenii (Schreiner et Bell, 1973), stav, kdy se trombocyty shlukují v přítomnosti EDTA. (Ohnuma et al., 1988)

Shlukování trombocytů zapříčiněné antikoagulačním činidlem EDTA, používaným při rutinním stanovení krevního obrazu, je nejčastější příčinou falešně nízkého počtu trombocytů. (Beutler et al., 2001) Ke shlukování trombocytů dochází v přítomnosti antikoagulancia v souvislosti s výskytem chladových aglutininů nebo destičkovým satelismem. K tomuto jevu dochází až po delší inkubaci vzorku. Při počítání trombocytů bezprostředně po odběru či při pořízení nátěru tuto patologii nepozorujeme. Nepozorujeme ji mnohdy ani po záměně antikoagulancií. Těchto poznatků se využívá při průkazu pseudotrombocytopenie. (Penka et al., 2001) K odlišení od trombocytopenie přispívá i skutečnost, že pacient s extrémně nízkým počtem krevních destiček nekrvácí.

Pseudotrombocytopenie se vyskytuje u 0,1-2 % vyšetření. (Penka et al., 2001) Zanedbání prokázání pseudotrombocytopenie může vést k odložení operace, přerušení léčby, ale dokonce i ke zbytečné terapii kortikoidy a splenektomií. (Onder et al., 1980, Mayan et al., 1992) Stanovení pseudotrombocytopenie je zcela zásadní v předcházení podávání neindikovaných trombocytárních koncentrátů. (Penka et al., 2001)

#### **4.5. Substituční léčba trombocytopenie**

Substituční léčba trombocytopenie, tedy podání trombocytárního koncentrátu, je indikována při terapii pacienta se závažnou formou trombocytopenie. (Howards et Hamilton, 1997) Substituční léčba má svá nezanedbatelná rizika a je velmi nákladná. Je proto žádoucí snížit množství destičkových transfuzí na minimum. Samotný počet destiček by neměl sloužit jako jediné kritérium pro podání transfuze. Pravděpodobnost krvácení je kromě počtu destiček závislá také na jejich funkčním stavu, etiologii trombocytopenie a dalších klinických faktorech, mezi které patří zejména poruchy koagulace, horečka, systémové infekce, renální selhání a léky ovlivňující trombocytární funkce a antikoagulancia. (Penka et al., 2001)

Pacienti s funkční kostní dření a současně zvýšenou periferní destrukcí destiček obvykle nemají ze substituce prospěch, neboť dárcovské destičky jsou rychle odstraňovány z oběhu podobně jako vlastní. U těchto pacientů je podání destiček indikováno v ohrožení života, neboť i krátkodobý vzestup destiček po transfuzi může mít hemostatický efekt.

Podávání transfuzí destiček by mělo být vyhrazeno především pro pacienty se sníženou produkcí destiček v kostní dření. V současné době je doporučovaná hranice pro podání profylaktické transfuze počet trombocytů nižší než  $5-10 \times 10^9/l$  u jinak stabilizovaného nekrvácejícího pacienta. Je-li zvýšeno riziko krvácení, je hranice zvýšena na  $20 \times 10^9/l$ . Vyšších koncentrací trombocytů je třeba při provádění invazivních zákroků. Potřebná dávka destiček se řídí hmotností pacienta a zejména koncentrací, kterou chceme jejich podáním

dosáhnout. Jeden koncentrát by měl u 70-ti kg příjemce zvýšit počet destiček o  $7-10 \times 10^9/l$ , měřeno hodinu po transfuzi. Za minimální terapeutickou dávku se považuje  $2 \times 10^{11}$  trombocytů pro dospělého. Obvykle je dostačujících 5 transfuzních jednotek (TU) směsného koncentrátu nebo trombokoncentrát od jednoho dárce ze separátoru. Dárce trombocytů má být ABO a Rh kompatibilní. V naléhavých případech je možné podat destičky skupiny 0 příjemcům skupiny A nebo B. (Penka et al., 2001)

#### **4.5.1. Transfuzní přípravky**

Do transfuzních přípravků zahrnujeme jakékoli léčebné látky biologického původu, které jsou připraveny z lidské krve od jednoho nebo několika dárců. Krev dárců se odebírá do schváleného vaku s konzervačním roztokem jako celá krev. Používají se různé vakové systémy, podle toho, jaké transfuzní přípravky se z celé krve vyrábějí. (Kubisz et al., 2006) Ke zpracování krve na erytrocyty, trombocyty a plazmu se používá čtyřvak. Čtyřvak obsahuje jeden odběrový vak a tři vaky satelitní. Transfuzní jednotka (TU, trasfusion unit) je množství transfuzního přípravku, který je vyrobený z jedné jednotky celé krve, tj. 450 ml krve. (Kubisz et al., 2006)

#### **4.5.2. Trombocytární koncentrát**

Trombocytární koncentrát je koncentrát krevních destiček v plazmě. Rozlišujeme trombocytární koncentrát z jednotky plné krve a trombocytární koncentrát z aferézy.

##### **Trombocytární koncentrát z jednotky plné krve**

Jedná se o výrobek, který je připravený diferenční centrifugací z plné krve od jednoho dárce (1 TU). Koncentrát se skladuje v plastovém vaku maximálně 5 dní při teplotě 20-24 °C. Vaky musí být po celou dobu skladování kontinuálně promíchávány na automatických třepačkách. Obsah trombocytů je minimálně  $0,5 \times 10^{11}$  trombocytů v 60-70 ml plazmy. (Kubisz et al., 2006) K účinné substituci jednoho pacienta je obvykle podáno 5 TU trombocytárních koncentrátů z celé krve, tedy od pěti dárců.

##### **Trombocytární koncentrát z aferézy**

Připravuje se přístrojovou aferézou trombocytů od jednoho dárce na automatickém separátoru krvinek. Obsah trombocytů je  $2-6 \times 10^{11}$  v 1 TU. Na účinnou substituci jednoho pacienta stačí 1 TU od jednoho dárce. Výhodou je vyšší výtěžnost trombocytů, odběr trombocytů od vybraných dárců a snížené riziko alloimunizace. (Kubisz et al., 2006)

## **Skladování trombocytárních koncentrátů**

Trombocytární koncentráty z jednotky celé krve i trombocytární koncentráty z aferézy mohou být 5 dní skladovány stejným způsobem za příslušných podmínek. (Beutler et al., 2001) Základním pravidlem je uchovávání trombocytárních koncentrátů při teplotě 20-24 °C, neboť nižší teplota snižuje životaschopnost trombocytů. Dále je důležité, aby skladovací kontejner byl konstruován z plastové hmoty, díky čemuž je umožněna difuze kyslíku potřebného k buněčnému metabolismu. (Murphy, 1985) Není-li přísun kyslíku adekvátní, začnou trombocyty ve zvýšené míře produkovat kyselinu mléčnou, to vede k poklesu pH prostředí, ve kterém už nejsou trombocyty životaschopné. (Murphy, 1985) Během skladování mají být trombocytární koncentráty kontinuálně protřepávány. (Moroff et George, 1990)

## **Indikace pro podání trombocytárních koncentrátů**

Pravidla pro terapii trombocytárními koncentráty byla ustanovena na základě řady studií. Principy nastíněné níže mohou být interpretovány s jistou volností, v zásadě zohledněnou klinickým stavem jednotlivých pacientů. Všeobecně zvýšení počtu destiček na 20 až 50x10<sup>9</sup>/l chrání trombocytopenické pacienty před fatálním krvácením. Vyjímkou může být očekávaná invazivní procedura, kde je žádoucí zvýšení počtu trombocytů na 60 až 100x10<sup>9</sup>/l. (McVay et Toy, 1990)

Následkem agresivní terapie malignit cytostatiky je hypoplazie kostní dřeně a trombocytopenie, která vyžaduje transfuzi destiček ke kontrole krvácivých projevů. Zmínit zde můžeme např. terapii akutní leukemie u dospělých. Jestliže se u takového pacienta objeví patologické krvácení, je mu indikována transfuze destiček za účelem zvýšení počtu trombocytů a kontrole hemoragií. Podání transfuze trombocytů je doporučováno, když trombocyty klesnou pod 20x10<sup>9</sup>/l. (Patten, 1992, Baer et Bloomfield, 1992) Dvě studie porovnávaly profylaktické podání transfuze destiček při počtu trombocytů menším než 15 až 20x10<sup>9</sup>/l s transfuzí podanou při závažném krvácení. (Solomon et al., 1978, Murphy et al., 1982) Nebyl zjištěn žádný rozdíl v přežití, ačkoli jedna studie (Murphy et al., 1982) prokázala podstatně méně hemoragií ve skupině, kde byly preventivně podávány transfuze destiček.

Jiné studie (Gmur et al., 1991) a komentáře (Schiffer, 1993) naznačují, že podání transfuze vždy, když klesne počet trombocytů pod 20x10<sup>9</sup>/l je zbytečné a nevhodné. (Gmur et al., 1991) Hodnota 5x10<sup>9</sup>/l se zdá být mnohem vhodnější. Rozhodnutí podat transfuzi trombocytů v rozmezí 5 až 20x10<sup>9</sup>/l závisí na zvážení klinického stavu pacienta. (Beutler et al., 2001)

U idiopatické trombocytopenické purpury se transfuze destiček obvykle nepoužívá, protože tendence ke krvácení je menší než u trombocytopenií vyvolaných sníženou produkcí

trombocytů a reakce na lékovou terapii je většinou dostatečně rychlá. Kromě toho doba přežívání dárcovských destiček je poměrně krátká, obdobně jako u vlastních destiček pacienta. (Beutler et al., 2001) Nicméně, dojde-li k závažnému krvácení, nebo je-li nutná urgentní operace, 3-6 transfuzních jednotek trombocytárního koncentrátu od náhodných dárců na m<sup>2</sup> povrchu těla obvykle zvýší počet trombocytů na 12 až 48 hodin. (Carr et al., 1986) Stejná pravidla platí u jiných chorob, u kterých je zvýšena destrukce trombocytů, jako např. trombotická trombocytopenická purpura. (Beutler et al., 2001)

U novorozenecké alloimunní trombocytopenie jsou mateřské destičky kompatibilní a 1 jednotka trombocytárního koncentrátu z matčiny krve může adekvátně zvýšit u kojence počet destiček po transfuzi. (McIntoch et al., 1973) V ideálním případě by měly destičky být proprány od plasmy, abychom se vyhnuli dalším protilátkám. (Beutler et al., 2001)

Hereditární trombocytopenie nejsou obvykle spojovány se závažným krvácením. (Murphy, 1972) Doba přežívání alloimunních trombocytů je normální, transfuze destiček je poměrně efektivní a může být použita při závažném krvácení nebo operačním zákroku. (Beutler et al., 2001)

#### **4.5.3. Metodika podání transfuze**

Před samotným podáním je lékař povinen zkontrolovat identitu pacienta, výsledek krevní skupiny a ověřit údaje na transfuzním přípravku (zejména datum expirace, krevní skupinu). Dále je nutná kontrola vzhledu a celistvosti obalu trombocytárního koncentrátu a zhodnocení klinického stavu pacienta. Bezprostředně před podáním transfuze musí lékař vyšetřit krevní skupinu AB0 pacienta a vykonat biologickou zkoušku – za soustavného sledování pacienta podat proudem 10-15 ml transfuzního přípravku. Pokud se u pacienta neobjevily známky nežádoucích reakcí, upraví rychlost transfuze (1-2 kapky za sekundu). Transfuze obvykle trvá 1 až 2 hodiny a pacient musí být po celou dobu sledován. Z důvodu alloimunizace pacienta se monitoruje očekávaný léčebný účinek, to znamená vyšetření krevního obrazu před a po podání koncentrátu. (Kubisz et al., 2006)

## **5. Materiál a použité metody**

### **5.1. Kritéria výběru pacientů**

V období od 1. do 31.října 2006 bylo v Nemocnici České Budějovice, a.s. vyšetřeno 8509 krví pacientů. Hodnoty krevního obrazu (KO), tedy i počet trombocytů, byly stanovovány na základě žádostí o vyšetření KO pacientů jejich ošetřujícími lékaři.

Dále byly v období od 1.října 2006 do 28.února 2007 v Nemocnici České Budějovice, a.s. podány trombocytární koncentráty 20-ti pacientům, přičemž některým nemocným byly transfuze destiček dány opakovaně. Transfuze trombocytárních koncentrátů byla pacientům indikována na základě stanovení počtu krevních destiček a jejich klinického stavu.

### **5.2. Odběr krve a příprava ke zpracování**

Krev byla odebírána do vakuových zkumavek o objemu 3 nebo 4,5 ml. Ve zkumavkách byla obsažena EDTA (etylen-diamino-tetraoctová kyselina) jako antikoagulační činidlo v poměru 1,5 mg EDTA na 1 ml krve. Úkolem antikoagulačního činidla je vázat vápenaté ionty, čímž se zabrání nechtěné koagulaci.

Zkumavky s odebranou krví byly po doručení na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a.s. přiřazeny k žádankám a označeny identifikačním číslem, kódem – stejným vždy na žádance o vyšetření a zkumavce s odebranou krví pacienta. Poté byly hodnoty KO vyšetřovaných krví stanovovány na automatickém hematologickém analyzátoru.

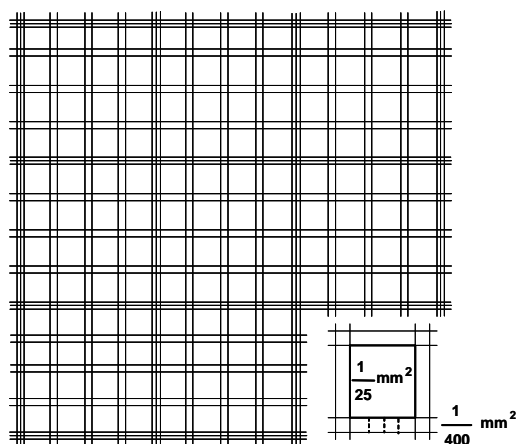
### **5.3. Laboratorní vyšetření**

Laboratorní vyšetření krevního obrazu byla prováděna na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a.s. K vyšetření byl používán automatický hematologický analyzátor Coulter Gen S od firmy Beckman Coulter. Tento automatický hematologický analyzátor pracuje na elektro-impedančním principu. Tento princip spočívá v detekci a měření změn elektrického odporu. K těmto změnám dochází ve vodivém roztoku, ve kterém buňka prochází mezi platinovými elektrodami, což způsobí změnu odporu a následný vznik elektrického pulsu, který je zaznamenán. Počet těchto pulsů odpovídá počtu buněk. (Barnard et al., 1969)

Výsledné patologické hodnoty trombocytů získané automatickým hematologickým analyzátozem Coulter Gen S, které se nacházely mimo referenční rozmezí, byly přeměřeny referenční metodou, abychom vyloučili např. případnou pseudotrombocytopenii. Referenční

metodou se však nepřepočítává patologický počet trombocytů ve všech případech. K referenční metodě přistupujeme u nových záchytů trombocytopenií (hodnoty trombocytů nižších než  $100 \times 10^9/l$ ).

Jako referenční metodu ke stanovení hodnot trombocytů na automatickém hematologickém analyzátoru jsme zvolili manuální počítání krevních destiček v Bürkerově počítací komůrce s použitím mikroskopu. Bürkerova počítací komůrka je ve své podstatě hrubé broušené sklo, na jehož spodní straně je narýsovaná přesná síť známých rozměrů. Pomocí této sítě a výšky komůrky je vymezen mikroskopický prostor, ve kterém se spočítají trombocyty ve zředěné krvi. Počítací mřížka Bürkerovy komůrky je rozdělena trojitými čarami na 9 velkých čtvercových polí ( $1 \text{ mm}^2$ ) a dvojitými čarami na 144 středních ( $1/25 \text{ mm}^2$ ) a 169 malých čtverců ( $1/400 \text{ mm}^2$ ). Mezi dvojitými čarami vznikají obdélníky, jejichž plocha se rovná ploše 4 malých čtverců ( $1/100 \text{ mm}^2$ ). (viz. Obrázek č.1) Krvinky se počítají na určité dané ploše a stabilní výšce komůrky, tedy ve zvoleném objemu.



Obr. č.1: Síť Bürkerovy počítací komůrky

### Manuální počítání trombocytů v Bürkerově komůrce - Metoda podle Piettovece

Základem je ředící roztok prokainu, ve kterém se zvýrazní trombocyty a hemolyzují erythrocyty. Do zkumavky napipetujeme 475  $\mu$ l roztoku prokainu (2,34 g hydrochloridu prokainu, 0,2 g chloridu sodného a do 100 ml doplníme destilovanou vodou). Přidáme 25  $\mu$ l venózní krve, důkladně promícháme. Zkumavku uzavřeme a necháme stát dokud neproběhne ve zkumavce hemolýza. (přibližně 1 hodinu). Poté nanese vzorek do počítací komůrky a necháme trombocyty sedimentovat (asi 10 minut). Trombocyty počítáme při 400 násobném zvětšení ve 20-ti obdélnících. Výsledek násobíme 1000-krát.



#### **5.4. Indikace a metodika podání trombocytárních koncentrátů**

Dále byla v období od 1.října 2006 do 28.února 2007 sledována účinnost podaných trombocytárních koncentrátů na vzestup počtu krevních destiček pacientů. V tomto období byly celkem 20-ti nemocným v Nemocnici České Budějovice, a.s. podány transfuze krevních destiček, přičemž někteří pacienti dostali trombocytární koncentrát opakovaně. Účinnost transfuze krevních destiček lze hodnotit díky porovnání hodnot trombocytů před podáním a následující den po podání trombocytárního koncentrátu.

Pacientům byla odebrána venózní krev do odběrové zkumavky o objemu 3 nebo 4,5 ml s EDTA. Zkumavkám i žádostem o vyšetření KO bylo na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a.s. přiřazeno identifikační číslo a zkumavka s vyšetřovanou krví byla vložena do automatického hematologického analyzátoru. Při posouzení nutnosti podání transfuze krevních destiček rozhodoval počet trombocytů a klinický stav pacienta, zda nemocný krvácel, zda bylo riziko vzniku hemoragií vysoké či jsme chtěli pacientovi podat profylaktickou transfuzi krevních destiček před invazivním zákrokem. Následující den po transfuzi trombocytárního koncentrátu byla nemocným opět odebrána venózní krev a stanoven počet trombocytů na automatickém hematologickém analyzátoru totožným způsobem.

## 6. Výsledky

### 6.1. Stanovení počtu trombocytů automatickým analyzátozem a manuální referenční metodou

V období od 1. do 31. října 2006 bylo v Nemocnici České Budějovice, a.s. vyšetřeno 8509 krví pacientů. Hodnoty krevního obrazu (KO) byly stanovovány na základě žádostí o vyšetření KO pacientů jejich ošetřujícími lékaři.

8509 KO bylo vyšetřeno automatickým hematologickým analyzátozem Coulter Gen S od firmy Beckman Coulter. Získané patologické hodnoty trombocytů automatickým analyzátozem byly v 82 případech konfrontovány s referenční manuální metodou stanovení počtu trombocytů v Bürkerově počítací komůrce. Těchto 82 stanovení referenční metodou je 0,96 % z celkového počtu vyšetření. (viz. Tabulka č.1)

<b>Vyšetření automat. analyzátozem</b>	<b>Vyšetření referenční metodou</b>	
<b>Počet</b>	<b>Počet</b>	<b>%</b>
8509	82	0,96

Tabulka č. 1: Počet vyšetření automat. analyzátozem a ref. metodou

U 82 případů stanovení počtu trombocytů referenční metodou, z celkového počtu 8509 vyšetření KO automatickým analyzátozem, byl referenční metodou v 64 případech (78,05 %) získán shodný výsledek počtu trombocytů. V 18-ti případech (21,95 %) se počet trombocytů získaný referenční metodou neshodoval s hodnotou naměřenou automatickým hematologickým analyzátozem. (viz. Tabulka č. 2) V těchto případech byla odhalena pseudotrombocytopenie, tedy u 0,21 % všech vyšetření ve sledovaném období.

<b>Vyšetřeno ref. metodou</b>	<b>Shodný výsledek</b>		<b>Odlíšný výsledek</b>	
<b>Počet</b>	<b>Počet</b>	<b>%</b>	<b>Počet</b>	<b>%</b>
82	64	78,05	18	21,95

Tabulka č. 2: Výsledky ref. metody

### 6.2. Účinnost podání transfuzí trombocytárních koncentrátů

V období od 1. října 2006 do 28. února 2007 byla v Nemocnici České Budějovice, a.s. 20-ti pacientům indikována substituční terapie trombocytárními koncentráty, a to na základě počtu trombocytů v krvi a klinického stavu nemocného (jedná se zejména o hematologické pacienty). Někteří pacienti dostali transfuzi trombocytů opakovaně. Počet trombocytů byl získáván automatickým hematologickým analyzátozem Coulter Gen S

od firmy Beckman Coulter. U 20-ti pacientů, kterým byla podána transfuze trombocytárního koncentráту, byla sledována účinnost této transfuze na vzestup počtu trombocytů. Posouzení účinku transfuze krevních destiček je možné na základě srovnání hodnot trombocytů krevního obrazu před podáním a následující den po podání trombocytárního koncentráту. Za účinnou transfuzi trombocytárními koncentráty je považován orientačně vzestup destiček nejméně o  $10 \times 10^9/l$  (viz. Tabulka č. 3).

Ze zjištěných hodnot zvýšení počtu trombocytů po podání trombocytárního koncentráту bylo zjištěno, že transfuze byla vždy účinná u 9 pacientů (45 %). U 3 pacientů (15 %), kteří dostali trombocytární koncentrát opakovaně, byl u jedné transfuze vzestup trombocytů nižší než  $10 \times 10^9/l$ , ostatní transfuze u těchto pacientů lze hodnotit jako účinné. I u těchto pacientů lze celkově hodnotit podání trombocytárních koncentrátů jako účinné, vychýlenou hodnotu lze přisoudit klinickému stavu nemocného a je nutné vzít v úvahu možné ztráty krve např. při operačním zákroku. Souhrnně tedy můžeme říci, že podání transfuze krevních destiček bylo účinné u 12-ti pacientů (60 %).

U 4 pacientů (20 %) transfuze krevních destiček účinné nebyly, u 3 z nich počet trombocytů po podání koncentráту dokonce klesl, u těchto pacientů máme podezření na rezistenci na trombocytární koncentráty. Prokázat ji však nemůžeme, abychom potvrdili rezistenci na transfuzi krevních destiček, musela by být u jednoho pacienta transfuze neúspěšná alespoň třikrát po sobě. Rezistenci na trombocytární koncentráty jsme prokázali u 4 pacientů (20 %), u kterých nebylo opakované podání trombocytárních koncentrátů účinné. Celkem u 8 nemocných nebylo podání transfuze destiček účinné. (viz. Tabulka č. 4)

Průměrná hodnota zvýšení počtu trombocytů po podání trombocytárního koncentráту je  $12,64 \times 10^9/l$ .

	Účinná transfuze		Neúčinná transfuze	
	Při každém podání	Kromě 1 podání	Možné rezistence	Rezistence
<b>Počet pacientů</b>	9	3	4	4
<b>Počet p. (%)</b>	45	15	20	20
<b>Celkem pacientů</b>	12		8	
<b>Celkem p. (%)</b>	60		40	

Tabulka č. 4: Účinnost podání transfuzí trombocytárních koncentrátů

	Počet trombocytů před transfuzí (x10 <sup>9</sup> /l)	Počet trombocytů po transfuzi (x10 <sup>9</sup> /l)	Vzestup počtu t. o (x10 <sup>9</sup> /l)	Účinnost
<b>Pacient č. 1</b>	8	32	24	ano
<b>Pacient č. 2</b>	30	89	59	ano
<b>Pacient č. 3</b>	11	18	7	ne
	4	7	3	ne
	7	5	-2	ne
<b>Pacient č. 4</b>	8	12	4	ne
<b>Pacient č. 5</b>	12	4	-8	ne
<b>Pacient č. 6</b>	3	4	1	ne
	4	9	5	ne
	3	3	0	ne
<b>Pacient č. 7</b>	6	55	49	ano
	7	22	15	ano
	12	18	6	ne
<b>Pacient č. 8</b>	5	12	7	ne
	9	12	3	ne
	12	27	15	ano
	3	10	7	ne
	6	11	5	ne
	9	12	3	ne
	11	12	1	ne
	17	28	11	ano
<b>Pacient č. 9</b>	7	17	10	ano
	15	14	-1	ne
	14	6	-8	ne
	6	12	6	ne
<b>Pacient č. 10</b>	20	7	-13	ne
	7	19	12	ano
	7	21	14	ano
<b>Pacient č. 11</b>	7	3	-4	ne
<b>Pacient č. 12</b>	24	64	40	ano
<b>Pacient č. 13</b>	47	76	29	ano
<b>Pacient č. 14</b>	24	35	11	ano
<b>Pacient č. 15</b>	4	13	9	ne
	7	33	26	ano
<b>Pacient č. 16</b>	12	38	26	ano
	10	22	12	ano
	7	39	32	ano
	6	44	38	ano
	5	24	19	ano
	18	35	17	ano
	6	38	32	ano
<b>Pacient č. 17</b>	32	69	37	ano
<b>Pacient č. 18</b>	30	25	-5	ne
	25	24	-1	ne
<b>Pacient č. 19</b>	11	30	19	ano
	8	18	10	ano
<b>Pacient č. 20</b>	1	13	12	ano

Tabulka č. 3: Hodnoty trombocytů před podáním a následující den po podání trombo. koncentrátu

## 7. Diskuse

Parametry krevního obrazu (KO), které zahrnují stanovení počtu trombocytů, jsou v současnosti získávány automatickými hematologickými analyzátory. Výhodou těchto analyzátorů je především jejich rychlost (100 KO za hodinu). (Kubisz et al., 2006) Z celkového počtu 8509 vyšetření krevního obrazu automatickým hematologickým analyzátozem v daném období, jich bylo 82 (0,96%) přeměřeno manuální referenční metodou počítání trombocytů v Bürkerově komůrce. Referenční metoda není v běžné praxi používána u všech vzorků krve, kde jsou zaznamenány patologické hodnoty počtu trombocytů. Referenční metodou jsou přepočítávány nové záchyty trombocytopenií (hodnoty trombocytů nižších než  $100 \times 10^9/l$ ). V ostatních případech se přihlíží i k hodnotám získaných v předešlých odběrech krve, nejsou-li starší než jeden měsíc. To platí zejména u hematologických pacientů, kteří dochází na odběry pravidelně a je u nich známa diagnóza. Dále se bere v úvahu i eventuelní hospitalizace pacienta v nemocnici, případně na jakém oddělení. Z 82 přepočítávaných vzorků krve jsme u 64 z nich dospěli k totožnému výsledku, jaký jsme získali přístrojovým stanovením. U 18-ti přepočítávaných vzorků (0,21 % všech vyšetření) byla odhalena pseudotrombocytopenie. Zjištěná frekvence pseudotrombocytopenie odpovídá literárním údajům. (Penka et al., 2001) Je tedy nepochybné, že je nutné v daných případech výsledky stanovené automatickým hematologickým analyzátozem konfrontovat s manuální metodou počítání trombocytů v Bürkerově komůrce. Odhalením pseudotrombocytopenie zabráníme odložení případné operace, přerušlení léčby, ale i zbytečné, a v tomto případě naopak škodlivé, terapii kortikoidy či dokonce splenektomii. (Onder et al., 1980, Mayan et al., 1992) Stanovení pseudotrombocytopenie je zcela zásadní v předcházení podávání neindikovaných trombocytárních koncentrátů. (Penka et al., 2001)

Problematika přístrojového stanovení počtu trombocytů má několik příčin. Největší frekvence chyb během hematologického vyšetření krevního obrazu, který zahrnuje stanovení hodnoty trombocytů, je právě v období preanalytickém. (Wisser et al., 2002, Racek et al., 2006). Zcela zásadní je nerespektování preanalytických vlivů, které mohou vést k falešně nízkým hodnotám trombocytů in vitro v porovnání s normálními hodnotami in vivo. V extralaboratorní fázi preanalytického období se jedná především o chyby při odběru vzorku, například se odebíraná krev nenechá volně vtékat do zkumavky, čímž může dojít k mechanické hemolýze. Další možnou chybou při odběru vzorku je nedodržení poměru objemu EDTA/krev. EDTA jako přidávané antikoagulancium v menším poměru ke krvi způsobuje srážení krve ve vzorku, naopak větší množství tohoto antikoagulancia způsobuje

fragmentaci trombocytů. (Sakalová et al., 1995) Stejně zásadní je před samotným odběrem nejprve popsat zkumavku jménem a rodným číslem pacienta a po odběru znovu zkontrolovat, tzv. „kontrola čtyř očí“. Toto je problém zejména lůžkových oddělení, kde se odebírá krev několika pacientům a kde je možná záměna vzorku krví při nedostatečné kontrole.

V průběhu intralaboratorní části preanalytického období je kladen největší důraz na správné přiřazení vzorků krví a žádanek a totožné označení obojího identifikačním číslem, kódem, pod kterým je vzorek krve vyšetřován a veden v databázi. Povinností pracovníků hematologické laboratoře je také kontrola objemu krve v odběrové zkumavce.

Minimalizace preanalytických změn můžeme dosáhnout např. využitím kurzů pro výcvik a výuku personálu provádějící odběry, pořizováním databází a laboratorních příruček preanalytických změn v klinických laboratořích a zejména zajištěním přístupu kliniků k těmto informacím a jejich výchovou.

V období analytickém je správnost a přesnost metody laboratorního vyšetření zajišťována vnitřní a vnější kontrolou kvality a je nezbytné těmto kontrolním měřením věnovat čas i pozornost.

V souvislosti s referenčními hodnotami je zajímavé zmínit problematiku jejich stanovení. Referenční (fyziologické) rozmezí je definováno jako takové hodnoty laboratorního testu, mezi nimiž leží většina hodnot získaná měřením referenční populace (obvykle 95 % všech výsledků). To znamená, že v referenčních mezích se nachází 95 % všech výsledků referenční populace, 5 % zdravých jedinců však bude mít výsledek laboratorního vyšetření mimo referenční rozmezí. To je ale pouze známkou individuality těchto jedinců a proto je třeba k tomu přihlídnout při hodnocení výsledků laboratorního vyšetření. (Racek et al., 2006)

Stanovit referenční rozmezí můžeme dvěma způsoby, ať již přímou či nepřímou metodou. Problémem však zůstává fakt, že v běžné praxi si klinické laboratoře v mnoha případech referenční rozmezí sami nestanovují. Hlavními důvody je především časová náročnost a vysoké finanční náklady. Proto klinické laboratoře často přejímají referenční rozmezí jiných laboratoří, v největší míře z USA. Referenční rozmezí přejaté z USA se však v porovnání s českou populací může v některých stanovovaných hodnotách lišit, neboť početná černošská populace žijící v USA jistou měrou ovlivnila stanovené referenční meze. (Ústní sdělení školitele) Např. je známo, že příslušníci negroidní rasy mají menší počet granulocytů oproti bělochům. V klinických laboratořích, kde se řídí přejatými referenčními rozmezími, je nutné k této skutečnosti přihlídnout.

U 20-ti pacientů, kterým byla podána transfuze trombocytárního koncentrátu v daném období, byla sledována účinnost této transfuze na vzestup počtu trombocytů. Posouzení účinku transfuze krevních destiček je možné na základě srovnání hodnot trombocytů krevního obrazu před podáním a následující den po podání trombocytárního koncentrátu. Za účinnou transfuzi trombocytárními koncentráty je orientačně považován vzestup destiček nejméně o  $10 \times 10^9/l$ .

Ze zjištěných hodnot zvýšení počtu trombocytů po podání trombocytárního koncentrátu bylo zjištěno, že transfuze byla vždy účinná u 45 % pacientů. U 15 % pacientů, kterým byl trombocytární koncentrát podán opakovaně, byl u jedné transfuze vzestup trombocytů nižší než  $10 \times 10^9/l$ , ostatní transfuze u těchto pacientů je možné hodnotit jako účinné. Vychýlenou hodnotu je možné přisoudit klinickému stavu nemocného a je nutné vzít v úvahu možné ztráty krve např. při invazivním zákroku. Celkově tedy můžeme hodnotit podání transfuze krevních destiček jako účinné u 60 % pacientů.

U 20 % pacientů transfuze krevních destiček účinné nebyly, u většiny z nich počet trombocytů po podání koncentrátu dokonce klesl, proto u těchto pacientů máme podezření na rezistenci na trombocytární koncentráty. Prokázána rezistence však u těchto pacientů nebyla, neboť abychom potvrdili rezistenci na transfuzi krevních destiček, musela by být u jednoho pacienta transfuze neúspěšná alespoň třikrát po sobě. Rezistenci na trombocytární koncentráty jsme prokázali u 20 % pacientů, u kterých nebylo opakované podání trombocytárních koncentrátů účinné. Celkem u 40 % nemocných nebylo podání transfuze destiček účinné. Průměrná hodnota zvýšení počtu trombocytů po podání trombocytárního koncentrátu byla  $12,64 \times 10^9/l$ .

Hodnota trombocytů nebyla jediným, ani rozhodujícím kritériem pro podání transfuze destiček. Trombocytární koncentráty byly indikovány pacientům na základě zhodnocení jejich klinického stavu, zda pacient krvácel, či byl nízkým počtem krevních destiček bezprostředně ohrožen na životě, a počtu trombocytů. Rezistence pacientů na trombocytární koncentráty jsou možné z různých příčin. Tyto příčiny mohou být vyvolány imunitně i neimunitně podmíněnými mechanismy. V některých případech je indikována transfuze trombocytárního koncentrátu i u pacientů s imunitně podmíněnou rezistencí, a to i přesto, že jsou tyto dárčovské krevní destičky po transfuzi rychle odstraňovány z krevního oběhu podobně jako ty vlastní. U těchto pacientů i krátkodobé zvýšení počtu trombocytů může mít hemostatický efekt. (Penka et al., 2001)

U neimunitně podmíněných rezistencí na trombocytární koncentráty mohla být u pacientů příčinou neúčinné transfuze krevních destiček například přítomná infekce, zvýšená

tělesná teplota, eventuelně podávané léky (např. amphotericin). Další možnou příčinou mohla být např. DIC (Diseminovaná intravaskulární koagulace), u které má přítomná trombocytopenie konzumpční charakter.

Účinnost indikované transfuze krevních destiček a očekávané zvýšení počtu trombocytů po podání trombocytárního koncentrátu je také možné vypočítat s použitím CCI (Corrected Count Increment). Kalkulace CCI je závislá na povrchu těla pacienta, počtu krevních destiček v transfuzi a počtu krevních destiček před a po podání transfuze. (Sacher et al., 2003) Je-li hodinu po podání trombocytárního koncentrátu CCI nižší než  $7,5 \cdot 10^9/l$  ( $7500/\mu l$ ), znamená to, že transfuze trombocytárními koncentráty nebyla účinná (např. z důvodu rezistence na trombocytární koncentráty). (Platelet Serology Survey, 1995) CCI lze vypočítat, odečteme-li od počtu trombocytů po podání koncentrátu ( $\mu l$ ) počet trombocytů před transfuzí ( $\mu l$ ), děleno počtem trombocytů v koncentrátu ( $\times 10^{11}$ ) a násobeno povrchem těla pacienta. V běžné praxi se však tento výpočet nepoužívá. (Ústní sdělení školitele) Proto jsme vycházeli z postačujícího orientačního hodnocení účinnosti podání trombocytárních koncentrátů, tedy zda bylo následující den po podání transfuze krevních destiček zvýšení počtu trombocytů u pacienta alespoň  $10 \times 10^9/l$ .



## 8. Závěr

Na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a.s. bylo v období od 1. do 31.října 2006 vyšetřeno 8509 hodnot krevních obrazů automatickým hematologickým analyzátozem, přičemž součástí vyšetření krevního obrazu je stanovení počtu trombocytů. U 82 (0,96 %) z nich byla hodnota trombocytů stanovena také referenční metodou manuálního počítání trombocytů v Bürkerově počítací komůrce s použitím mikroskopu. Referenční metodou bylo odhaleno 18 případů pseudotrombocytopení, což znamená, že pseudotrombocytopenie byla zachycena u 0,21 % všech vyšetření.

Byl navržen optimální postup laboratorního vyšetření hodnot trombocytů vedoucí k minimalizaci počtu chyb při jejich stanovení.

V období od 1.října 2006 do 28.února 2007 byla v Nemocnici České Budějovice, a.s. sledována účinnost podání trombocytárních koncentrátů. 20-ti pacientům byla indikována transfuze krevních destiček, z toho některým opakovaně. U 60 % pacientů byla transfuze trombocytárního koncentrátu úspěšná. U 40 % byla transfuze neúspěšná, z toho u 20 % pacientů byla prokázána rezistence na trombocytární koncentráty.

## 9. Příloha - Referenční hodnoty krevního obrazu

<b>Krevní obraz - MUŽI</b>			
<b>Typ buněk</b>		<b>Ref. meze</b>	<b>Jednotky</b>
Leukocyty str.	WBC	4,0 - 10,0	giga/l
Erytrocyty str.	RBC	4,5 - 6,20	tera/l
Hemoglobin	HGB	13,0 - 17,0	g/dl
Hematokrit	HCT	38,0 - 51,0	%
Str. obj. erytr.	MCV	80,0 - 95,0	fl
Barvivo erytr.	MCH	26,0 - 32,0	pg
Str. barev. kon.	MCHC	32,0 - 36,0	g/dl
Erytr. křivka	RDW	10,9 - 15,7	%
Trombocyty str.	PLT	150 - 400	giga/l

<b>Krevní obraz - ŽENY</b>			
<b>Typ buněk</b>		<b>Ref. meze</b>	<b>Jednotky</b>
Leukocyty str.	WBC	4,0 - 10,0	giga/l
Erytrocyty str.	RBC	4,20 - 5,40	tera/l
Hemoglobin	HGB	12,0 - 16,0	g/dl
Hematokrit	HCT	36,0 - 46,0	%
Str. obj. erytr.	MCV	80,0 - 95,0	fl
Barvivo erytr.	MCH	26,0 - 32,0	pg
Str. barev. kon.	MCHC	32,0 - 36,0	g/dl
Erytr. křivka	RDW	10,9 - 15,7	%
Trombocyty str.	PLT	150 - 400	giga/l

## 10. Seznam citované literatury

- Baer MR, Bloomfield CD (1992): Controversies in transfusion medicine. Prophylactic platelet transfusion therapy: *Pro. Transfusion* 32:377-380
- Beutler E (1993): Platelet transfusion: The 20,000/L trigger. *Blood* 81:1411-1430
- Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (2001): *Williams hematology. The McGraw-Hill Companies*
- Carr JM, Kruskall MS, Kaye JA, Robinson SH (1986): Efficacy of platelet transfusion in immune thrombocytopenia. *Am J Med* 80:1051-1054
- Ekins R, Edwards P (1997): On the meaning of „sensitivity“. *Clin Chem* 47:1824-1831
- Friedecký B, Kratochvíla J, Horák J, Tolman V, Jabor A, Budina M (1997): *Preanalytická fáze. SEKK s.r.o., Pardubice*
- Friedmann B, Vaňásek J (1994): *Hematologie v praxi. Galén*
- Gmur J, Burger J, Schanz U, Fehr J, Schaffner A (1991): Safety of stringent prophylactic platelet transfusion policy for patients with acute leukaemia. *Lancet* 338:1223-1226
- Gollub S, Ulin AW (1962): Heparin-induced thrombocytopenia in man. *J Lab Clin Med* 59:430-435
- Guder WG, Narayama S, Wisser H, Zarote B (1996): *Samples from the patient to the laboratory. GIT Verlag, Darmstadt*
- Harker LA, Finch, CA (1969): Thrombokinetics in man. *J Clin Invest* 48:963-974
- Howard MR, Hamilton PJ (1997): *Haematology. Churchill Livingstone*
- Jones HW, Tocantins LM (1997): The history of purpura hemorrhagica. *Ann Med History* 5:349-359
- Klein HG, Bell WR (1974): Disseminated intravascular coagulation during heparin therapy. *Ann Intern Med* 80:477-481
- Kubisz P, et al. (2006): *Hematológia a transfuziológia. Učebnica. Grada Publishing, a.s.*
- Mayan H, Salomon O, Pauzner R, Farfel Z (1992): EDTA-induced pseudothrombocytopenia. *South Med J* 85:213-214
- McIntoch S, O'Brien RT, Schwartz AD, Pearson HA (1973): Neonatal isoimmune purpura: Response to platelet infusions. *J Pediatr* 82:1020-1027
- McVay PA, Toy PTCY (1990): Lack of increased bleeding after liver biopsy in patient with mild hemostatic abnormalities. *Am J Clin Pathol* 94:747-753

Moroff G, George VM (1990): The maintenance of platelet properties upon limited discontinuation of agitation during storage. *Transfusion* 30:427-430

Moulinier J. (1953): Alloimmunisation maternelle antiplaquettaire duzo. *Proceedings of the 6th congress of the European Society of Hematology*. Paris: Society of Hematology, 817-820

Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, Kroll H, Weisheit M, Schmidt S (1989): 348 cases of fetal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1:363-366

Murphy S (1972): Hereditary thrombocytopenia. *Clin Haematol* 1:359-365

Murphy S (1985): Platelet storage for transfusion. *Semin Hematol* 22:165-177

Murphy S, Litwin S, Herring LM, Koch P, Remischovsky J, Donaldson MH, Evans AE, Gardner FH (1982): Indications for platelet transfusion in children with acute leukemia. *Am J Hematol* 12:347-356

Ohnuma O, Shirata Y, Miyazawa K (1988): Use of theophylline in the investigation of pseudothrombocytopenia induced by edetic acid (EDTA-2K). *J Clin Pathol* 41:915-917

Onder O, Weinstein A, Hoyer LW (1980): Pseudothrombocytopenia caused by platelet agglutinins that are reactive in blood anticoagulated with chelating agents. *Blood* 56:177-182

Patten E (1992): Controversies in transfusion medicine. Prophylactic platelet transfusion revisited after 25 years: Con. *Transfusion* 32:381-385

Penka M, Bulikova A, Matýšková M, Zavřelová J (2001): *Hematologie I. Neonkologická hematologie*. Grada Publishing, spol. s r. o.

Platelet Serology Survey, PS-A (1995). III: College of American Pathologists, Chicago

Racek J, et al. (2006): *Klinická biochemie*. Galén

Sacher RA, Kickler TS, Schiffer CA, Sherman LA, Bracey AW, Shulman IA (2003): Management of patients refractory to platelet transfusion. *Arch Pathol Lab Med* 127:409-414

Sakalová A, Lipšic T, et al. (1995): *Hematológia a transfuziológia. Teória a cvičenia*. Vydavateľstvo Osveta

Shulman NR, Jordan JV (1993): Platelet immunology, in *Hemostasis and Thrombosis*. Lippincott, Philadelphia

Schiffer CA (1992): Prophylactic platelet transfusion. *Transfusion* 32:295-298

Schreiner DP, Bell WR (1973): Pseudothrombocytopenia: manifestation of a new type of platelet agglutinin. *Blood* 42:541-549

Solberg HE, Grasbeck R (1989): Reference values. *Adv Clin Chem* 27:2-79

Solomon J, Bokenkamp T, Fahey JL, Chillar RK, Beutler E (1978): Platelet prophylaxis in acute nonlymphoblastic leukemia. *Lancet* 1:267-267

Streiff M, Bell WR (1993): Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Hematol* 1:274-279

Wisser H, Bertsch Th, Wisser D (2002): Preanalytical prerequisites for the quality of samples. *Laboratoriums Medizin* 26:284-290

Young DS (1997): Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests. 2th edition, AACC Press, Washington DC