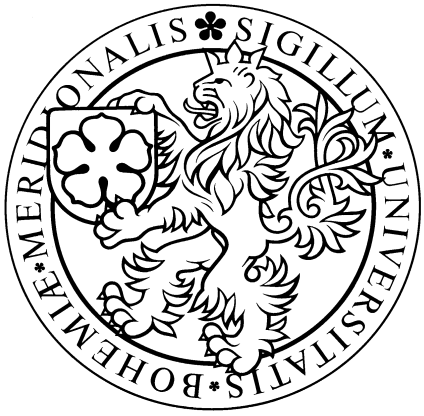
BIOLOGICKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



PROBLEMATIKA PŘÍSTROJOVÉHO STANOVENÍ HODNOT KREVNÍHO OBRAZU, MOŽNÉ CHYBY A ZPŮSOBY JEJICH PŘEDCHÁZENÍ

Bakalářská práce 2007

Autor: Olga Bazalová
Vedoucí práce: MUDr. Ivan Vonke

Bazalová O, 2007: Přístrojové stanovení hodnot krevního obrazu, možné chyby a způsoby jejich předcházení. [Automated blood cell counting, errors and their prevention. Bc. Thesis, in Czech] – 35 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: One of the most commonly ordered clinical laboratory tests, a blood count, also called a complete blood count, is a basic evaluation of the cells suspended in the liquid part of the blood (plasma). Modern hematology depends on rapid and accurate determination of quantitative and qualitative blood counts. Fully automated analyzers have replaced the traditional blood smear in the routine laboratory, but the automated counting method is subject to a certain level of error. An appropriate procedure was defined, how to establish blood cell counting.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury a rad školitele.

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

V Českých Budějovicích dne ....

Podpis studenta

Poděkování:
Na tomto místě bych ráda vyjádřila své upřímné poděkování především svému školiteli, MUDr. Ivanu Vonkemu, a laborantkám z Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice.

Obsah

1 Úvod 5

2 Vyšetření krevního obrazu ……..……..8

2.1 Hematologické analyzátory ……..……...9

2.1.1 Stanovení hodnot krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru Coulter Gen S ……...10

2.1.2 Stanovení hodnot krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru Coulter LH 750 a LH 755 ……15

2.1.3 Stanovení hodnot krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru Sysmex ……16

2.1.4 Stanovení hodnot krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru ADVIA ….....…..…….....…….18

2.2 Manuální stanovení hodnot krevního obrazu …….……20

2.2.1 Stanovení počtu krevních elementů (RBC, WBC, PLT)…….…….20

2.2.2 Stanovení základních hodnot erytrocytů …….……22

2.2.3 Stanovení diferenciálního počtu leukocytů …….……23

2.2.4 Stanovení počtu retikulocytů ……...23

3 Materiál a použité metody …….……24

3.1 Kritéria výběru pacientů …….……24

3.2 Odběr krve a její příprava ke zpracování ……...24

3.3 Laboratorní vyšetření hodnot krevního obrazu ……..24

3.4 Stanovení počtu leukocytů a trombocytů referenční metodou …….……..24

3.4.1 Stanovení počtu leukocytů …….……..25

3.4.2 Stanovení počtu trombocytů …….……...25

3.5 Stanovení hodnot erytrocytů a hemoglobinu …….....……...25

4 Výsledky …….……..27

4.1 Stanovené hodnoty leukocytů ….……...27

4.2 Stanovené hodnoty trombocytů …….……28

4.3 Průměrný počet buněk ……...29

5 Diskuze…….30

6 Závěr ……33

7 Citovaná literatura ……34

1 Úvod a cíl práce

Vyšetření krevního obrazu zavedl do praxe německý internista Josef Arneth (1873 - 1955) již v roce 1904. Je to základní vyšetření, které může být poskytnuto každému pacientovi. Určuje všeobecný obraz o pacientovi, a tak se často ze screeningového vyšetření stává vyšetření diagnostické. Slouží také k monitorování léčby, kdy dochází ke kontrole léčebných procesů, které byly u pacienta použity.

Krevní obraz se v minulosti vyšetřoval manuálně, ale nyní se spíše používají hematologické analyzátory, které jsou rychlejší (100 i více krevních obrazů za hodinu), přesnější a správnější (vnitřní kvalita laboratoře - každý den, vnější kontrola kvality laboratoře - dvakrát do roka), a je také potřeba minimální množství vyšetřované krve (30µl až 210µl). Hematologické analyzátory poskytují 8 až 32 parametrů krevního obrazu, včetně diferenciálního počtu leukocytů (trojparametrové - lymfocyty, granulocyty, ostatní; nebo pětiparametrové - lymfocyty, monocyty, neutrofily, eozinofily, bazofily), histogramu erytrocytů, leukocytů a trombocytů. Rovněž uvádějí komentáře k jednotlivým výsledkům měření.

Při stanovení krevního obrazu však dochází k chybám, které vyúsťují v nepřesnou interpretaci výsledků pacientů. Tyto chyby mohou být způsobeny buď v preanalytické, analytické nebo postanalytické fázi vyšetření. Nejčastěji dochází k ovlivnění stanovovaného výsledku ve fázi preanalytické a analytické.

V preanalytické fázi vyšetření může být výsledek ovlivněn několika faktory. Mezi ně patří osoba pacienta (pohaví, věk, gravidita, cyklické změny, kouření, užívané léky a jiné). Dalším faktorem ovlivňujícím správnost výsledku je způsob, jakým je vzorek odebrán (poloha pacienta při odběru a krátce před ním) a také místo, z jakého je odebrán (odebírá-li se venózní, či kapilární krev). Důležité také je, jakou použijeme nádobku a antikoagulační činidlo (ke stanovení hodnot krevního obrazu se nejčastěji používají uzavřené plastové nádobky na jedno použití, které osahují EDTA, antikoagulační činidlo citrát se používá na hemokoagulační vyšetření (Guder et al., 1998)). Při transportu vzorku do laboratoře musíme vzorek chránit před mrazem, teplem, či mechanickým porušením zkumavky a přílišným třepáním zkumavkou (Guder et al., 1996).

V analytické fázi vyšetření může být výsledek ovlivněn správností a přesností metody, kterou stanovujeme měřený vzorek.

Správnost metody je definována jako shoda mezi výsledkem měření a skutečnou hodnotou (Racek et al., 2006). S touto hodnotou se nesmí porovnávat jen jedno stanovení, může být totiž zatíženo náhodnou chybou (nepřesností). Srovnává se tedy očekávaná hodnota

s aritmetickým průměrem opakovaných měření kontrolního vzorku - tím je eliminována náhodná chyba měření.

Přesnost metody je definována jako míra shody mezi výsledky získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek (Racek et al., 2006). 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.

V neposlední řadě může být správnost výsledku ovlivněna stanovenými referenčními hodnotami. Jsou to takové hodnoty laboratorního testu, mezi nimiž leží většina hodnot (95%) získaná měřením referenční populace (soubor jedinců, splňující určité předpoklady, nejčastěji je to nepřítomnost nemoci) (Racek et al., 2006). Protože nelze vyšetřit celou referenční populaci, provádí se náhodný výběr a je tak získána výběrová referenční skupina. U ní jsou měřeny výběrové referenční hodnoty, určeno výběrové referenční rozložení a stanoveny výběrové referenční meze. Je-li výběrová referenční skupina dostatečně veliká 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. Ta se dá statistickými metodami vypočítat jako interval, v němž s určitou pravděpodobností (většinou 95%) tento odhad leží (Racek et al., 2006).

V analytické fázi může být výsledek ovlivněn i vlastnostmi použité metody z hlediska klinického. Vyšetřované osoby mohou z hlediska přítomnosti určité nemoci patřit k jedné ze dvou populací: k nemocným nebo zdravým. Laboratorní test má za úkol od sebe tyto populace oddělit. Převážná většina testů však dává pozitivní výsledek i u části zdravých osob a negativní výsledek u části nemocných osob. Z tohoto hlediska se vyšetřovaní jedinci rozdělují na čtyři subpopulace, ty zahrnují nemocné jedince s pozitivním testem (správná pozitivita), nemocné jedince s negativním testem (falešná pozitivita), zdravé jedince s negativním testem (správná negativita) a zdravé jedince s pozitivním testem (falešná negativita) (Racek et al., 2006). Na základě výsledků testů u těchto skupin vyšetřovaných osob rozlišujeme vlastnosti diagnostické metody na diagnostickou senzitivitu, specifičnost a účinnost.

Diagnostická senzitivita je definována jako podíl nemocných s pozitivním testem a celkového počtu testovaných nemocných (Racek et al., 2006), je tedy ukazatelem spolehlivosti metody odhalit nemoc.

Diagnostická specifičnost je definována jako podíl počtu zdravých jedinců s negativním testem a celkového počtu testovaných zdravých jedinců (Racek et al., 2006), je tedy měřítkem spolehlivosti metody vyloučit přítomnost nemoci.

Diagnostická účinnost vyjadřuje schopnost metody správně zařadit zdravé i nemocné jedince a je geometrickým průměrem diagnostické senzitivity a specifičnosti (Racek et al., 2006).

V postanalytické fázi vyšetření může být výsledek významně ovlivněn na příklad špatným výpočtem výsledků a jejich špatnou interpretací. Dále chybou tisku, nebo chybou při přenosu dat (přepsání, přeslechnutí v telefonu apod.).

Cíl práce:

V mé práci se zaměřím hlavně na analytickou fázi vyšetřování hodnot krevního obrazu, a to především na stanovení hodnot trombocytů a leukocytů. Na možné chyby, které mohou být v této fázi zapříčiněny, na důvody jejich vzniku a na způsob předcházení nedostatků, které s sebou analytická fáze přináší. Budu se zabývat stanovením hodnot krevního obrazu pomocí hematologických analyzátorů, jejich principy měření a s tím i související nedostatky v měření. Jako referenční metoda bude použito manuální stanovení hodnot krevního obrazu. Dále se budu snažit určit ideální postup stanovení hodnot krevního obrazu, který by potencionální chyby v měření eliminoval.

2 Vyšetření krevního obrazu

Součástí krve jsou krevní elementy, krevní obraz určuje jejich počet a charakter v krvi daného pacienta. Mezi krevní elementy řadíme bílé krvinky (leukocyty) - WBC (white blood cells), červené krvinky (erytrocyty) - RBC (red blood cells), a krevní destičky (trombocyty) - PLT (platelets). Správná funkce těchto krevních elementů je pro lidský organismus nezbytná. Erytrocyty pomocí hemoglobinu (červené krevní barvivo) přenášejí kyslík a oxid uhličitý, leukocyty se účastí obranných a metabolických procesů v organismu, trombocyty jsou důležité při zástavě krvácení a regeneraci cév (Beutler et al., 2001).

Proto mezi základní parametry krevního obrazu patří počet erytrocytů, počet leukocytů, počet trombocytů, poměr erytrocytů k objemu celé krve - hematokrit, střední objem erytrocytu, distribuční křivka erytrocytů, množství hemoglobinu v erytrocytu, střední množství hemoglobinu v erytrocytu, střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu a dále střední objem trombocytu, distribuční šíře trombocytů a počet retikulocytů (nezralé erytrocyty).

Hodnoty krevního obrazu se v dnešní době stanovují převážně pomocí hematologických analyzátorů (referenční meze hodnot krevního obrazu – Tab. 1 a 2).

Hodnoty krevního obrazu – muži			
Typ buněk	**Zkratka**	**Referenční meze**	**Jednotky**
Leukocyty	WBC	4,0 – 10,0	giga/l
Erytrocyty	RBC	4,5 – 6,2	tera/l
Hemoglobin	HGB	13,0 – 17,0	g/dl
Hematokrit	HCT	38,0 – 51,0	%
Střední objem RBC	MCV	80,0 – 95,0	fl
Obsah HGB v RBC	MCH	26,0 – 32,0	pg
Stř. konc. HGB v RBC	MCHC	32,0 – 36,0	g/dl
Distribuční křivka RBC	RDW	10,9 – 15,7	%
Trombocyty	PLT	140 - 440	giga/l

Tab.1 Referenční meze hodnot krevního obrazu u mužů

Hodnoty krevního obrazu - ženy			
Typ buněk	**Zkratka**	**Referenční meze**	**Jednotky**
Leukocyty	WBC	4,0 – 10,0	giga/l
Erytrocyty	RBC	4,2 – 5,4	tera/l
Hemoglobin	HGB	12,0 – 16,0	g/dl
Hematokrit	HCT	36,0 – 46,0	%
Střední objem RBC	MCV	80,0 – 95,0	fl
Obsah HGB v RBC	MCH	26,0 – 32,0	pg
Stř. konc. HGB v RBC	MCHC	32,0 – 36,0	g/dl
Distribuční křivka RBC	RDW	10,9 – 15,7	%
Trombocyty	PLT	140 - 440	giga/l

Tab.2 Referenční meze hodnot krevního obrazu u žen

2.1 Hematologické analyzátory

Hematologické analyzátory mohou být 8 až 32 parametrové. Stanovují hematokrit, hemoglobin, všechny parametry červených krvinek, dále stanovují retikulocyty, všechny parametry krevních destiček, stanovují také počet bílých krvinek a jejich rozdělení do subpopulací (stanovují jak absolutní, tak procentuelní zastoupení jednotlivých subpopulací leukocytů). Některé rozdělují leukocyty pouze do tří skupin – na lymfocyty, granulocyty a ostatní, jiné do pěti skupin – na lymfocyty, monocyty, neutrofily, eozinofily a bazofily.

V současné době se na trhu objevuje více typů hematologických analyzátorů vyráběných u několika firem. Mezi nejpoužívanější patří Coulter Gen S a Coulter LH (Beckman Coulter), dále Sysmex XE a Sysmex NE (Sysmex Corporation) a ADVIA (Bayer GmbH). Hematologické analyzátory od firem Beckman Coulter a Sysmex Corporation stanovují hodnoty krevního obrazu podobným principem. Analyzátor od firmy Bayer GmbH stanovuje hodnoty krevního obrazu, zejména hodnoty diferenciálního počtu leukocytů, zcela jinak.

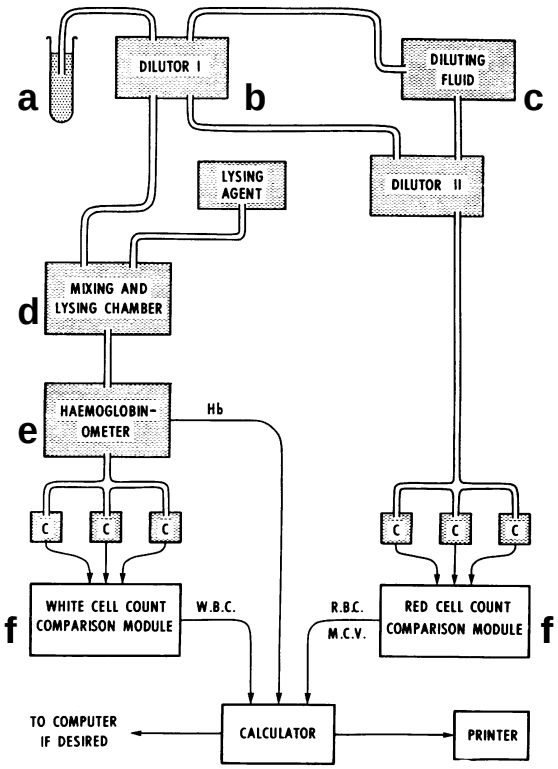
2.1.1 Stanovení hodnot krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru Coulter Gen S

- **Historie metody**

Princip, na kterém hematologický analyzátor Coulter GEN S pracuje, popsal v roce 1956 W.H. Coulter. Počet stanovených buněk v jednom vzorku je díky přístoji přibližně stonásobně vyšší než počet buněk stanovených v jednom vzorku pomocí mikroskopu. To redukuje statistické chyby asi desetkrát. Značné zlepšení v preciznosti měření znamenalo, že citlivým znakem erytropoetické dyskarzie se stalo stanovení počtu erytrocytů společně se stanovením hematokritu a měřením hemoglobinu (Brecher et al., 1956). Coulter counter model S byl první hematologický automatický analyzátor, který byl schopný měřit simultánně více parametrů krevního obrazu. Od roku 1965 se začal analyzátor používat i ke stanovení počtu trombocytů. Tato metoda spočívala v připravení plazmy bohaté na trombocyty, která by nedovolila stanovit erytrocyty jako trombocyty (Bull et al., 1965). Tato metoda byla dále vylepšena Mundschenkem instalací jednoduché hydrodynamické apertury a speciální tuby, které zlepšily přesnost měření. Také použili ETDA a citrátový pufr (Mundschenk et al., 1976).

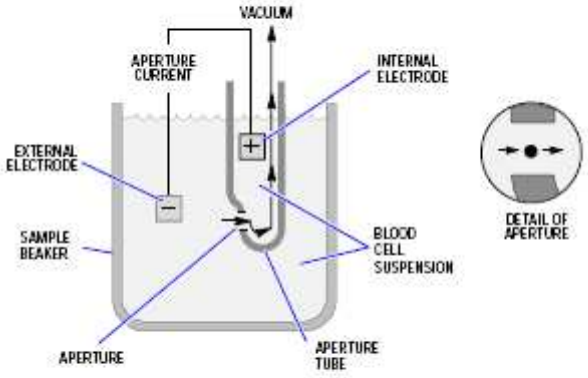
- **Princip stanovení počtu krevních buněk**

Abychom mohli stanovit počty krevních elementů, musíme nejdříve buňky, které počítat nechceme, zlyzovat. K tomu nám v hematologickém analyzátoru slouží dvě lázně (Obr. 1). V první lázni se počítají erytrocyty, v druhé se počítají leukocyty a stanovuje se hemoglobin. V první lázni se nezlyzuje nic, ve druhé lázni se zlyzují erytrocyty pomocí lytického činidla LYSE S® III, které rapidně lyzuje erytrocyty, volný hemoglobin a redukuje odumřelé buňky (uživatelská příručka Coulter Gen S).



Obr. 1 Stanovení hodnot krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru Coulter Gen S.
(a) 44µl krve je použito pro stanovení hodnot krevního obrazu. **(b)** Toto množství je zředěno 1:224 v izotonickém roztoku. Takto naředěná krev se rozdělí do dvou aliquot. **(c)** V první se krev naředí 1:50 000, je určena pro stanovení počtu erytrocytů. **(d)** Ve druhé se krev smíchá s lyzačním roztokem (ředění 1:250), který konvertuje hemoglobin na cyanmethemoglobin a lyzuje erytrocyty. **(e)** Poté je krev vedena do fotosenzitivního článku, kde je stanoven hemoglobin, **(f)** poté je simultánně stanoven počet leukocytů a erytrocytů. Vše je změřeno celkem tři krát. Tři výsledky pro každé měření jsou zprůměrovány a jejich průměr je brán jako výsledek. Pokud jedno měření nesouhlasí s dalšími dvěma o více jak o 3 směrodatné odchylky, je odmítnuto a stroj pracuje jen se dvěma měřeními. Pokud se liší všechny výsledky, musí se měření opakovat (Pinkerton et al., 1970).

Princip, jakým Coulter Gen S počítá buňky a určuje jejich velikost, se označuje jako elektro-impedanční metoda. Spočívá v detekování a měření změn elektrického odporu, ke kterým dochází, když buňka ve vodivém roztoku prochází přes malý otvor mezi elektrodami z platiny ponořenými do téhož roztoku (Obr. 2). Každá buňka v suspenzi se chová jako izolátor. Po průchodu buňky malým otvorem mezi elektrodami mezi nimi na okamžik vzroste odpor, což způsobí elektrický puls, který můžeme změřit. Počet elektrických pulsů odpovídá počtu buněk a míra elektrického pulsu odpovídá jejich velikosti (Barnard et al., 1969, Grover et al., 1972) .



Obr. 2 Princip stanovení počtu buněk pomocí hematologického analyzátoru Coulter Gen S

- **Stanovení MCV (mean corpuscular volume)**

Hodnota středního objemu erytrocytu je získávána během stanovení počtu erytrocytů. Je podílem hematokritu (to znamená podílem počtu erytrocytů a všech pulsů, které proběhnou mezi elektrodami) a počtu erytrocytů (obr. 3) (Barnard et al., 1969).

- **Stanovení hemoglobinu**

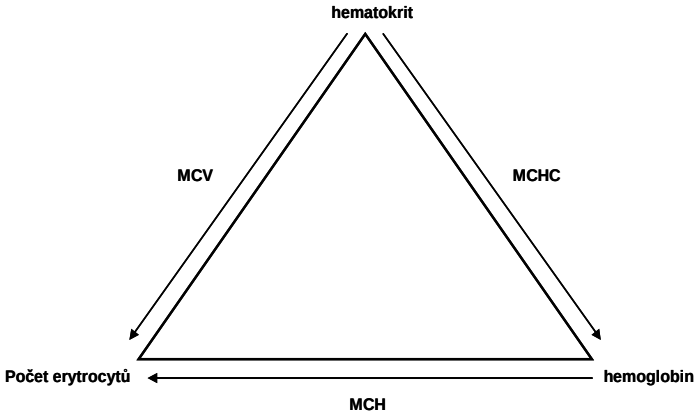
Pro určení množství hemoglobinu se používá jednoduchá metoda, která spočívá v použití lytického činidla LYSE S® III, které rapidně lyzuje erytrocyty, volný hemoglobin a redukuje odumřelé buňky na tolik, že neovlivňují měření hemoglobinu (uživatelská příručka Coulter Gen S). Zároveň způsobuje přeměnu hemoglobinu na stabilní hnědočervený pigment hemiglobinkyanid, jehož absorbance (při 540nm) je přímo úměrná koncentraci hemoglobinu v krvi (Beutler et al., 1995). V některých státech je ale použití roztoků obsahujících kyanid zakázáno, tudíž se používají i roztoky bez něj, které obsahují sodium lauryl sulfát (SLS), který konvertuje hemoglobin na stabilní produkt SLS-methemoglobin, který se měří kolorimetricky při 560nm (Jonge et al., 2000, Oshiro et al., 1982) .

- **Stanovení MCH a MCHC (mean corpuscular haemoglobin, mean corpuscular haemoglobin concentration)**

Střední množství hemoglobinu a jeho koncentrace jsou vypočítávány po té, co počítač stanoví počet erytrocytů, hemoglobin a střední objem erytrocytu, pomocí jednoduché formule (Barnard et al., 1969):

MCH = hemoglobin (g v l krve) / počet erytrocytů (v l krve)

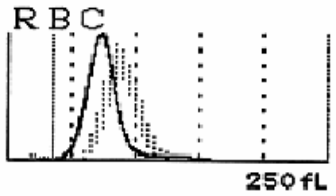
MCHC = (hemoglobin (g/dl krve) / objem buňky (%)) x 100 (Obr. 3).



Obr. 3 Orientační schéma na vypočítání hodnot erytrocytů

- **Stanovení RDW (distribuční křivka erytrocytů)**

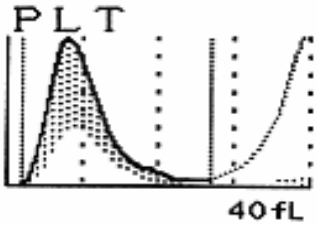
RDW je mírou anizocytózy (heterogennosti erytrocytů), tedy velikostního zastoupení erytrocytů (Obr. 4). Je vypočítávána jako variační koeficient, to znamená jako podíl směrodatné odchylky rozdělení velikosti erytrocytů a MCV (Beutler et al., 2001).



Obr. 4 Distribuční křivka erytrocytu

- **Stanovení parametrů trombocytů**

Přímé měření počtu trombocytů umožňuje výpočet PTC (platelet-crit, míru zastoupení trombocytů v krvi), MPV (mean platelet volume, střední objem trombocytů) a PDW (distribuční křivka trombocytů) (Obr. 5), podobně jako u erytrocytů (Sakalová et al., 1995).



Obr. 5 Distribuční křivka trombocytu

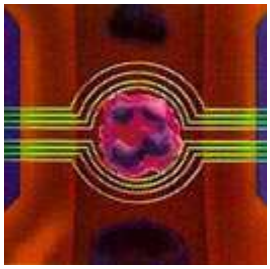
- **Stanovení diferenciálního počtu leukocytů**

Hematologický analyzátor Coulter Gen S rozděluje leukocyty do pěti subpopulací, na neutrofily, eozinofily, bazofily, monocyty a lymfocyty. K určení diferenciálního počtu

leukocytů se používá systém dvou činidel (tzv. SCATTER PAK Reagent System), první činidlo je Erythrolyse II (PAK LYSE), které rapidně lyzuje erytrocyty a redukuje odumřelé buňky na zanedbatelné množství. Druhé činidlo je StabiLyse (PAK PRESERVE), které konzervuje leukocyty a dovoluje diferenciaci buněk do subpopulací pomocí tak zvaného VCS principu (V-volume, C-conductivity, S-scatter) (uživatelská příručka Coulter Gen S).

1. **Stanovení objemu leukocytu**

Velikost leukocytů se stanovuje pomocí magnetického pole, do kterého se buňky vpravují (Obr. 6). Pomocí snímače pak počítač zaznamená, jakou mírou se magnetické pole změnilo a podle toho určí velikost jednotlivých buněk.



Obr. 6 Schéma stanovení objemu leukocytu

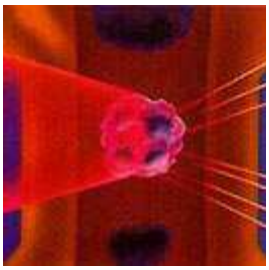
2. **Stanovení vnitřní struktury buněk**

Ke stanovení vnitřní struktury buněk se využívá jevu, kdy střídavý proud v rozsahu radiových frekvencí cirkuluje okolo bipolárních lipidů v buněčné membráně a energie, která tím vzniká, způsobuje penetrování buněk, a tím dovoluje stanovit velikost buněk, jejich vnitřní strukturu včetně chemického složení a velikost jádra (Obr. 7). Tato metoda nám umožňuje odlišit i takové buňky, které se neliší ve své velikosti.

Obr. 7 Schéma stanovení vnitřní struktury buněk

3. **Stanovení buněčné granularity**

Ke stanovení buněčné granularity se využívá souvislého laserového paprsku. Když je buňka ozářena laserovým paprskem, světlo se rozptýlí do všech možných směrů (Obr. 8). Použitím detektoru rozptýleného laserového paprsku získáme informace o stupni segmentace jádra, buněčné granularitě a struktuře buněčné membrány.



Obr. 8 Schéma stanovení buněčné granularity

- **Princip stanovení retikulocytů**

Retikulocyty jsou nezralé bezjaderné erytrocyty, které obsahují malé množství bazofilních organel (RNA, mRNA, endoplazmatické retikulum). Ke stanovení retikulocytů se používají činidla (RETIC PAK Reagen System), která obsahují supravitální barvy. První činidlo (Retic Stain) obsahuje barvu New Methylene Blue, která precipituje a agreguje bazofilní substance uvnitř buňky. Druhé činidlo odstraní hemoglobin z erytrocytů a buňku a její organely nechá nedotčené. Zralé erytrocyty jsou potom bezbarvé a retikulocyty jsou tmavé. Retikulocyty jsou stanovovány z plné krve laserovým paprskem, přímým měřením proudu a vlastnostmi opacity (uživatelská příručka Coulter Gen S).

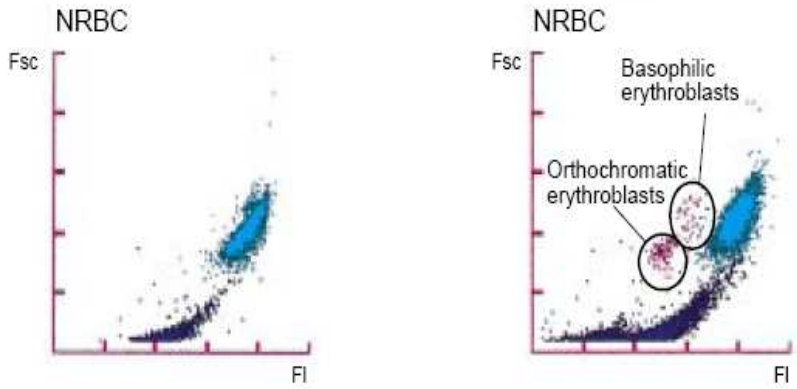
2.1.2 Stanovení hodnot krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru Coulter LH 750 a LH 755

Principy stanovení krevního obrazu se v podsatě neliší od principů stanovení krevního obrazu pomocí hematologického analyzátory Coulter Gen S. Výrobci se v podstatě snažili pouze o zvýšení kvality měřených parametrů v diferenciálním počtu leukocytů a dále ve stanovení NRBC - nucleated red blood cell, normoblasty (Obout et al., 2004). Dále se pokusili o uplatnění hematologických analyzátorů v automatické přípravě krevních nátěrů.

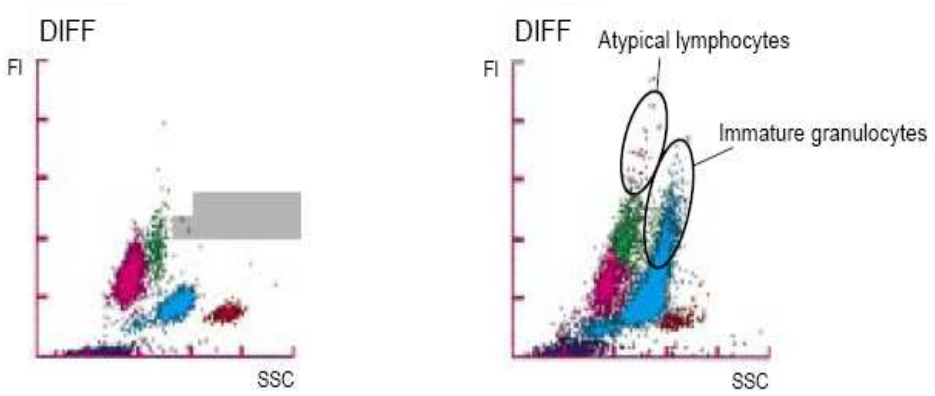
2.1.3 Stanovení hodnot krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru Sysmex

Tento hematologický analyzátor stanovuje krevní elementy velmi podobným způsobem jako hematologický analyzátor Coulter, tedy na základě elektro-impedančních vlastností krevních elementů (Beutler et al., 1995).

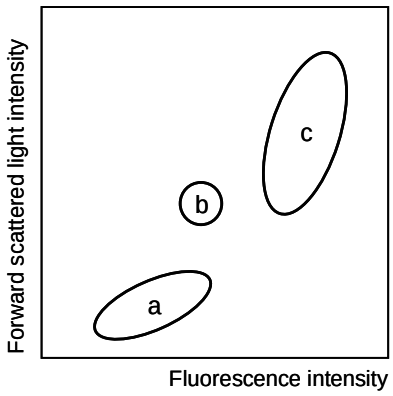
Na rozdíl od hematologického analyzátoru Coulter Gen S rozděluje leukocyty do subpopulací na základě fluorescenční průtokové cytometrie. Kombinace side scatteru, forward scatteru a intenzity fluorescence jaderných buněk dává stručný, ale přesný obraz každé buňky detekované v periferní krvi. Polymetyové barvy se navážou na DNA v jádře buňky. Poté jsou excitovány červeným laserovým světlem o vlnové délce 633nm a emitují červené fluorescenční záření o vlnové délce 660nm (Matsumoto, 1999). Nezralé erytrocyty jsou jednoduše rozeznatelné od normálních a zralých erytrocytů, protože mají jádro a tudíž je i intenzita fluorescence vyšší (Briggs et al., 1999) (Obr. 9). Navíc je použito speciální činidlo (STROMATOLYSER-NR), které působí na lipidy v membráně nezralých buněk, a tím je ochraňuje před porušením (Sakata, 2000). Abnormální leukocyty jsou také lehce rozeznatelné od normálních leukocytů, protože intenzita fluorescence je u nich také vyšší (Obr. 10). Po této reakci jsou buňky rozdělené podle odpovědi na světelný paprsek (Obr. 11) (Ruzicka et al., 2000). Zároveň stroj uvede komentář o zjištěných abnormalitách.



Obr. 9 (vlevo) NRBC diagram zdravého člověka, (vpravo) NRBC diagram pacienta s ortochromatickými a basofilickými erytroblasty



Obr. 10 Diferenciální rozdělení leukocytů (vlevo) u zdravého člověka a diferenciální rozpočet leukocytů (vpravo) u nemocného člověka s atypickými lymfocyty a nezralými granulocyty.



Obr. 11 Rozdělení erytrocytů, leukocytů a nezralých krevních buněk. **(a)** Erytrocyty zlyzují a zbyde z nich pouze jejich membrána, proto je světelný paprsek nejméně rozptýlen (forward scattered light intensity je nízká), protože neobsahují chromatin, nejsou téměř obarveny, intensita fluorescence je také nízká, proto oblast, ve které se erytrocyty v diagramu nacházejí je levý dolní roh, **(b)** jelikož nezralé buňky ztrácejí ředěním jádro dříve než leukocyty, je světelný paprsek rozptýlen méně (forward scattered light intensity je nižší než u leukocytů, ale vyšší než u erytrocytů), jelikož tyto buňky obsahují chromatin, barví se polymetyenovými barvami, ale slabě, proto je intenzita fluorescence rovněž slabší a tudíž jsou na diagramu zhruba uprostřed. **(c)** Nejvýše položené jsou leukocyty. Udržují si svůj tvar i velikost, proto nejvíce rozptylují světlo. Také se velmi dobře a silně barví polymetyovými barvami, takže jejich umístění v diagramu je v pravém horním rohu.

2.1.4 Stanovení hodnot krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru ADVIA

Princip stanovení krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru ADVIA se zcela liší od principů stanovení hodnot krevního obrazu pomocí dvou předešlých hematologických analyzátorů.

- **Stanovení počtu krevních buněk**

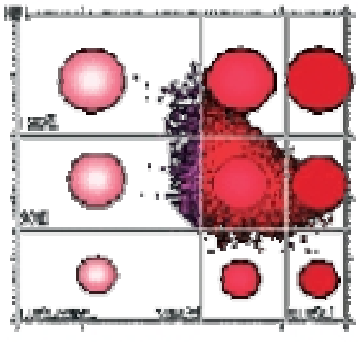
Buňky jsou nejdříve fixovány činidlem, které fixuje tvar a velikost každé z nich.
Počet krevních elementů se stanovuje na základě principu průtokové cytometrie.

- **Stanovení MCV a MCHC**

Hodnoty erytrocytů se stanovují použitím laserového světla, které umožňuje měřit jak objem erytrocytů, tak obsah hemoglobinu. Množství rozptýleného světla při malém úhlu osvětlení (2°-3°) je úměrné objemu buňky. Množství rozptýleného světla při větším úhlu osvětlení (5°-15°) je úměrné indexu refrakce buňky, který souvisí s množstvím intracelulárního hemoglobinu (webové stránky).

- **Stanovení erytrogramu**

Erytrogram je obdoba distribuční křivky stanovované hematologickými analyzátory Coulter a Sysmex, ale velikostní rozdělení erytrocytů neznázorňuje křivka. Erytrocyty jsou umístěny podle velikosti do grafu, který se rozděluje na 9 oddílů. V každém z odílů je znázorněna velikost erytrocytů a jejich velikostní zastoupení v procentech (Obr. 12).

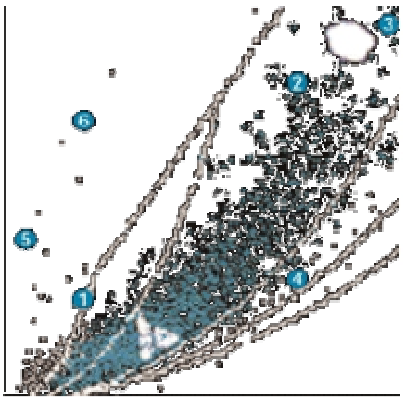


Obr. 12 Erytrogram

- **Určení parametrů trombocytů**

Parametry trombocytů se určují podobným způsobem jako parametry erytrocytů.

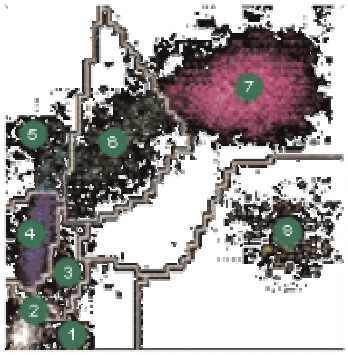
Cytogram trombocytů (Obr. 13) je grafickou podobou měření MPV (střední objem trombocytu) pomocí rozptylu světla. Úhel světla, kterým jsou buňky osvěcovány je buď malý (2°-3°), nebo větší (5°-15°), podobně jako u určování parametrů erytrocytů. Množství rozptýleného světla při malém úhlu osvětlení je úměrné velikosti (objemu) buňky. Množství rozptýleného světla při velkém úhlu osvětlení (5°-15°) je úměrné indexu refrakce buňky (webové stránky).



Obr. 13 Cytogram trombocytů. 1 normální trombocyty, 2 velké trombocyty, 3 erytrocyty, 4 fragmenty erytrocytů, 5 zbytky lyzovaných buněk, 6 odumřelé erytrocyty

- **Stanovení diferenciálního počtu leukocytů**

Ke stanovení diferenciálního počtu buněk se používá peroxidázová metoda, která využívá intracelulární enzym myeloperoxidázu. Na ni jsou některé buňky bílé řady, po přidání substrátu pro tento enzym, pozitivní (zbarví se), některé negativní (neobarví se). Vše je doplněno velikostí buněk. Výsledný graf (Obr. 14) je mírou intenzity peroxidázové aktivity, která je měřena spektrofotometricky. Změřená absorbance je úměrná intenzitě peroxidázové aktivity. Neutrofily, monocyty a eosinofily jsou pozitivní, lymfocyty a bazofily negativní (webové stránky). Hematologický analyzátor Advia je také schopen určit populaci tak zvaných LUC (large unstained cells). Tyto buňky jsou většinou virem aktivované lymfocyty, buňky plazmy, vlasaté buňky, nezralé lymfocyty nebo blasty.



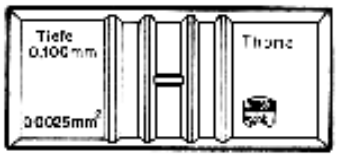
Obr. 14 Stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů. 1 šum, 2 normoblasty, 3 shluky trombocytů, 4 lymfocyty a bazofily, 5 LUC, 6 monocyty, 7 neutrofily, 8 eozinofily

2.2 Manuální stanovení hodnot krevního obrazu

Manuální stanovení hodnot krevního obrazu se dnes používá výhradně jako referenční metoda. Některé principy jsou ale využívány i při stanovení hodnot krevního obrazu pomocí hematologického analyzátoru (stanovení hemoglobinu, výpočet MCV a pod.).

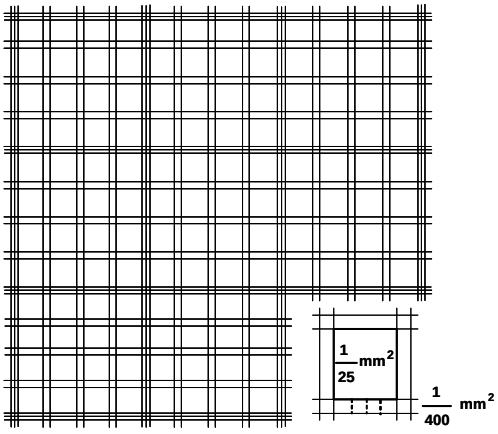
2.2.1 Stanovení počtu krevních elementů (RBC, WBC, PLT)

Protože počet krvinek je velký, musí se krev nejdříve naředit vhodným ředícím roztokem, který současně krvinky, které chceme počítat, zvýrazní a ostatní odstraní (Sakalová et al., 1995). Na počítání krevních elementů se používá Bürkerova počítací komůrka (Obr. 15). Je to v podstatě hrubé broušené sklo, jehož horní plocha je rozdělena dvěma hrubými příčnými rýhami a jednou prostřední krátkou podélnou rýhou na dvě proti sobě ležící velké pole. Přikrytím obou dvou polí krycím sklíčkem vzniká vlastní prostor, ve kterém se počítají krvinky. Rýhami na spodní ploše je narýsovaná přesná síť známých rozměrů. Pomocí sítě a výšky komůrky je určený malý mikroskopický prostor, ve kterém se krvinky spočítají ve zředěné krvi.



Obr. 15 Bürkerova počítací komůrka

Počítací mřížka Bürkerovy komůrky je rozdělena trojitými čarami na 9 velkých čtvercových polí a dvojitými čarami na 144 středních a 169 malých čtverců (Obr. 16). Velká čtvercová pole mají plochu 1mm^2 (délka strany 1mm), střední čtverce mají plochu 1/25mm^2 (délka strany 0,2mm) a malé čtverce 1/400mm^2 (délka strany 0,05mm). Mezi dvojitými čarami vznikají obdélníky, jejichž plocha se rovná ploše 4 malých čtverců (tj. 1/100mm^2). Krvinky se počítají na určité zvolené ploše, při stabilní výšce, to znamená při určitém zvoleném objemu.



Obr. 16 Síť Bürkerovy počítací komůrky

- **Počítání leukocytů**

Jako ředící roztok se používá Türkův roztok, který způsobí lyzi erytrocytů a trombocytů. Jádra leukocytů se obarví metylénovou modří. Složení Türkova roztoku je: ledová kyselina octová (1ml), 1% vodný roztok metylénové modři (1ml) a destilovaná voda (do 100ml) (Sakalová et al., 1995).

- **Počítání trombocytů**

K určení počtu trombocytů se používají dvě metody. Metoda Piettovce a metoda Brecher-Cronkitova. Základem Brecher-Cronkitovy metody je ředící roztok šťavelanu amonného, ve kterém nastává rychlá hemolýza erytrocytů. Poté co zlyzují, můžeme trombocyty spočítat v počítací komůrce (Sakalová et al., 1995).

Základem metody Piettovce je roztok prokainu, ve kterém erytrocyty také lyzují. Roztok prokainu se skládá z hydrochloridu prokainu (2,34g), chloridu sodného (0,2g) a destilované vody (do 100ml) (Sakalová et al., 1995).

2.2.2 Stanovení základních hodnot erytrocytů

Základní hodnoty erytrocytů můžeme vypočítat z hodnot hemoglobinu, počtu erytrocytů a z hodnoty hematokritu (Obr. 3).

- **Stanovení hematokritu (HCT)**

Hematokrit udává, jaké množství erytrocytů je obsaženo v plné krvi. Dříve se hematokrit stanovoval výhradně manuálně, pomocí kapilár, tak zvanou mikrohematokritovou metodou, která je celkem jednoduchá a přesná. Kapilára se naplnila do 4/5 po ponoření do kapky krve, volný konec se zatavil a kapilára se centrifugovala při vysokých otáčkách 16000g po dobu 3 minut ve speciální centrifuze. Hodnoty hematokritu se odečítaly ze stupnice ve speciálním zařízení (Sakalová et al., 1995).

- **Stanovení středního objemu erytrocytu (MCV)**

Střední objem erytrocytu je vypočítáván z hodnoty hematokritu a z počtu erytrocytů v 1µl krve podle vzorce:

$$MCV = (\text{hematokrit (\%)} / \text{počet erytrocytů } x10^6/l)x10$$

Střední objem erytrocytu se udává buď v μm^3 nebo častěji ve fl (Beutler et al., 2001).

- **Stanovení hemoglobinu**

Princip manuálního stanovení se využívá i u měření hemoglobinu hematologickými analyzátory. Roztoky kyanidu draselného a ferrokyanidu draselného hemolyzují erytrocyty a konvertují hemoglobin přes hemiglobin na stabilní hnědočervený hemiglobinkyanid, jehož koncentrace se měří spektrofotometricky při 540nm. V některých státech je ale použití roztoků obsahujících kyanid zakázáno, tudíž se používají i roztoky bez něj, které obsahují sodium lauryl sulfát (SLS), který konvertuje hemoglobin na stabilní produkt

SLS-methemoglobin, který se měří kolorimetricky při 560nm (Jonge et al., 2000, Oshiro et al., 1982).

- **Stanovení středního množství hemoglobinu (MCH)**

MCH je vypočítáván jako podíl množství hemoglobinu a počtu erytrocytů,

MCH = hemoglobin (g v l krve) / počet erytrocytů (v l krve)

nebo upravenou formulí

MCH = hemoglobin (g/dl) / počet erytrocytů ($x10^6$/µl)

Střední množství hemoglobinu se udává v pg hemoglobinu v buňce (Beutler et al., 2001).

- **Stanovení střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC)**

Koncentrace hemoglobinu v erytrocytu je vypočítávána jako podíl množství hemoglobinu a objemu buňky (Beutler et al., 2001)

MCHC = (hemoglobin (g/dl krve) / objem buňky (%))x100

2.2.3 Stanovení diferenciálního počtu leukocytů

Základem stanovení diferenciálního počtu leukocytů je správné zhotovení krevního nátěru a použití správné barvicí metody. Krevní nátěr se zhotovuje na chemicky čistém a důkladně odmaštěném podložním sklíčku, kde se rozetřením malé kapky krve vytvoří tenká monocelulární vrstva (Sakalová et al., 1995). Z barvících metod se používá panoptického barvení podle Pappenheima, v Evropě May-Grünwaldovým a Giemsa-Romanowského roztokem (Sakalová et al., 1995), ve Spojených státech amerických roztokem Wrighta. Barvení krevního nátěru probíhá ve dvou fázích. V první fázi převládá účinek metylalkoholu a nátěr se fixuje. Ve druhé fázi probíhá barvení krevních elementů zředěným May-Grünwaldovým a Giemsa-Romanowského roztokem. May-Grünwaldův roztok se skládá ze směsi z 1g eozinu a metylenové modři, dále pak ze 100ml metylalkoholu zahřátého na 50˚C a 50ml glycerolu (Sakalová et al., 1995). Giemsa-Romanowského roztok se skládá ze 3g azureozinu II, 0,8g azuru II, 250ml glycerolu a 350ml metylalkoholu (Sakalová et al., 1995).

2.2.4 Stanovení počtu retikulocytů

Retikulocyty obsahují struktury cytoplazmy erytroblastu (ribozomy, RNA, mRNA, endoplazmatické retikulum), proto je můžeme prokázat barvením vitálními barvami (brilantkrezolová modř) a pozorovat mikroskopicky (Kubisz et al., 2006).

3. Materiál a použité metody

3.1 Kritéria výběru pacientů

V měsíci únoru roku 2007 byly na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a.s. u 7806 pacientů stanoveny hodnoty krevního obrazu. Pacienti byli na vyšetření posíláni na základě žádostí ošetřujících lékařů.

3.2 Odběr krve a její příprava ke zpracování

Odběry krve byly prováděny do uzavíratelných vakuových umělohmotných zkumavek o objemu 3 a 4,5ml z venózní krve. Ve zkumavkách byla EDTA obsažena v poměru 1,5±0,3g EDTA/1ml krve jako antikoagulační činidlo. Úkolem antikoagulačního činidla je vázat vápenaté ionty a tím zabraňovat koagulaci (EDTA váže vápenaté ionty chelatačně). Po transportu vzorku na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a.s. bylo zkontrolováno jméno a rodné číslo pacienta, bylo mu přiděleno identifikační číslo a zkumavka byla polepena čárovým kódem. Zkumavka byla vložena do kazety a umístěna do hematologického analyzátoru, který stanovil hodnoty krevního obrazu.

3.3 Laboratorní vyšetření hodnot krevního obrazu

Laboratorní vyšetření hodnot krevního obrazu byla prováděna na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a.s. Ke stanovení hodnot krevního obrazu byl použit přístroj Coulter Gen S od firmy Beckman Coulter. Hematologický analyzátor Coulter Gen S pracuje na elektro-impedančním principu (viz kapitola 2.1.1).

Byly stanoveny všechny hodnoty krevního obrazu, tedy počet leukocytů, erytrocytů, trombocytů. Dále byly stanoveny všechny parametry erytrocytů – HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW, a stanoveny všechny parametry trombocytů – PTC, MPV, PDW. Dále byl stanoven diferenciální počet leukocytů (Coulter Gen S rozděluje leukocyty do pěti skupin – monocyty, lymfocyty, eozinofiy, bazofily a neutrofily) (způsoby stanovení viz kapitola 2.1.1).

3.4 Stanovení počtu leukocytů a trombocytů referenční metodou

Na stanovení počtu leukocytů a trombocytů byla u pacientů, kteří měli podezřelé výsledky (poprvé zjištěna trombopenie, abnormální stav leukocytů), použita referenční metoda. Trombocyty a leukocyty byly stanoveny pomocí Bürkerovy počítací komůrky a mikroskopu.

3.4.1 Stanovení počtu leukocytů

Jako ředící roztok byl použit Türkův roztok (složení viz kapitola 2.2.1), který lyzuje erytrocyty a trombocyty. Do zkumavky jsme dali 475µl Türkova roztoku, poté jsme do zkumavky přidali 25µl venózní krve a protřepali. Dále jsme odebrali ze zkumavky kapku suspenze a přemístili ji do počítacího prostoru Bürkerovy počítací komůrky. Leukocyty jsme počítali při 100 násobném zvětšení v 50 malých čtvercích. Zjištěný počet leukocytů jsme vynásobili 100 krát. Pokud se počty leukocytů v ± 10% shodovali s počtem leukocytů určených pomocí hematologického analyzátoru, jako správný počet leukocytů jsme ustanovili ten, který jsme určili pomocí hematologického analyzátoru. Pokud se výsledky v ± 10% neshodovali, ustanovili jsme jako správný výsledek počet leukocytů stanovený referenční metodou.

3.4.2 Stanovení počtu trombocytů

Jako ředící roztok byl použit roztok prokainu (složení viz kapitola 2.2.1 – metoda podle Piettovce). Do zkumavky jsme dali 475µl roztoku prokainu, přidali 25µl venózní krve a pipetou důkladně promíchali a nechali vzorek 1 hodinu hemolyzovat. Poté jsme odebrali ze zkumavky kapku suspenze a přemístili ji do počítacího prostoru Bürkerovy počítací komůrky a nechali jsme trombocyty 10 minut sedimentovat. Poté jsme trombocyty spočítali pomocí mikroskopu při 400 násobném zvětšení ve 20 obdélníčkách, výsledek vynásobili 1000 krát.
Pokud se počty trombocytů v ± 10% shodovaly s počtem trombocytů určených pomocí hematologického analyzátoru, jako správný počet trombocytů jsme ustanovili ten, který jsme určili pomocí hematologického analyzátoru. Pokud se výsledky v ± 10% neshodovali, ustanovili jsme jako správný výsledek počet trombocytů stanovený referenční metodou.

3.5 Stanovení hodnot erytrocytů a hemoglobinu

Hodnoty erytrocytů a hemoglobinu se na základě dlouhodobých zkušeností referenční metodou nestanovují (ústní sdělení školitele). Za správné výsledky se považují ty hodnoty, které naměřil hematologický analyzátor. Jediná kontrola správnosti stanovení hodnot erytrocytů a hemoglobinu probíhá před umístěním měřeného vzorku do měřící kazety. Přesvědčili jsme se, zda vzorek ve zkumavce neaglutinoval nebo neagregoval.
Aglutinovaný vzorek by měl správné hodnoty hemoglobinu, ale špatné hodnoty erytrocytu (ústní sdělení školitele). Možný důvod, proč k aglutinaci došlo, je přítomnost chladových protilátek. Proto je řešením aglutinace umístění vzorku na 1 hodinu do termostatu. Pokud je i poté krev aglutinována, musí se náběr zopakovat.

Agregovaný vzorek by nešel stanovit vůbec a stroj by nás na to upozornil komentářem, vzorek by se tedy musel nabrat znovu.

4 Výsledky

V měsíci únoru roku 2007 byly na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a.s. u 7806 pacientů stanoveny hodnoty krevního obrazu. V mé práci jsem se zaměřila především na chybné stanovení počtu trombocytů a leukocytů.

4.1 Stanovené hodnoty leukocytů

Stanovení hodnot krevního obrazu bylo provedeno pomocí hematologického analyzátoru Coulter Gen S od firmy Beckman Coulter. Tento hematologický analyzátor stanovuje hodnoty krevního obrazu na elektro-impedančním principu.

Za normální hodnoty leukocytů jsou považovány jejich počty mezi $4{,}0x10^9$ a $10{,}0x10^9$ buněk/1 litr krve. U všech pacientů bylo provedeno stanovení počtu leukocytů. Z toho u 4581 pacientů (58,69%) byly stanovené hodnoty v normě, u 3225 pacientů (41,31%) byly stanovené hodnoty mimo normu, z nichž u 362 pacientů (4,64%) byly stanovené počty leukocytů pod $4x10^9$buněk/l krve a u 2863 pacientů (36,68%) byly nad $10x10^9$ buněk/l krve. U 37 pacientů (0,47%) se stanovené hodnoty ověřovaly referenční metodou (mikroskopicky, pomocí Bürkerovy komůrky) a u 8 pacientů (0,1%) byly hodnoty získané pomocí hematologického analyzátoru stanoveny špatně (Tab.1).

leukocyty	počet pacientů	%
všechna vyštření	7806	100,00
výsledek v normě	4581	58,69
výsledek mimo normu	3225	41,31
výsledek pod $4x10^9$b/l	362	4,64
výsledek nad $10x10^9$b/l	2863	36,68
přeměřeno	37	0,47
špatně stanoveno	8	0,10

Tab.1 Výsledky stanovení počtu leukocytů

4.2 Stanovené hodnoty trombocytů

Stanovení hodnot krevního obrazu bylo provedeno pomocí hematologického analyzátoru Coulter Gen S od firmy Beckman Coluter (tento hematologický analyzátor stanovuje hodnoty krevního obrazu na elektro-impedančním principu). Za normální hodnoty trombocytů jsou považovány jejich počty v rozmezí $140x10^9$ až $440x10^9$ buněk/1 litr krve. Za mírný deficit jsou považovány hodnoty trombocytů nad $100x10^9$ buněk/1 litr krve, za klinicky významný deficit jsou považovány hodnoty pod $100x10^9$ buněk/1 litr krve. Ze 7806 pacientů byl u 6479 pacientů (83%) počet trombocytů v předepsané normě, u 1327 pacientů (17%) byl počet trombocytů mimo normu, z toho u 369 pacientů (4,7%) se jednalo o klinicky významný pokles trombocytů a u 591 pacientů (7,57%) byl počet stanovených trombocytů nad $440x10^9$ buněk/1 litr krve. U 67 pacientů (0,86%) jsme hodnoty přeměřili pomocí referenční metody (mikroskopicky, pomocí Bürkerovy komůrky) a z toho u 10 pacientů (0,13%) byly naměřené hodnoty pomocí hematologického analyzátoru chybné (Tab.2).

trombocyty	počet pacientů	%
všechna vyštření	7806	100,00
výsledek v normě	6479	83,00
výsledek mimo normu	1327	17,00
výsledek pod $100x10^9$b/l	369	4,70
výsledek nad $440x10^9$b/l	591	7,57
přeměřeno	67	0,86
špatně stanoveno	10	0,13

Tab.2 Výsledky stanovení počtu trombocytů

4.3 Průměrný počet buněk

Dále nás zajímalo, jaký je průměrný počet buněk u všech vyšetření, u vyšetření, jejichž výsledek byl stanoven v normě, u výsledků stanovených mimo normu, u přeměřených hodnot, špatně stanovených hodnot a u hodnot v klinicky významné oblasti (u počtu trombocytů).

Průměrný počet leukocytů u všech vyšetření byl $9{,}98x10^9$buněk/l krve, u vyšetření v normě byl $7{,}29x10^9$buněk/l krve, u výsledků stanovených pod $4x10^9$buněk/l krve byl $2{,}63x10^9$buněk/l krve, u výsledků stanovených nad $10x10^9$buněk/l krve byl $15{,}23x10^9$buněk/l krve, u přeměřených vzorků byl $1{,}98x10^9$buněk/l krve, a u špatně stanovených hodnot vzorků $2{,}26x10^9$buněk/l krve.

Průměrný počet trombocytů byl u všech vyšetření $272{,}26x10^9$buněk/l krve, u výsledků v normě pak $268{,}58x10^9$buněk/l krve, u výsledků pod $150x10^9$buněk/l krve byl průměrný počet roven $86{,}26x10^9$buněk/l krve, u výsledků nad $440x10^9$buněk/l krve $543{,}21x10^9$buněk/l krve. Průměrný počet trombocytů v kinicky významné oblasti byl $51{,}15x10^9$buněk/l krve, u přeměřených hodnot $57{,}27x10^9$buněk/l krve, a u špatně stanovených hodnot $67{,}10x10^9$buněk/l krve (Tab. 3).

průměrný počet buněk [x10^9 buněk/1 litr krve]							
krevní buňky	všechna vyšetření	v normě	mimo normu		v klin. význ. obl.	přeměřené hodnoty	špatně stanovené hodnoty
			pod normu	nad normu			
leukocyty	9,98	7,29	2,63	15,23	-	1,98	2,26
trombocyty	272,26	268,58	86,26	543,21	51,15	57,27	67,10

Tab.3 Průměrný počet leukocytů a trombocytů

5 Diskuze

Dle našeho očekávání hraničí hodnoty průměrného počtu buněk leukocytů s horní referenční mezí (průměrná hodnota počtu buněk je $9{,}98 \times 10^9$ b/l krve, přičemž horní referenční mez je 10×10^9 b/l krve), protože převážná většina pacientů (zhruba 85%), u kterých bylo provedeno stanovení krevního obrazu, byli hospitalizováni v Nemocnici České Budějovice, a.s. na odděleních jako je anesteziologicko resuscitační oddělení, bakteriologické oddělení, infekční oddělení, kardiologické oddělení, onkologické oddělení, parazitologické a mykologické oddělení a další. Na většině těchto odděleních pacienti právě prodělávají nebo prodělali nějakou infekci a tudíž mají zvýšený počet leukocytů.

Pomýšleli jsme i na přístrojovou chybu, na nadhodnocování výsledků. Je to dáno principem, na kterém hematologický analyzátor Coulter Gen S pracuje. Neumí například měřit mladé a nezralé buňky, proto například normoblasty změří, jako by to byly leukocyty, a tudíž počet leukocytů v měření naroste (vzniká pseudoleukocytóza). Velkým problémem u hematologických analyzátorů obecně je pojem rezistentní erytrocyty. Tyto erytrocyty v lyzační lázni nezlyzují a počet leukocytů tím narůstá. Rezistentní erytrocyty se v krvi nenacházejí často, ale jsou problémem, který zatím nikdo neumí spolehlivě řešit.

U trombocytů jsou hodnoty průměrného počtu buněk v normálu (průměrný počet trombocytů je $272{,}26 \times 10^9$ b/l). K falešnému zvyšování počtu trombocytů (trombocytóza) může někdy například dojít kvůli fragmentům buněk, které se v krvi nacházejí. Fragmenty jsou malé částečky, takže je stroj automaticky započítává k těm nejmenším krevním buňkám, tedy trombocytům.

Falešné snížení počtu trombocytů (pseudotrombopenie) je nejčastěji způsobeno přidáním antikoagulačního činidla EDTA (tak zvaný EDTA syndrom), které způsobí shluk trombocytů. Hematologický analyzátor pak nemůže přesně stanovit jejich počet. Udává se, že se počet pseudotrombopenií pohybuje od 0,1 až 2% (Penka et al., 2001). Nám se podařilo odhalit 0,13% pseudotrombopenií.

Přístrojovým chybám se dá předcházet. Asi nejúčinnější je kontrola kvality měření přístroje a jeho validace.

Kontrola kvality probíhá ve dvou stupních. První zahrnuje kontrolu kvality uvnitř laboratoře (**interní kontrola kvality**). Druhý stupeň zahrnuje kontrolu kvality mimo laboratoř (**externí kontrola kvality**).

Interní kontrola kvality probíhá každý den, na dvou, lépe na třech úrovních. První úrovní se rozumí stanovení vzorku krve se známými velmi nízkými hodnotami všech měřených hodnot krevního obrazu. Druhou se rozumí stanovení vzorku krve se známými

velmi vysokými hodnotami všech měřených hodnot krevního obrazu. A třetí úrovní se rozumí stanovení vzorku krve s normálními hodnotami krevního obrazu. Možným dalším způsobem interní kontroly kvality je opětovné stanovení vzorku krve, který je změřen bez vědomí laboranta/ky obsluhující hematologický analyzátor. Poté se vyhledají hodnoty stanovené poprvé a podruhé a pokud nesouhlasí, podniknou se určité kroky (které se provádějí, i pokud se objeví nesrovnalosti u běžné každodenní kontroly) k odstranění nedostatků v měření hematologickým analyzátorem. Pod určitými kroky si představme novou kalibraci přístroje, překontrolování jeho vnitřních součástí, po případě povolání servisního technika. Servisní technik z pravidla chodí i na pravidelné preventivní prohlídky přístroje, které se konají jednou za 3 až 6 měsíců. Dalším možným způsobem interní kontroly kvality je test reprodukovatelnosti, kdy se jeden vzorek krve nechá přeměřit 10 krát. Pokud se stanovené hodnoty prokazatelně liší, je nutný servis přístroje. Dalším způsobem kontroly interní kvality je metoda klouzavých průměrů, kdy se u asi 20 až 30 krevních obrazů neustále průměrují stanovené hodnoty. Pokud některý parametr statisticky významně přesáhne nějakou z hodnot, stroj nás na to upozorní komentářem. Metoda klouzavých průměrů se spíše hodí do menších laboratoří, kam chodí většinou vzorky pacientů s podobným typem onemocnění. V laboratoři, jaká je na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a.s., můžeme v každém měření očekávat úplně rozdílné hodnoty, takže tato metoda je zde prakticky nepoužitelná. Pokud je v laboratoři použito více přístrojů na stanovení hodnot krevního obrazu, musíme zajistit jejich shodné měření testem porovnatelnosti, kdy se každý den měří jeden vzorek krve nejdříve pomocí prvního analyzátoru, poté pomocí druhého analyzátoru. Naměřené hodnoty se nesmí statisticky významně lišit.

Externí kontrola kvality se z pravidla provádí minimálně jednou ročně, kdy určená národní autorita (v České republice je to Systém externí kontroly kvality - SEKK) dopraví do laboratoře vzorek krve, pro laboratoř neznámých hodnot krevního obrazu. Laboratoř má za úkol hodnoty stanovit a výsledek sdělit instituci, která externí kontrolu kvality organizuje.
Další možností externí kontroly kvality je pořádání auditů. Po dobrém hodnocení odborníků, kteří se auditu účastnili, laboratoř získá certifikát buď akreditované nebo certifikované laboratoře.

Předcházení nesprávného stanovení hodnot krevního obrazu však neobsáhne pouze interní či externí kontrola kvality. Nutná je i povědomost personálu o principu, jakým přístroj stanovuje hodnoty krevního obrazu, jelikož personál rozhoduje o výsledcích, které se přeměřovat budou a které ne. Nutné je i podání informací personálu o možných nedefinovaných chybách, které přístroj může udělat (jako na příklad pokud naměří vysokou

hladinu MCHC a přitom hladina MCH nepřesahuje normální hodnoty). Tyto nedefinované chyby se mohou stát, pokud se například uvolní nečistota v měřící hadičce a podobně.
Výborným řešením pro laboranty/ky je automatický delta check, což znamená automatická zpráva o hodnotách určitého pacienta v předešlých měření, laboranti/ky si tak mohou všechny hodnoty porovnat. Nutná je i znalost diagnózy pacienta.
Dbát by se mělo i na informování klinik o správném postupu při náběru krve a jejím následném transportu. Proto by laboratoře měly vydávat poučné brožurky pro lékaře kliniky.

Ideálním postupem, jak určit správné hodnoty krevního obrazu, je stanovit hodnoty krevního obrazu pomocí přístroje za účasti delta checku, pokud se hodnoty v počtu leukocytů v řádu jednoho týdne liší o více jak 30%, automaticky se hodnota leukocytů překontroluje referenční metodou. Pokud se hodnoty v počtu trombocytů liší v řádu jednoho měsíce o více jak 20%, také se překontrolují referenční metodou. Dále se laboranti/ky informují o diagnóze pacienta, poněvadž u některých onemocnění bývá v hodnotách krevního obrazu charakteristická změna. Dále si laboranti/ky vedou přístrojový laboratorní deník, popřípadě příručku kvality a, což je nejdůležitější, dodržují stanovené pracovní postupy podle příručky určitého hematologického analyzátoru a sledují expiraci všech používaných chemikálií.

6 Závěr

- U 7806 pacientů byly v měsíci únoru roku 2007 na Oddělení klinické hematologie Nemocnice České Budějovice, a.s. stanoveny hodnoty krevního obrazu.
- U pacientů byly zjištěny následující hodnoty počtu leukocytů :

U 58,69% pacientů - výsledky v normě, u 41,31% pacientů - výsledky mimo normu, z toho u 4,64% pacientů - stanovené počty leukocytů pod $4x10^9$buněk/l krve, u 36,68% pacientů - stanovené počty leukocytů nad $10x10^9$ buněk/l krve. U 0,47% pacientů se stanovené hodnoty ověřovaly referenční metodou, u 0,1% pacientů byly hodnoty získané pomocí hematologického analyzátoru stanoveny špatně.

U pacientů byly zjištěny následující hodnoty počtu trombocytů:

U 83% pacientů - v normě, u 17% pacientů - mimo normu, z toho u 4,7% pacientů - klinicky významný pokles trombocytů, u 7,57% pacientů – hodnoty nad $444x10^9$ buněk/litr krve, u 0,86% pacientů - hodnoty se přeměřili referenční metodou a z toho u 0,13% pacientů - naměřené hodnoty pomocí hematologického analyzátoru byly chybné.

- U pacientů byl zjištěn následující průměrný počet leukocytů:

U všech vyšetření – $9,98x10^9$buněk/l krve, u výsledků v normě - $7,29x10^9$buněk/l krve, u výsledků pod $4x10^9$buněk/l krve – $2,63x10^9$buněk/l krve, u výsledků nad $10x10^9$buněk/l krve – $15,23x10^9$buněk/l krve, u přeměřených hodnot – $1,98x10^9$buněk/l krve, u špatně stanovených hodnot – $2,26x10^9$buněk/l krve.

U pacientů byl zjištěn následující průměrný počet trombocytů:

U všech vyšetření – $272,26x10^9$buněk/l krve, u výsledků v normě – $268,58x10^9$buněk/l krve, u výsledků pod $150x10^9$buněk/l krve – $86,26x10^9$buněk/l krve, u výsledků nad $440x10^9$buněk/l krve – $543,21x10^9$buněk/l krve, u výsledků v klinicky významné oblasti – $51,15x10^9$buněk/l krve, u přeměřovaných hodnot – $57,27x10^9$buněk/l krve a u špatně stanovených hodnot – $67,10x10^9$buněk/l krve.

- Byl stanoven ideální postup měření počtu leukocytů a trombocytů

7 Citovaná literatura

Barnard DF, Carter AB, Crosland-Taylor PJ, Stewart JW (1969): An evaluation of the Coulter model S. J Clin Path 22: 26-33

Beutler E, Lichtman MO, Coller BS, Seligsohn U, Kipps TJ (2001): Williams haematology. The Mc Graw-hill companics

Brecher G, Schneiderman M, Williams GZ (1956): Evaluation of electronic red blood cell counter. Am J Path 26: 1439-1449

Brigs C, Harrison P, Grant D, Staves J, Chavada N, Machin SJ (1999): Performance evaluation of the Sysmex XE-2100, automated haematology analyser. Sysmex J Int
9: 113-119

Bull BS, Schneiderman MA, Brecher G (1965): Platelet counts with the Coulter counter. Am J Path 44: 678-688

Grover NB, Naaman J, Ben-asson S, Dojanski F (1972): Electrical sizing of particles in suspension III. Rigid spheroids and red blood cells. Biophys J 12: 1099-1116

Guder WG, Ehret W et al. (1998): Serum, plasma or whole blood? Which anticoagulants to use? Laboratoriums Medizin 22: 297-312

Guder WG, Narayama S, Wisser H, Zarote B (1996): Samples from the patient to the laboratory. GIT Verlag, Darmstadt

http://diagnostics.siemens.com: ADVIA 2120 Platelet count technology

http://diagnostics.siemens.com: ADVIA 2120 Red blood cell technology

http://diagnostics.siemens.com: ADVIA 2120 White blood cell technology

Igout J, Fretigny M, Vasse M, Capkat MP, Silva M, Willemont L, Gelle M, Lenormand B (2004): Evaluation of the Coulter LH 750 haematology analyzer compared with flow cytometer as the reference method for WBC, platelet and nucleated RBC count. Clin Lab Haem 26: 1-7

Jonge R, Brower R, Tilborg M, Lindemans J (2000): Evaluation of two Sysmex XE-2100 analyzers in an HST-302 configuration. Sysmex J Int 10: 64-70

Kubisz P et al. (2006): Hematológia a transfúzológia. GRADA publishing

Matsumoto H (1999): The technology of reagents in the automated haematology analyzer Sysmex XE-2100. Red fluorescence reaction. Sysmex J Int 9: 179-185

Mudschenk DD, Conelly DP, White JG, Brunning RD (1976): An improved technique for the electronic measurement of platelet size and shipe. J Lab Clin Med 88: 301-315

Oshiro I, Takenaka T, Maeda J (1982): New method for haemoglobin determination by using sodium lauryl sulfate (SLS). Clin Biochem 15: 83-88

Penka M, Buliková A, Matýšková M, Zavřelová J (2001): Hematologie I. GRADA publishing

Racek et al., (2006): Klická biochemie. Galén

Ruzicka K, Veitl M, Thalhammer-Scherrer R, Schwarzinger I (2000): The new haematology analyzer Sysmex XE-2100. Performance evaluation of novel white blood cell differential technology. Department of Laboratory Medicine, University of Vienna

Sakalová A, Lipšic T et al. (1995): Hematológia a transfúzológia. Vydavateľstvo Osveta

Sakata T (2000): Reagent characteristics in the XE-2100 NRBC channel. Sysmex J Int 10: 41-46

Uživatelská příručka k přístroji Coulter Gen S (1999). Coulter corporation