

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

Zavedení digitální morfologie v hematologické laboratoři

Bakalářská práce

Autor práce: Martina Strusková

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Ivan Vonke MBA

Datum odevzdání práce: 3. 5. 2013

Abstrakt

Zavedení digitální morfologie v hematologické laboratoři

V současné době se digitální morfologie stává součástí rutinních metod hematologických laboratoří a v analýze diferenciálního rozpočtu leukocytů má nemalý význam. Cílem mé bakalářské práce je ve zkušebním provozu porovnat výsledky diferenciálního rozpočtu leukocytů pomocí klasického mikroskopu a digitálního morfologického systému společnosti CellaVision AB (Lund, Švédsko) Cella Vision DM96™. Zaměřila jsem se na kontrolu správnosti a přesnosti měření a porovnala jsem pracovní, časovou a finanční náročnost.

Teoretická část se zabývá obecnými poznatky hemopoézy a jednotlivé leukocytární populace jsou popsány v příslušných vývojových řadách.

V práci popisuji zhotovení krevního nátěru, jeho obarvení a vyhodnocení diferenciálního rozpočtu leukocytů klasickým mikroskopem. Dále popisuji analýzu 5ti populačního diferenciálu leukocytů na hematologických analyzátorech pomocí principu VCS technologie nebo průtokové fluorescenční cytometrie.

Metodická část této práce byla provedena v hematologické laboratoři v Nemocnici České Budějovice, a.s., kde jsem zaměstnána. Soubor dat tvořilo 50 vzorků, jejichž krevní obraz včetně diferenciálního rozpočtu leukocytů byl analyzován na hematologickém analyzátoru Coulter LH 755. Vyhodnoceny byly dle příslušných pravidel stanovených v SOPu (standardně operační postupy) laboratoře a tzv. varovných hlášení analyzátoru informujících o podezření na přítomnost nezralých či atypických forem buněčných populací a byly označeny jako nutné k mikroskopické kontrole. Po zhotovení a obarvení nátěru byly tyto vzorky mikroskopicky vyhodnoceny klasickým mikroskopem a zároveň v rámci zkušebního provozu analyzovány digitálním mikroskopem Cella Vision DM96.

Výsledky měření jsou zaznamenány v příslušných grafech vyjadřující vztahy správnosti a korelace buněčných populací. Zdroje původních dat zanesené do tabulek se nacházejí v příloze.

Korelace jednotlivých populací leukocytů preklasifikované digitálním mikroskopem ve vztahu ke konvenční mikroskopii jsou pro neutrofily 0,91, lymfocyty

0,96, monocyty 0,89, tyče 0,78. Hodnoty pro eosinofily a basofily neuvádím, neb z důvodu nízkého buněčného zastoupení v nátěrech jsou málo vypovídající. Hypotéza, že výsledky diferenciálního rozpočtu leukocytů vyhodnocené digitálním systémem Cella Vision DM96™ jsou neuspokojivé, se potvrdila, zejména kvůli neutrofilům.

Korelace leukocytů po manuální korekci je pro neutrofilů 0,97, lymfocytů 0,98, monocyty 0,94, tyče 0,96. V tomto případě hypotéza, že výsledky po manuální reklasifikaci jsou srovnatelné s klasickou mikroskopií, je pravdivá.

Celkový průměrný čas vyhodnocení digitální morfologií je 9'55'', kde čas stanovení analyzátozem trval v průměru 2'30'' a čas obsluhy provádějící manuální korekci byl v průměru 6'55''. Naměřený průměrný čas standardní mikroskopie byl 5'10''. Z výsledných hodnot vyplývá, že časová náročnost analýzy diferenciálního rozpočtu leukocytů mikroskopem Cella Vision DM96™ je větší než u klasické mikroskopie. Významným aspektem, který ovlivňuje výsledky preklasifikace je kvalita nátěru a barvení. Sledované vzorky byly zpracovávány manuálně. Po ukončení studie jsem měla možnost pracovat se vzorky automaticky zhotovenými a obarvenými. U takto připravených nátěrů je časová náročnost podstatně menší. Pro skupinu leukopenických vzorků ($0,1-3,9 \cdot 10^9$ G/l) je časově výhodnější manuální reklasifikace diferenciálního rozpočtu v digitálním automatu než vyhodnocení klasickým mikroskopem. Časová úspora těchto vzorků je téměř 50%.

Finanční náročnost vychází z časové, respektive z nákladů na čas obsluhy provádějící manuální reklasifikaci digitálně vyhodnoceného nátěru. Provozní náklady jsou vyšší o náklady na časový rozdíl mezi klasikou a digitálním mikroskopem. Vezmeme-li v úvahu ještě cenu přístroje, tak finanční zatíženost mnohonásobně stoupne. Přesto jsou tu významné aspekty, pro které je digitální morfologie pořizována. Patří sem archivace výsledků a jejich zpětná dohledatelnost včetně všech snímků buněk, možnost tzv. konzultace na dálku, ukládání snímků do elektronických lékařských záznamů. Digitální systém je také dobrým pomocníkem v edukaci pracovníků a stážistů.

Abstract

The introduction of digital morphology in a hematological laboratory

Nowadays the digital morphology is becoming a part of routine methods in hematological laboratories and in analysis of differential divide of leukocyte has a considerable meaning. The aim of my bachelor's work is to compare the results of the differential divide of leukocyte achieved in a trial run by a classical microscope and by a digital morphological system from the company CellaVision AB (Lund, Sweden) Cella Vision DM96™. I concentrated on checking the correctness and accuracy of the measurement and I compared the work, time and financial demands.

The theoretic part is concerned with general pieces of knowledge of hemopoiesis and the single leucocytic populations are described in corresponding developmental lines.

In the work I describe blood smear making, its colouring and the differential divide of leukocyte evaluation done by a classical microscope. Moreover I describe 5-population analysis of differential of leukocyte at a hematological analyzer with the help of VCS technology principle or the flow fluorescent cytometry. The methodical part of my work was done in the hematological laboratory in the hospital České Budějovice plc., where I work. The data file was formed of 50 samples, whose blood picture including the differential divide of leukocyte was analysed at hematological analyzer Coulter LH 755. The samples were evaluated according to the rules stated in SOP of the laboratory and according to as it is called warning reports of the analyzer informing about the suspicion of occurrence of immature or atypical forms of cellular populations, which were marked as necessary for microscopic checking. After making and colouring the blood smear these samples were microscopic evaluated by a classical microscope and at the same time they were, in a trial run, analyzed by a digital microscope Cella Vision DM96.

The results of the measurement are placed in corresponding diagrams showing the relations of correctness and correlation of cellular populations. The source of original data is to be found in the enclosure.

The correlation of single population of leukocyte preclassified by a digital

microscope in relation to conventional microscopy are for neutrophils 0,91, for lymphocytes 0,96, monocytes 0,89, bands 0,78. I don't mention the figures for eosinophils and basophils, because they are of low informative value due to low cellular representation in the smears. The theory about results achieved by the digital system Cella Vision DM96™ being unsatisfactory was proved, mainly because of neutrophils.

The leukocyte correlation after manual correction is for neutrophils 0,97, lymphocytes 0,98, monocytes 0,94, bands 0,96. In this case the theory about results after manual preclassification being comparable to classical microscopy is true.

The total average time of evaluation by the digital morphology is 9'55'' where the time of stating by analyzer took on average 2'30'' and the operation time of manual correction was on average 6'55''. The measured average time of classical microscopy was 5'10''. The time demands of the differential divide of leukocyte analysis done by a microscope Cella Vision DM96™ is bigger than by classical microscopy, which emerges from the resulting values. A very important aspect which influences the results of preclassification is the quality of smears and colouring. The observed samples were done manually. After finishing the study I had the opportunity to work with samples done mechanically. With samples prepared this way is the time demands much lower. For the group of leukopenic samples ($0,1-3,9 \cdot 10^9$ G/l) the manual preclassification of the differential divide of leukocyte done mechanically by a digital machine from the point of view of time more favourable than the reclassification done by classical microscope. Time savings of these samples is nearly 50%.

The financial demands are based on the time or rather the cost of operation time for people doing the manual reclassification of the digitally evaluated sample. The operating costs are higher at the time difference between classical and digital microscopy. If we take account of the machine price, the financial demands increase multiply. Although there are some significant aspects the digital morphology is implemented for. For example results archiving and their reverse control including all cell exposures, possibility for so called teleconsultation, saving the exposures in electronic medical records. The digital system is also a significant help for employees and trainees education.

Prohlášení

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2013

.....

Martina Strusková

Poděkování

Ráda bych touto cestou upřímně poděkovala svému školiteli MUDr. Ivanu Vonkemu za odborné vedení a poskytnutí důležitých informací při zpracování bakalářské práce. Zároveň děkuji svým kolegyním v Laboratoři hematologie v Nemocnici České Budějovice, a.s. za ochotný přístup a přívětivou spolupráci. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině za podporu a trpělivost.

Obsah

1. Současný stav.....	11
1.1 Krev	11
1.2 Hemopoeza	11
1.2.1 Granulocytopenie	12
1.2.2 Monocytopenie.....	12
1.2.3 Lymfopenie	13
1.2.3.1 B-lymfocyty.....	14
1.2.3.2 T-lymfocyty	14
1.2.3.3 NK-buňky	15
1.2.3.4 Rozlišení T a B lymfocytů.....	15
1.3 Diferenciální rozpočet leukocytů.....	15
1.3.1 Klasická mikroskopie	16
1.3.1.1 Příprava a barvení krevních preparátů.....	16
1.3.1.2 Zásady pro morfologické hodnocení jednotlivých buněčných populací ...	16
1.3.2 Hodnocení diferenciálního rozpočtu leukocytů na analyzátoch.....	17
1.3.2.1 Třípopulační diferenciál	17
1.3.2.2 Pětipopulační diferenciál	17
1.3.3 Digitální morfologie	19
2. Cíl práce a hypotézy	21
2.1 Cíl práce.....	21
2.2 Hypotézy.....	21
3. Metodika	22
3.1 Charakteristika souboru dat	22
3.2 Preanalytická fáze	22
3.3 Analytická fáze	22
3.3.1 Příprava nátěru k mikroskopické kontrole.....	23
3.3.2 Mikroskopické vyhodnocení	23
3.3.3 Digitální zpracování.....	24

4. Výsledky	26
4.1 Vyhodnocení diferenciálního rozpočtu leukocytů	29
4.2 Časová náročnost	35
5. Diskuze	37
6. Závěr	40
7. Seznam použitých zdrojů	41
8. Klíčová slova	44
9. Přílohy	45

Úvod

Tak jako erytrocyty jsou důležité pro přenos kyslíku, který je nezbytný pro fungování lidského organismu a trombocyty tvoří důležitou složku v primární hemostázi, tak i leukocyty mají svůj význam a to především v imunitních mechanismech ochraňujících náš organismus. Diferenciální rozpočet leukocytů zjišťuje přesné zastoupení jednotlivých buněčných populací v obvodové krvi. V případě nepoměru těchto buněk či nalezení nezralých či patologických forem nám tato informace může pomoci v diagnostice nejrozumnějších onemocnění. Od alergické reakce, bakteriální nebo virové infekce až po závažnější choroby jako jsou leukémie, proliferativní onemocnění či nádory. Vědním oborem, který se zabývá touto problematikou je hematologie. Moderní hematologie dnes zasahuje i do některých sociálních otázek, neboť včasnou diagnostikou a léčbou vrozených onemocnění umožňuje zařadit do normálního života nemocné, které byli dříve z normální společnosti vyloučeni (Donner 1985).

Metodu určování různých typů bílých krvinek poprvé zavedl v roce 1878 Paul Ehrlich, kdy je rozpoznával pomocí anilinových barev (Pecka 2006).

V hematologických laboratořích nyní analyzují krevní vzorky analyzátory pracující v uzavřeném systému, vyhodnocují velmi spolehlivé výsledky a ke stanovení potřebují velice malé množství vzorku. Diferenciální rozpočet leukocytů stanovují na principu VCS technologie nebo fluorescenční průtokové cytometrie. Přes rozvoj automatizace v laboratořích zůstává klasická mikroskopie nadále zlatým standardem. Novinkou na trhu, která by mohla do budoucna nahradit klasickou mikroskopii je digitální mikroskop Cella Vision DM96. Tento digitální morfologický systém umožňuje předběžnou preklasifikaci leukocytů a následnou manuální korekci jednotlivých buněčných populací. Významnou výhodou v zavedení této technologie do laboratorní rutiny oproti zlatému standardu je především archivace výsledku, z které vyplývá zpětná dohledatelnost analyzovaných vzorků.

Pokusím se v této práci zmapovat problematiku analýzy diferenciálního rozpočtu leukocytů digitálním mikroskopem Cella Vision DM96™ a porovnat ji s klasickou mikroskopií ve správnosti měření, pracovní a časové náročnosti.

1. Současný stav

1.1 Krev

Již starověcí lékaři znali význam krve, mnohými byla označována jako životodárná tekutina. Běžnou příčinou úmrtí v dobách častých válek býval právě hemoragický šok. Ve starověkém Egyptě se členové vládnoucích rodů koupali v krvi ve snaze regenerace a omlazení organismu. V 1492 je zaznamenán první pokus transfúze krve, který skončil fatálně. Až roku 1901 Karl Landsteiner publikoval objev tří krevních skupin (Penka et al. 2009). V roce 1907 se český psychiatr Jan Jánský stal prvním, kdo správně roztřídil lidskou krev do čtyř krevních skupin (Penka et al. 2012).

Krev je vysoce specifická tekutina zajišťující v lidském organismu správný chod životně důležitých funkcí. Je tekutým orgánem a zároveň systematickým celkem s funkcí výživnou, okysličovací, imunitní, ale i léčebnou a termoregulační (Sakalová 2010).

1.2 Hemopoeza

Hlavním hemopoetickým orgánem je kostní dřeň, ve které se nachází pool hemopoetických kmenových buněk. Pluripotentní kmenová buňka je společná pro všechny lymfoidní i nelymfoidní řady. Multipotentní kmenová buňka CFU – GEMM (Colony Forming Unit) pro granulocytární, erytrocytární, monocyto/makrofágovou a megakaryocytární řadu. Další zralejší kmenové prekursory jsou pro erytroidní, megakaryocytární a granulocyto/monocytární linii. Eosinofilní, basofilní a vývoj mastocytů (tkáňové bazofily) vychází ze specifických kmenových buněk jako je CFU-Eo, CFU-Ba a CFU-mast. Lymfoidní řada se vyvíjí ze společné kmenové buňky pro B a T – populaci, zatímco NK-cells tzv. přirození zabíječi mají svůj specifický prekursor.

Hemopoeza je regulována řadou interleukinů, CFS (colony-stimulating factor) a interakcí kmenových buněk se stromatem hemopoetických orgánů tzv. hemopoetickým indukčním mikrostředím. Společným provázáním těchto faktorů je umožněna normální hemopoeza. Na druhé straně poruchy na úrovni kmenových buněk vedou

k patologickým stavům mezi které patří např. dřevňové útlumy, myelodysplazie, myelofibrózy apod.

V období embryonálního vývoje se hemopoéza uskutečňuje ve žlutkovém vaku, později přechází do jater a sleziny a nakonec do kostní dřevně. Za patologických stavů může docházet k aktivaci hemopoézy opět ve slezině i játrech, někdy i v mízních uzlinách (Penka et al. 2009).

1.2.1 Granulocytopoeza

Zralé bílé krvinky – leukocyty – se dělí na granulocyty nebo-li polynukleáry neutrofilní, eosinofilní, basofilní (mají polymorfní jádro různých tvarů) a mononukleáry (buňky s kompaktním jádrem) mezi které patří lymfocyty a monocyty.

Mateřská buňka CFU-GM je společná pro granulocyty a monocyty. Zralejší buňka jen pro granulocytární řadu se označuje CFU-G. Nejmladší mikroskopicky rozpoznatelná buňka granulocytopoezy je myeloblast. Dalšími vývojovými stádii jsou promyelocyt, myelocyt, metamyelocyt, neutrofilní tyč a poslední zralým stádiem je neutrofilní segment. Během vyžívání se leukocyty granulocytů postupně zmenšují s výjimkou promyelocytu, který je větší než myeloblast. Mizí jádérka, kondenzuje se chromatin, v cytoplazmě se objevují nejprve primární nebo-li azurofilní granula, později tzv. specifická – neutrofilní, eosinofilní nebo bazofilní granula. Cytoplazma se během vyžívání mění z původně bazofilní na konečnou růžovou.

1.2.2 Monocytopoeza

Určená mateřská buňka společná pro granulocyty a monocyty je CFU-GM. Dalším prekurzorem pro monocytovou vývojovou řadu je CFU-M. Další vývojová stádía lze odlišit pomocí imunofenotypizace. Odlišení monoblastů od myeloblastů není možné mikroskopicky, ale na základě kultivace dřevňových buněk (Sakalová et al. 2010). Promonocyty již více připomínají monocytární elementy, mají většinou ledvinovité jádro, kde se ještě mohou vyskytovat různě zřetelné nukleoly. Cytoplazma je bazofilní, avšak může již nabývat typické kouřově šedé zabarvení. Zralé monocyty mají většinou nepravidelné jádro bez jáderek. Cytoplazma je kouřově šedá a obsahuje jemný poprašek azurofilní granulace. Monocyty vycestovávají do tkání, kde je označujeme jako

makrofágy. Ty jsou přítomny ve většině tkání a orgánech. V některých plní specifické funkce jako např. osteoklasty v kostní tkáni, mikroglie v mozku, Kupferovy buňky v játrech, Langerhansovy buňky v kůži apod. Základními funkcemi monocyto-makrofágového systému jsou především fagocytóza mikroorganismů, prezentace a eliminace antigenů, nemalou účastí se podílí na remodelaci tkání. Další významnou funkcí je destrukce starých nebo poškozených erytrocytů s nemalým podílem na ovlivnění metabolismu železa. (Penka et al. 2011).

Makrofágy jsou větší než samotné monocyty. Mají nepravidelný tvar, často s nitkovými či pupencovitými výběžky. Jádro je převážně oválné. V cytoplazmě se nacházejí vakuoly v místě vyplavených či pohlcených částic. Významná je jejich přítomnost z hlediska odolnosti organismu proti nádorovým onemocněním (Sakalová et al. 2010).

1.2.3 Lymfopoieza

Lymfocytární řada prodělává vzhledem ke svým důležitým regulačním funkcím v imunitních mechanismech velice složitý vývoj. Po diferenciaci ze společné multipotentní kmenové buňky pro nelymfoidní i lymfoidní řadu se lymfoidní kmenové buňky dále diferencují do T nebo B řady (Penka et al. 2011). Dělení v lymfocytární populaci probíhá asymetricky. Po rozdělení buňky se jedna z dceřinných buněk dále diferencuje, zatímco druhá si zachovává schopnost samoobnovy (Sakalová et al. 2010). První mateřskou buňkou již mikroskopicky poznatelnou je lymfoblast. Zpravidla bývá menší než myeloblast. Vyznačuje se úzkým lemem cytoplazmy kolem kulatého jádra s jemnějším chromatinem, které obsahuje 1-2 nukleoly. Prolymfocyty jsou středně velké buňky mající ještě jemně kondenzovaný chromatin a většinou jeden výrazný nukleolus v jádře (Adam et al. 2008). Zralé lymfocyty se vyznačují velkou morfologickou a funkční variabilitou. Jsou to nejmenší leukocyty velikosti erytrocytu. Mají centrálně nebo excentricky uložené jádro s hutnějším chromatinem. V malých lymfocytech bazofilně barvící se cytoplazma tvoří jen úzký lem kolem jádra. Ve středních a velkých lymfocytech je cytoplazma světlejší a bohatší obsahující malé množství azurofilních granul. Lymfocyty se rozdělují na dvě hlavní skupiny a to na B-lymfocyty a T-lymfocyty (Penka et al. 2011).

1.2.3.1 B-lymfocyty

Název B-lymfocytů pochází z názvu „bursa Fabricii“, což je lymfatický orgán ptáků, ve kterém tyto lymfocyty dozrávají. U lidí tento orgán neexistuje a lymfocyty zrají ve fetálních játrech, kostní dřeni a slezině (Bartůňková et al. 1999). Vývoj B-lymfocytů v prvních stádiích závisí na vnitřním programu buněk a příslušných regulačních faktorech. Další vývoj je závislý na stimulačních faktorech v imunitních procesech (Sakalová et al. 2010). Proliferace a diferenciaci probíhá bez antigenní a s antigenní stimulací. První fáze probíhá v kostní dřeni, kde se z kmenových buněk postupně diferencuje nezralý pro-B-lymfocyt. Dalším stádiem je pre-B-lymfocyt, ze kterého se diferencuje zralý naivní B-lymfocyt. Ve druhé fázi tj. po setkání s antigeny, naivní lymfocyty podléhají apoptóze nebo se diferencují v plazmatické buňky (plazmocyty) tvořící protilátky proti cílovému antigenu. Při dalším setkání s příslušnými antigeny jsou rychleji produkovány klony plazmatických buněk produkující protilátky. V této řadě lze rozlišit plazmoblast, proplazmocyt a zralý plazmocyt. Mladší buňky jako plazmoblasty a proplazmocyty mají větší jádro v poměru k cytoplazmě. V jádře bývají jadérka. Plazmocyty jsou okrouhlé či oválné buňky s excentricky uloženým jádrem, objemnou silně bazofilně až inkoustově barvící se cytoplazmou. Těsně perinukleárně je přítomno projasnění. Jádro bývá velmi hutně uspořádané tzv. loukoťovitě. U plazmatických buněk se můžeme setkat s různými morfologickými abnormalitami. Například červeno-růžové zabarvení cytoplazmy je typické pro tzv. „plamenné plazmocyty“. Cytoplazma může obsahovat také Russelova tělíska, což jsou sférická depozita s obsahem imunoglobulinu. Mohou být růžová, fialová i modrá. Jsou-li přítomna tělíska v jádře připomínající nukleoly jde tzv. Duchterova tělíska typická pro nádorové plazmocyty (Penka et al. 2011).

1.2.3.2 T-lymfocyty

Vývoj T lymfocytů probíhá v prvních stádiích v kostní dřeni. Poté dozrávají v thymu, kde získávají své specifické znaky a vlastnosti. Po dozrání přecházejí do sekundárních lymfatických orgánů jako jsou lymfatické uzliny a slezina. T lymfocyty dělíme na Th – helpéry, Tc – cytotoxické a NK buňky nebo-li přirozené zabijáky (natural killer).

1.2.3.3 NK-buňky

NK buňky byly původně popsány jako lymfocyty, které jsou bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciaci schopny zabíjet virem infikované buňky nebo některé nádorové buňky. Jsou to morfologicky velké granulární lymfocyty (LGL – large granular lymphocyt), které nemají antigenně specifické receptory, proto je záhadou jejich rozeznávání abnormálních buněk (Hořejší 2009). Při ničení cílových buněk je spuštěna lýza prostřednictvím lysozomálních enzymů a perforinů, které se nachází v granulích NK- buněk. Po lýze se odlepí od mrtvých buněk a jsou schopny dále útočit na cílové buňky (Pecka 2002).

1.2.3.4 Rozlišení T a B lymfocytů

V krvi ani v hemopoetických orgánech nelze (vyjma plazmatických buněk) morfologicky rozlišit jednotlivé lymfocyty. K rozlišení využíváme jejich povrchové a cytoplazmatické markery a jejich imunologických, cytochemických a proliferačních vlastností. Jednou z metod je tzv. imunofenotypizace, při které dochází k vazbě značené monoklonální protilátky na povrchový membránový antigen lymfocytu. Takto značené buňky světélkují ve fluorescenčním mikroskopu (Pecka 1996).

1.3 Diferenciální rozpočet leukocytů

Mezi rutinní laboratorní hematologické vyšetření patří vyhodnocení krevního obrazu včetně diferenciálního počtu leukocytů, který bývá důležitý pro stanovení některých diagnóz např. infekční mononukleózy či jiných závažnějších chorob jako jsou leukémie, myelodysplastické syndromy, lymfomy aj.

Analýza diferenciálního rozpočtu bílých krvinek v periferní krvi je dnes prováděna pomocí vícepopulačních hematologických analyzátorů, jejichž přednostmi jsou práce v uzavřeném systému, zpracování malého objemu vzorku (někdy stačí i 190 µl) a jeho rychlé zpracování (do několika minut). Zároveň jsou velmi spolehlivé a nenáročné pro obsluhu.

V případě pochybností výsledku z analyzátoru či významnou patologií krevního obrazu lze hodnoty diferenciálního počtu leukocytů určit pomocí klasické mikroskopie.

Současnou novinkou se stává generace morfologických analyzátorů umožňující

digitální zpracování a vyhodnocení krevních nátěrů pomocí tzv. digitální morfologie. Hovoříme o éře virtuální mikroskopie – telehematologii (Juránková et al. 2010).

1.3.1 Klasická mikroskopie

Základním prvkem této metody jsou krevní nátěry. K hodnocení je nutné jejich šetrné zhotovení, protože i kvalita nátěru může ovlivnit jejich konečné vyhodnocení.

1.3.1.1 Příprava a barvení krevních preparátů

Nátěry se provádí z kapilární nebo žilní krve, která se nabírá do zkumavek z antikoagulační přísadou. Je nezbytné nátěr provést do 3-4 hodin po odběru. Poté může dojít ke strukturním změnám v některých krevních buňkách. Při manuálním provedení lze sílu nátěru ovlivnit úhlem, který svírá roztěrové sklíčko s podložním sklíčkem.

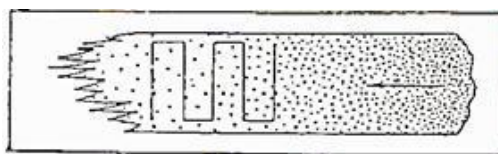
V současné době nám nejvhodnější nátěry se standardní úrovní poskytují nátěrové a barvicí automaty. Tloušťku nátěru zhotoví na základě hodnoty hematokritu.

Řádně zaschlé nátěry barvíme dle standardních postupů. Nejprve provedeme fixaci v metanolu. Poté následuje barvení pomocí barvicích roztoků May–Grünwald a Giemsa–Romanowski. May–Grünwald barví acidofilní buňky a granulaci v neutrofilech, zatímco Giemsa barví jak cytoplazmu lymfocytů a monocytů, tak i jaderný chromatin (Gentilhomme et al. 1989). Vodou opláchnuté nátěry necháme na vzduchu oschnout.

1.3.1.2 Zásady pro morfologické hodnocení jednotlivých buněčných populací

Diferenciální rozpočet leukocytů prohlížíme pod mikroskopem při zvětšení 1000x. Najdeme 100 leukocytů a jednotlivé buněčné typy zaznamenejme do tzv. leukomatů, které v konečné fázi provedou kalkulaci výsledku.

Při hodnocení si vybíráme tu část nátěru, ve které jsou buňky rovnoměrně rozprostřeny. Nejčastěji se jedná o místo cca 1 cm od konce nátěru. Nátěr prohlížíme rovnoměrným meandrovitým pohybem objektivu na podložním skle přes vrstvu imerze.



Obr. 1 Meandrovitý způsob prohlížení nátěru

Prohlíží se a hodnotí celkový vzhled buňky, její tvar, velikost v porovnání s ostatními buňkami. Dále jádro a to jeho velikost, uložení, tvar, uspořádání chromatinu, počet a vzhled nukleolů. Sledujeme množství plazmy, její barvitelnost, výběžky, vakuolizaci, perinukleární projasnění, granulaci a případné inkluze. V rámci hodnocení diferenciálního rozpočtu dále zjišťujeme početní zastoupení normoblastů (při zvýšeném množství tj. 20 normoblastů na 100 leukocytů a více, je nutné provést korekci leukocytů). Sledujeme anomálie v buňkách jednotlivých krvetvorných řad, především si všímáme tvarových odchylek erytrocytů, jejich zbarvení popř. výskytu tělísek, prstenců či inkluzí. Dále pozorujeme výskyt dalších buněčných forem jako jsou holá jádra a buněčné stíny. Někdy lze zjistit i přítomnost parazitů či bakterií v erytrocytech. V některých případech se provádí odhad počtu trombocytů (Pecka et al. 2006).

1.3.2 Hodnocení diferenciálního rozpočtu leukocytů na analyzátoch

Většina hematologických analyzátorů pracuje uzavřeným systémem. V dnešní době jsou v laboratořích analyzátory nejčastěji zastoupené firmou Beckman Coulter či Sysmex. Stanovují ve vzorcích krve hodnoty krevního obrazu, počty retikulocytů a počty normoblastů (NRBC) – nezralých červených krvinek, ale také parametry 5-populačního diferenciálu.

1.3.2.1 Třípopulační diferenciál

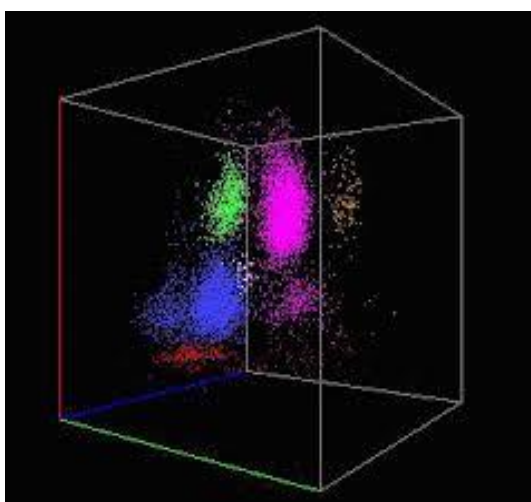
Stanovení tohoto rozpočtu leukocytů je již pouhou historií, při které analyzátor využíval impedanční metodu k rozlišení populací bílých krvinek s malým, středně velkým a velkým jádrem (Briggs et al. 2007).

1.3.2.2 Pětipopulační diferenciál

Analyzátor řady Coulter LH 755 firmy Beckman Coulter využívá technologii VCS k vyhodnocování diferenciálu leukocytů. Technologie VCS je tvořena kombinací tří

parametrů – nízkofrekvenčního proudu při měření objemu buňky (V – volume) vysokofrekvenčního proudu (C – conductivity) a rozptylu laserového paprsku (S – scatter). Princip C-analýzy využívá vysokofrekvenčního proudu, pro který buněčná stěna působí jako vodič a který při průniku buněčným obsahem odhaluje rozdíly v izolačních vlastnostech buněčných komponent především buněčného jádra, granulární složky či chemického složení. Povrch a tvar buňky je měřen odrazem laserového paprsku (S – scatter) (SOP 2007). Všechny měření probíhají na každé buňce současně. Jednotlivé hodnoty jsou použity jako souřadice X, Y, Z a zaznamenány v prostorovém scattergramu (3D VCS analýza). Následně jsou buňky pomocí speciálního softwaru seskupeny do oddělených oblastí a barevně odlišeny.

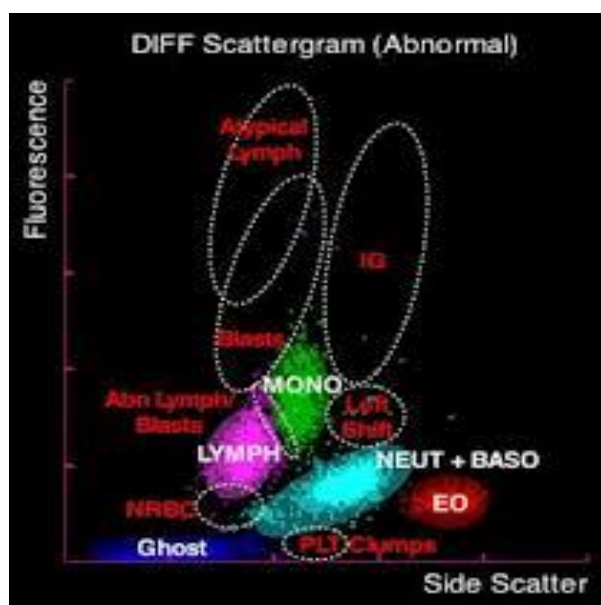
Nový hematologický systém firmy Beckman Coulter DX 800 měří několik dalších úhlů rozptylu světla pomocí modulu MTM (Multi-transducer Module), což je významné zdokonalení pro vyhodnocení naměřených hodnot (Boudal 2010).



Obr. 2: 3D scattergram leukocytů (analyzátor Coulter LH 755), růžová – neutrofilý, modrá – lymfocyty, zelená – monocyty, oranžová – eosinofily, bílá – basofily, červená - NRBC

Analyzátoři firmy Sysmex k analýze diferenciálního počtu bílých krvinek využívají kombinace průtokové fluorescenční cytometrie a rozptylu laserového paprsku. Podstatou principu metody je velikost úhlu rozptylu přímého laserového paprsku, která je přímo úměrná velikosti buňky (detektor Forward Scatter). Dále intenzita bočního

rozptylu laserového paprsku je přímo úměrná hustotě struktury uvnitř buňky (detektor Side Scatter). Pomocí detektoru Side Fluorescence Light je snímána intenzita fluorescenčního záření vycházející z buňky, která je přímo úměrná aktivitě buňky a nepřímo úměrná její vyzrálosti. Fluorescenční průtoková cytometrie využívá k analýze buněk dvou měřících systémů – channels (Warren et al. 1999). Každý modul využívá jiné činidlo s různou lyzační schopností a odlišný způsob detekce leukocytárních populací. Výslednou analýzu zaznamená do scattergramu populace leukocytů pomocí osy X a Y. Osa X je boční rozptyl paprsku (SSC) a informuje nás o složení uvnitř buňky. Na ose Y jsou leukocyty rozděleny dle intenzity fluorescence (SFL) a informují nás o poměru jádra a cytoplazmy (Pecka 2010).

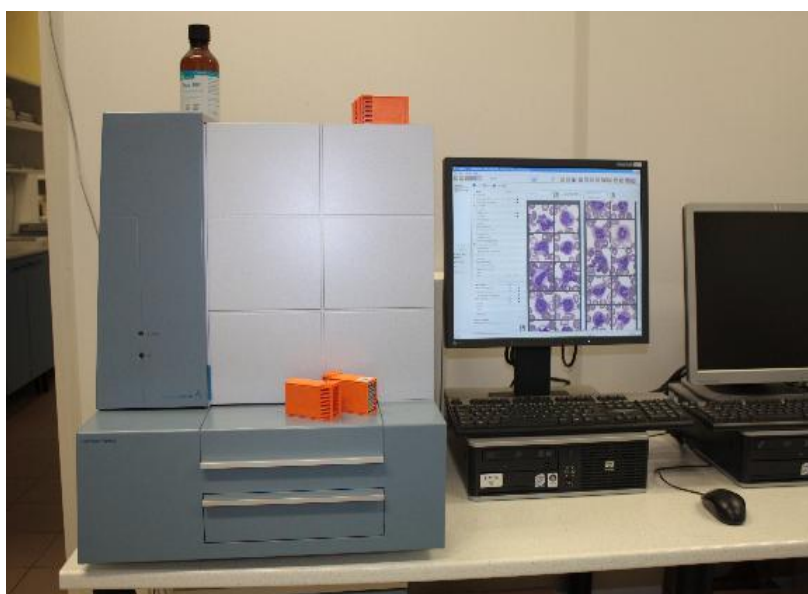


Obr.3: Scattergram populace leukocytů (analyzátor Sysmex)

1.3.3 Digitální morfologie

Pro naplnění požadavků na standartizaci a automatizaci laboratorní práce jsou zaváděny do laboratoří digitální morfologické systémy umožňující preklasifikaci krevních buněk. Společnost CellaVision AB (Lund, Švédsko) představila 3 nové systémy. V roce 2001 Diffmaster Octavia, v roce 2004 Cella Vision DM96 a v roce 2010 byl představen CellaVision DM1200 ve Spojených státech prostřednictvím firmy Sysmex (Yu et al. 2012). Automat se skládá z mikroskopu ovládaným motorem, jehož

optická část je vybavena třemi objektivy o zvětšení 10x, 50x, 100x. Součástí je automatický dávkovač imerzního oleje. Mikroskop je řízen klasifikačním softwerem Cella Vision Blood Differential™, který je nainstalován na PC pod operačním systémem Windows. Digitální mikroskop předběžně preklasifikuje minimálně 100 leukocytů a na základě více než 300 charakteristických parametrů je zařadí do 18 buněčných tříd. Cella Vision DM96™ poskytuje nejen analýzu leukocytární řady, ale i morfologii erytrocytů a trombocytů (Surcouf et al. 2009). Systém umožňuje uživateli identifikovat, potvrdit nebo reklasifikovat navrhované vyhodnocení leukocytů.



Obr. 4: Digitální mikroskop Cella Vision DM96™

2. Cíl práce a hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem mé bakalářské práce je porovnání diferenciální rozpočtu leukocytů analyzovaného digitálním mikroskopem Cella Vision DM96™ s klasickou mikroskopií jako zlatým standardem. Důraz bude kladen na kontrolu správnosti a přesnosti měření, včetně zhodnocení frekvence manuálních korekcí.

Dále vyhodnotím a porovnáím faktory jako je pracovní, časová a finanční náročnost pro případné budoucí zavedení metody do hematologické laboratoře.

2.2 Hypotézy

Hypotéza 1

Po vyhodnocení preklasifikace diferenciálního rozpočtu leukocytů patologických vzorků digitálním mikroskopem Cella Vision DM96™, jsou výsledky neuspokojivé.

Hypotéza 2

Po manuální reklasifikaci těchto vzorků jsou výsledné hodnoty diferenciálu leukocytů srovnatelné s klasickou mikroskopií.

Hypotéza 3

Časová náročnost digitální morfologie a klasické mikroskopie je srovnatelná.

Hypotéza 4

Pro vybrané skupiny vzorků by mohla být z hlediska časové náročnosti výhodnější analýza pomocí digitálního systému, pro jiné klasická mikroskopie.

3. Metodika

3.1 Charakteristika souboru dat

Soubor tvořilo 50 vzorků, které byly analyzovány na hematologickém analyzátoru Coulter LH 55. Vyhodnoceny byly dle příslušných pravidel stanovených v SOPu laboratoře a tzv. varovných hlášení analyzátoru informujících o podezření na přítomnost nezralých či atypických forem buněčných populací a označeny jako nutné k mikroskopické kontrole. Po zhotovení a obarvení nátěru byly tyto vzorky mikroskopicky vyhodnoceny klasickým mikroskopem a zároveň v rámci zkušebního provozu zanalyzovány digitálním mikroskopem Cella Vision DM96. Data byla zpracována v Laboratoři hematologie v Nemocnici České Budějovice, a.s.

3.2 Preanalytická fáze

Mezi důležité faktory, které mají vliv na konečný výsledek, je dodržení zásad preanalytické fáze – správný odběr do vakuety s fialovým uzávěrem obsahující protisrážlivý roztok, včasný transport do laboratoře a důkladné promíchání vzorku před samotným měřením. Při samotném odběru je nutné nechat důkladně zaschout dezinfekci, protože její přítomnost v krevním vzorku by mohla způsobit hemolýzu krvinek a tím vzorek znehodnotit. Dále je nutné u náběrů s antikoagulanty jemně promísit vzorek několikanásobným otočením dnem vzhůru. V opačném případě by mohlo dojít ke vzniku sraženiny, která je pro hematologické vyšetření nežádoucí. Také výkyvy teplot při transportu mohou způsobit rozpad buněk.

Jako antikoagulační přísady se využívá trojdraselná nebo dvojdraselná sůl kyseliny etylendiaminooctové (K_3EDTA nebo K_2EDTA). Obě tyto substance vytváří rozdílné pH. Zatímco se pH K_3EDTA blíží fyziologické hranici pro pH krve, pH K_2EDTA se pohybuje nad hodnotou 5. Další rozdíly jsou i v rozpustnosti obou solí a fyziologickém působení na krvinky (Goosens et al. 1991).

3.3 Analytická fáze

Samotný příjem vzorku do laboratoře spočívá v pečlivé kontrole identifikace

materiálu spolu se žádankou požadovaných vyšetření. Popis žádanky musí obsahovat nejen jméno, rodné číslo, diagnózu, oddělení požadující vyšetření, pojišťovnu, ale i datum a důležitý je i čas odběru. Ten někdy rozhodne o dalším postupu zpracování neb například pozdní zpracování vzorku na koagulační vyšetření může negativně ovlivnit konečnou hodnotu výsledku. Nesmíme zapomenout i na vizuelní kontrolu vzorku, která nám již může napovědět o stylu náběru či transportu do laboratoře.

Před vlastní analýzou v hematologickém analyzátoru je nutné řádné promíchání vzorku několikerým otočením zkumavky o 180°. Poté jsou vzorky umístěny do speciálních kazet a vloženy do analyzátoru k samotnému měření.

3.3.1 Příprava nátěru k mikroskopické kontrole

Ze vzorků určených k mikroskopické kontrole zhotovíme pomocí tzv. blood dispenseru neboli dávkovače krve a roztěrového sklíčka nátěr zhruba do 2/3 podložního skla. Výhodou těchto krevních aplikátorů je, že nemusíte zkumavku otvírat a tím zamezíte styku s biologickým materiálem. Podložní sklíčka pro digitální mikroskop mají speciálně zkosené rohy nutné k úchopu sklíčka podavečem v automatu.

Po řádném zaschnutí nátěru následuje 5' fixace v metanolu a pak rychlobarvení MGG (May-Grünwald Giemsa). Je to modifikace klasického barvení, ale nátěr je obarven během několika sekund. Po fixaci následuje 5-7x ponoření do roztoku B, což je Eosinové činidlo a poté následuje 7-14x ponoření do roztoku C – Thiazinové barvicí činidlo. Nakonec nátěr řádně opláchneme pod tekoucí vodou a necháme oschnout.

Výsledné barvení jednotlivých buněčných komponent by mělo vypadat asi takto: jádro se barví červenofialově až růžově, bazofilní cytoplazma bledě až tmavě modře, acidofilní cytoplazma sv. červeně až růžově, polychromatofilní cytoplazma šedě až fialově, acidofilní granula oranžově, neutrofilní granula hnědě až tmavě růžově, bazofilní granula tmavě fialově a azurofilní granula purpurově až nachově fialově (Bio-Optika 2008)

3.3.2 Mikroskopické vyhodnocení

Diferenciální rozpočet leukocytů byl proveden na mikroskopu zn. Meiji. Leukocyty byly hodnoceny při zvětšení 1000x. Výsledky zapsány k příslušným pacientům

a pomocí LISu (Laboratorní informační systém) odeslány na oddělení.



Obr.5 Klasický mikroskop zn. Meiji

3.3.3 Digitální zpracování

Krevní nátěry vyhodnocené klasickou mikroskopií, byly také analyzovány digitálním mikroskopem Cella Vision DM96™.

CellaVision® DM96 je automatický systém určený k diagnostickému použití in-vitro. Jedná se o mikroskop ovládaný motorem, který umožňuje během práce plně automatické polohování a zaostření sklíčka. Součástí je vysoce kvalitní barevný digitální fotoaparát, který umožňuje rychlé pořízení snímku s maximální kvalitou.

Jednotka s imerzním olejem automaticky aplikuje kapky imerzního oleje na sklíčko.

Podavač sklíček přesouvá sklíčka ze zásobníku do čtecí zóny a po zpracování sklíčka zpět. Čtečka čárového kódu snímá čárový kód jak sklíčka, tak zásobníku. Do zásobníku lze vložit až 12 sklíček. Počítačový systém obsahuje akviziční a klasifikační software CellaVision® DM.

Systém automaticky vyhledá a prezentuje snímky klasifikovaných buněk na obrazovce počítače. Digitální mikroskop dokáže předběžně vyhodnotit tyto třídy leukocytů: neutrofilů, lymfocytů, monocytů, eosinofilů, bazofilů, tyčků, metamyelocytů, myelocytů, promyelocytů, blasty. Také variantní lymfocyty a plazmatické buňky. Dále vyhodnocuje erytroblasty (NRBC), velké trombocyty či jejich shluky, buňčné stíny a artefakty. Do třídy neidentifikovatelných buněk řadí ty objekty, které digitální

mikroskop vyhodnotil s nízkou hladinou spolehlivosti. Digitální analyzátor umožňuje obsluhu navrhované vyhodnocení diferenciálu potvrdit nebo reklasifikovat. Mimo jiné si uživatel může vytvořit další buněčné třídy jako jsou například velké granulární lymfocyty, prolymfocyty, vlasaté lymfocyty a další.

Systém umožňuje z přehledového snímku na obrazovce analýzu erytrocytů a pomocí funkce zoomu dostatečně studovat morfologii doplněnou přednastavenou semi-kvantitativní klasifikací anomálií. Uživatel může nadefinovat další charakteristiky a v případě potřeby doplnit komentář. Přehledový snímek RBC odpovídá oblasti 8 mikroskopických polí s velkým zvětšením (HPF) (100x objektiv a 22mm okulár). Náhled velkého pole erytrocytů by mohl poskytovat alternativní metodu počítání schistocytů, která je velmi citlivou oblastí morfologie červených krvinek (Surcouf et al. 2009).

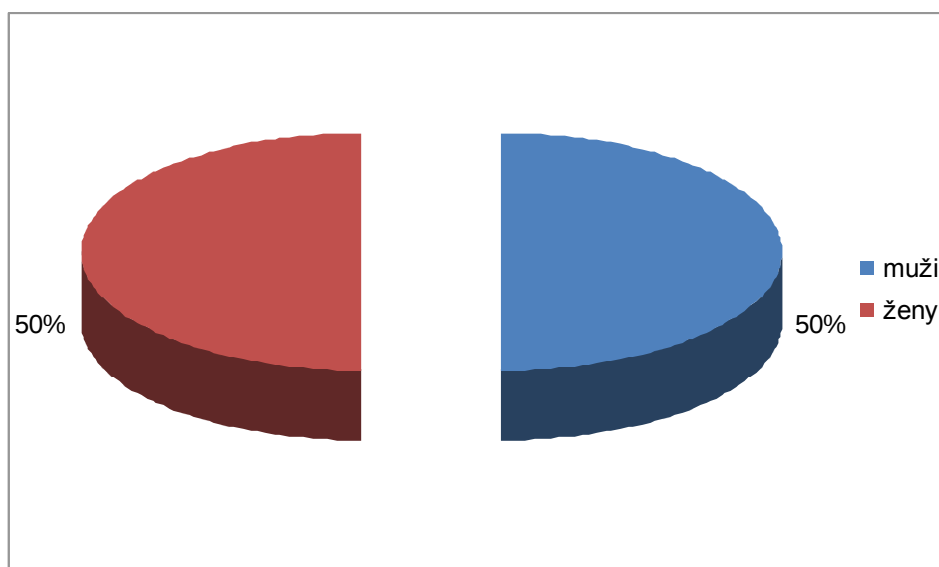
Přednastavené hodnocení morfologie erytrocytů zahrnuje polychromazii, hypochromii, anizocytózu, mikrocytózu, makrocytózu a poikilocytózu. Uživatel může dále stanovit terčovité erytrocyty, schistocyty, drepanocyty, sférocyty, eliptocyty, ovalocyty, slzyčkovité erytrocyty, stomatocyty, akantocyty, echinocyty, bazofilní tečkování, Howell-Jollyho tělíska a další jiné anomálie.

CellaVision Remote Review je další software digitálního systému, který umožňuje vzdáleným uživatelům z jiného místa přístup k analyzovaným sklíčkům a tím se podílet na jejich reklasifikaci (Příručka uživatele 2009).

4. Výsledky

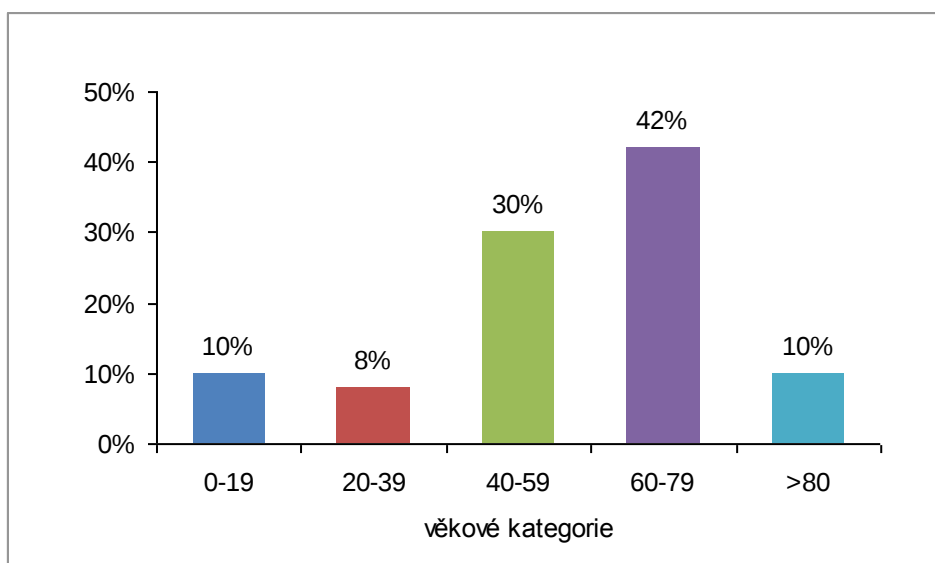
Sledovaný soubor tvořilo celkem 50 pacientů, u kterých byl krevní obraz včetně diferenciálního rozpočtu leukocytů analyzován na hematologickém analyzátoru Coulter LH 55. Po vyhodnocení výsledku bylo nutné pro patologické hodnoty zhotovit krevní nátěr a mikroskopicky zkontrolovat diferenciál leukocytů. Konečné výsledky preklasifikovaných buněk a buněk po korekci pomocí digitálního mikroskopu Cella Vision DM96™ byly porovnány s klasickou mikroskopií tzv. zlatým standardem jako referenční metodou. Zdroje dat jsou v příslušných tabulkách v příloze.

Graf 1. Zastoupení pohlaví



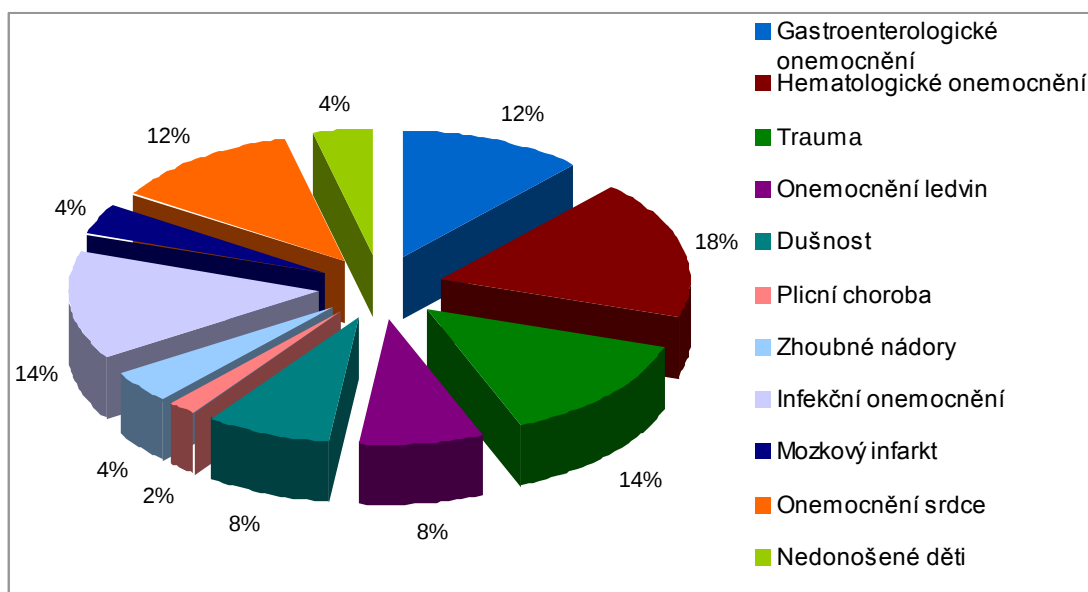
Vzorky pacientů tvořilo 25 žen (50 %) a 25 mužů (50 %).

Graf 2. Věkové zastoupení



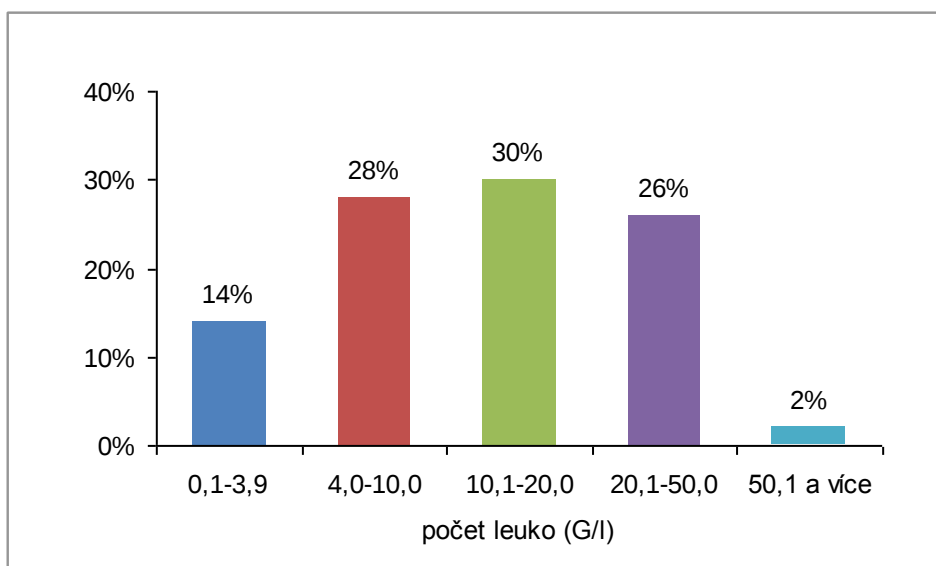
Věkové zastoupení sledovaného souboru vypadalo takto: pacientů do 19 let bylo celkem 5, věkové rozmezí od 20 až do 39 let tvořily 4 pacienti, v rozmezí od 40 do 59 let se nacházelo 15 pacientů, věkové rozmezí od 60 do 79 let bylo zastoupeno 21 pacienty a 5 pacientů bylo staších 80-ti let. Průměrný věk pacientů v souboru dat je necelých 57 let.

Graf 3. Zastoupení skupin diagnóz



V otázce zastoupení diagnóz byli pacienti rozděleny do 11 skupin. 6 pacientů (12 %) mělo gastroenterologické onemocnění, do skupiny traumat patřilo 7 pacientů (14 %), z hematologickým onemocněním bylo 9 pacientů (18 %), 4 pacienti (8 %) byli dušní, 2 pacienti (4 %) měli zhoubný nádor, do skupiny infekčních chorob patřilo 7 pacientů (14 %), mozkový infarkt prodělali 2 pacienti (4 %), nemoce srdce mělo 6 pacientů (12 %), 1 pacient (2 %) měl plicní chorobu, 2 novorozenci (4 %) z neonatologického oddělení patřily do skupiny nedonošených dětí a 4 pacienti (8 %) měli choroby ledvin.

Graf 4. Zastoupení vzorků dle počtu leukocytů



Dle počtu leukocytů byli pacienti zařazeni do 5 skupin. První skupinu tvořilo 7 leukopenických pacientů (14 %), jejichž počet leukocytů se pohyboval v rozmezí $0,1-3,9 \cdot 10^9$ G/l. Ve skupině v rozmezí $4,0-10,0 \cdot 10^9$ G/l se nacházelo 14 pacientů (28 %). Jsou to hodnoty referenční meze v naší laboratoři. 15 pacientů (30 %) tvořilo skupinu v počtu leukocytů $10,1-20,0 \cdot 10^9$ G/l. Do čtvrté skupiny patřilo 13 pacientů (26 %), jejichž počet se pohyboval v rozmezí $20,1-50,0 \cdot 10^9$ G/l leukocytů. Do poslední skupiny patřil pacient (2 %), jehož počet leuko přesahoval hranici $50,1 \cdot 10^9$ G/l leuko. Jednalo se o pacienta s chronickou myelomonocytární leukémií s počtem leukocytů $87,2 \cdot 10^9$ G/l.

4.1 Vyhodnocení diferenciálního rozpočtu leukocytů

Diferenciální rozpočet leukocytů vyhodnocen na klasickém mikroskopu je považován jako tzv. zlatý standard. Po letité praxi na hematologickém oddělení mohou říci, že výsledky analýz týkající se konvenční mikroskopie jsou vyhodnocené dle interních předpisů, zvyků a dlouholeté rutinní zkušenosti a jsou správné.

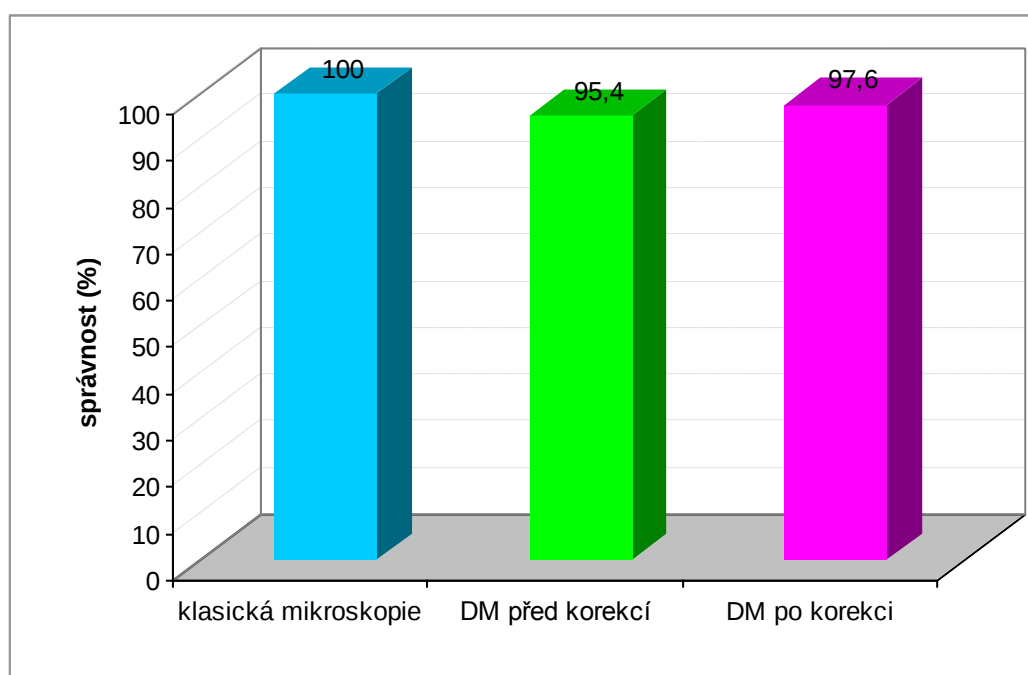
Zdroje dat (v příloze) představují tabulky naměřených hodnot jednotlivých populací leukocytů klasickou mikroskopií, preklasifikací digitálním mikroskopem a výsledné hodnoty po manuální korekci.

Tabulka č.1 zaznamenává průměrné hodnoty chybového skóre jednotlivých základních populací leukocytů.

Tabulka 1

	Průměr – chybové skóre před korekcí	Průměr – chybové skóre po korekci
Neutrofily	12,7	4,9
Lymfocyt	3,1	3,7
Monocyty	4	2,4
Eosinofily	1,2	1
Basofily	1	0,3
Tyče	5,5	2,3
Průměr	4,6	2,4

Graf 5. Vztah správnosti naměřených hodnot leukocytů

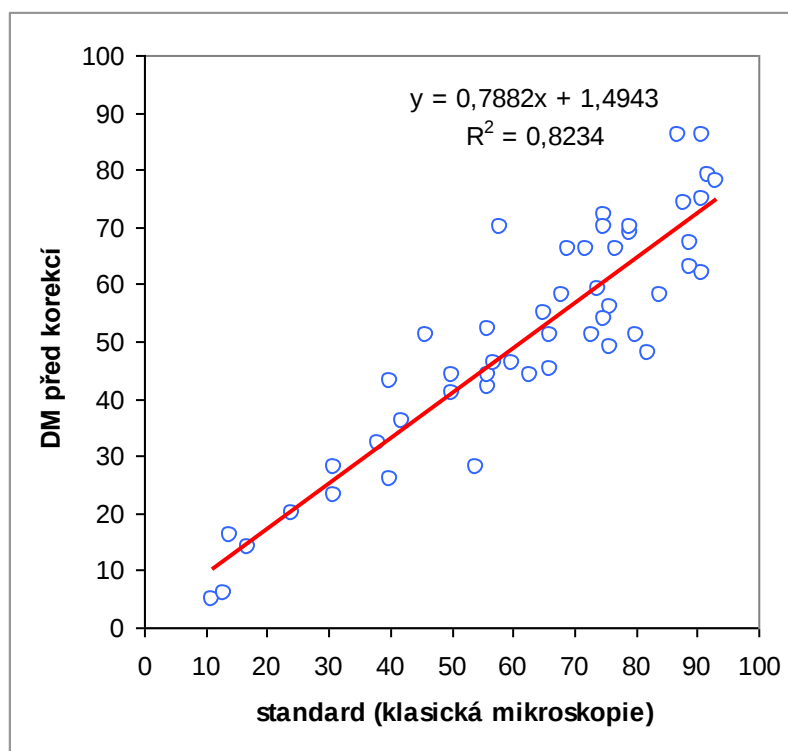


Celkový náhled na analýzu leukocytů nám ukazuje graf č. 5. Klasická mikroskopie zde představuje 100% správnost. Ve sloupci DM před korekcí je vypočtená hodnota správnosti odečtením průměrné absolutní odchylky výsledků digitální analýzy před korekcí od klasické mikroskopie. Konečná hodnota je 95,4 %. Třetí sloupec je vypočten

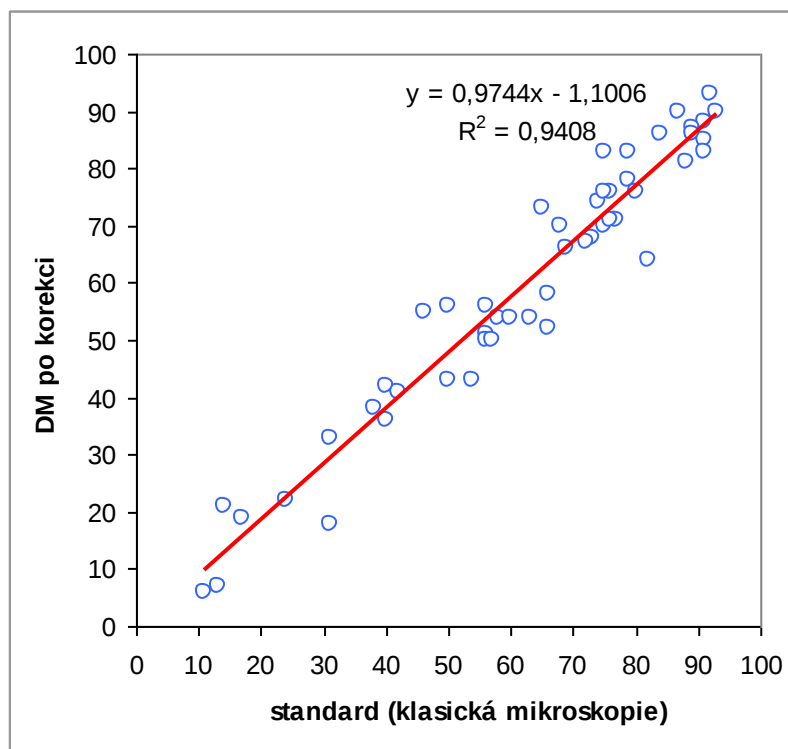
obdobně, ale zaznamenána je průměrná hodnota po manuální korekci. Její výše je 97,6 %. Průměrné hodnoty odchylek ukazuje tabulka 1 (viz výše). Z grafu je patrné, že tato hodnota je srovnatelná s klasickou mikroskopií. Zároveň však říká, že i hodnoty před manuální korekcí jsou uspokojivé.

Pro správnost výsledků byla použita statistická metoda regresní analýzy. Veliké rozdíly korelačních koeficientů preklasifikací na automatickém analyzátoru Cella Vision DM96™ i po manuální korekci vykazují eosinofily a basofily z důvodu nízkého početního zastoupení v nátěrech. Naopak neutrofilní segmenty jsou zastoupeny hojně, avšak korelační koeficient 0,91 vyhodnocený před samotnou korekcí v digitálním mikroskopu není tolik uspokojivý jako koeficient 0,97 po manuální reklasifikaci. Tento vztah lze vidět v grafech č. 6 a 7.

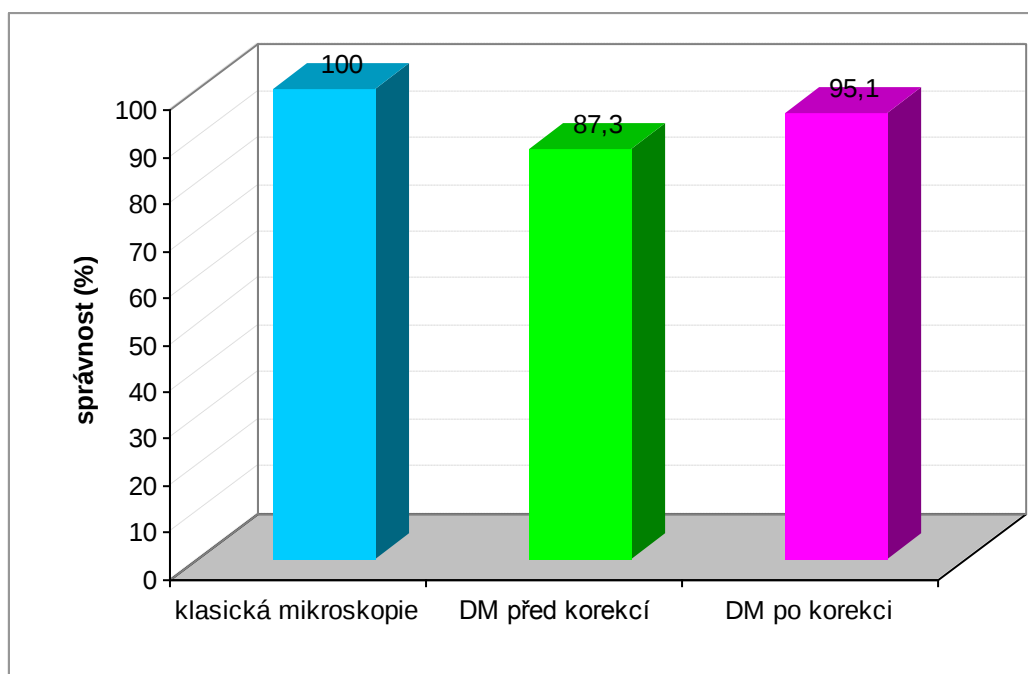
Graf 6. Neutrofilý. Korelační koeficient: 0,91



Graf 7. Neutrofily. Korelační koeficient: 0,97



Graf 8. Vztah správnosti hodnocení neutrofilů

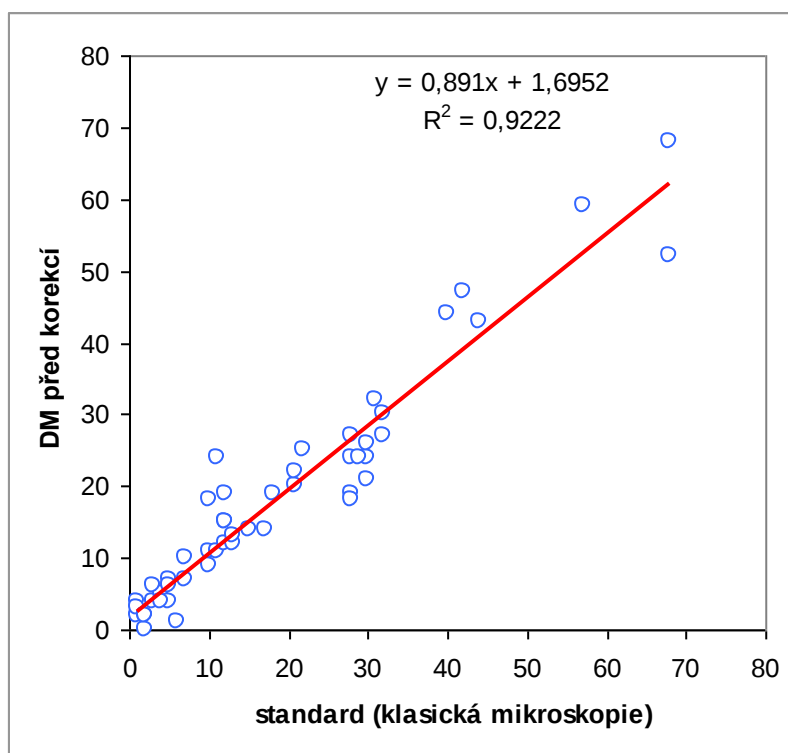


Klasická mikroskopie jako referenční hodnota znamenala 100% správnost.

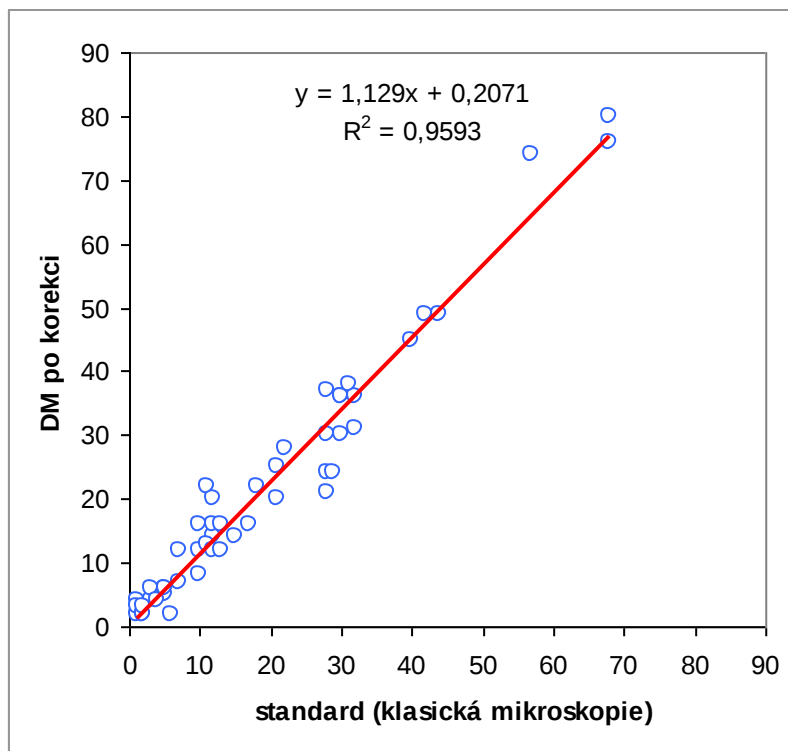
Preklasifikace neutrofilů samotným digitálním mikroskopem činila 12,7 % chybu správného zařazení. Většinou se jednalo o segmenty z hůře čitelnými morfologickými znaky z důvodu přebarveného nátěru. Byly preklasifikovány do artefaktů, v malém množství do tyčí, někdy do populace eosinofilů. Hodnota chyby po manuální korekci 4,9 % je přijatelná a 95,1 % správnost je srovnatelná s klasickou mikroskopií.

Nejmenší rozdíly korelačních koeficientů vykazovala populace lymfocytů. Korelační koeficient lymfocytů preklasifikovaných mikroskopem Cella Vision DM96 0,96 je téměř shodný s korelačním koeficientem lymfocytů po manuální úpravě, který je 0,98. Tyto vztahy jsou zaznamenány v grafech č. 9 a 10.

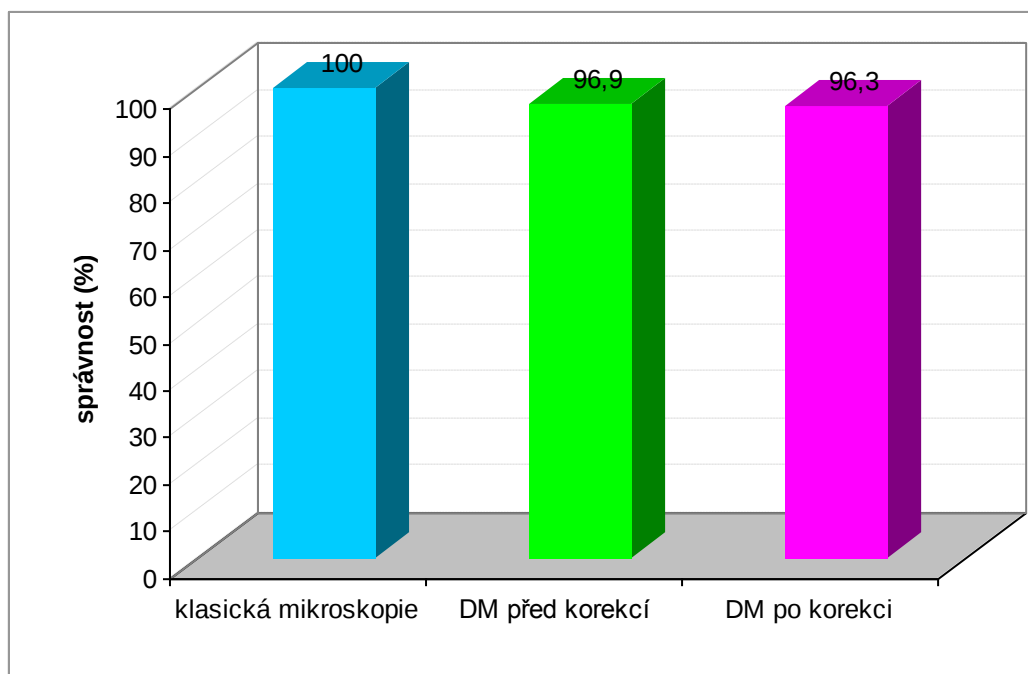
Graf 9. Lymfocyty. Korelační koeficient: 0,96



Graf 10. Lymfocyty. Korelační koeficient: 0,98



Graf 11. Vztah správnosti hodnocení lymfocytů



Z grafu vyplývá, že chyba zařazení lymfocytů před manuální korekcí (3,1 %) byla

menší než po korekci. V ojedinělých případech šlo o buňky patřící do jiných leukocytárních tříd. Buňky označené jako variantní lymfocyty patřily do monocytů. Některé malé lymfocyty, které neměly již cytoplazmu a polorozpadlé jádro, měly být preklasifikovány již do artefaktů. V klasické mikroskopii by se tyto buňky nehodnotily. Chyba po korekci byla 3,7 %. Konečné výsledky správnosti lymfocytů jsou srovnatelné s klasickou mikroskopií jak samotnou preklasifikací digitálního mikroskopu (96,9 %), tak po manuální korekci (96,3 %). Dá se říci, že jsou velmi uspokojivé.

V porovnání korelace monocytů a neutrofilů je rozdíl v případě monocytů menší o 0,05. Ale hodnoty jednotlivých koeficientů jsou nižší než v případě neutrofilů. Korelace monocytů před manuální korekcí je 0,89 a po ní 0,94. Správnost zařazení buněk v porovnání se zlatým standardem je velmi uspokojivá, jak v preklasifikaci buněk mikroskopem Cella Vision (96 %), tak po manuální korekci (97,6 %). Obdobně je tomu v případě vyhodnocení neutrofilních tyčí, kde je správnost zařazení před korekcí 94,5 % a po korekci 97,7 %. Obě tyto hodnoty jsou v přijatelných mezích. Avšak korelační koeficienty tyčí vykazují větší rozdíl. Korelační koeficient před manuální korekcí je 0,78 a po manuální korekci je 0,96. Děje se tak pravděpodobně z důvodu preklasifikací tyčí digitálním mikroskopem mezi populací segmentů. Velkou roli zde hrají i nekvalitně obarvené nátěry, kdy vnitřní komponenty buněk jsou výrazné až přebarvené a nejspíše hůře hodnotitelné.

4.2 Časová náročnost

Digitální mikroskop preklasifikuje v průměru 1 krevní nátěr za necelé 2'30'' Což je přesně 24 vzorků za hodinu. Výhodou je, že v čase analýzy se může uživatel věnovat jiné činnosti. Manuální korekce všech vzorků trvala v průměru 6'55'', takže celková doba vyšetření byla 9'25''.

Klasická mikroskopie trvala 5'10''. Je však důležité si uvědomit, že při klasické mikroskopii hodnotíme 100 buněk a digitální mikroskop byl nastaven na analýzu 250 buněk. Pokud bychom při manuální mikroskopii hodnotili 250 buněk, byl by její výsledný čas 12'56''.

Časový interval byl u standardu měřen od začátku prohlížení až po zadání výsledku

do LISu (laboratorního informačního systému). U digitální morfolgie byl začátek měření spuštěn od první manuální reklasifikace a ukončen po zaslání výsledku do LISu. Velice zajímavou skupinu tvořily leukopenické nátěry jejichž počet leukocytů se pohyboval v rozmezí od 1,6 do $3,5 \cdot 10^9$ G/l. Hodnocení těchto vzorků v klasickém mikroskopu trvalo v průměru 7'55'', kdežto manuální korekce v digitálním mikroskopu zaznamenala přibližně 50% časovou úsporu průměrným zpracováním v čase 4'6''. Naopak pacient s počtem $87,2 \cdot 10^9$ G/l leuko znamenal více než 50% časovou úsporu v klasické mikroskopii v porovnání s časem manuální reklasifikace. Další vztahy jsou zaznamenány v tabulce č. 3.

Tabulka 3

Rozmezí leuko v $\times 10^9$ G/l	Počet pacientů	Průměrný čas klasické mikroskopie	Průměrný čas manuální reklasifikace Cella Vision DM96
0,1-3,9	7	7'55''	4'6''
4,0-10,0	14	4'38''	6'5''
10,1-20,0	15	4'58''	7'30''
20,1-50,0	13	5'6''	7'17''
50,1 a více	1	2'58''	4'35''

5. Diskuze

Soubor dat byl homogenní a odpovídal svým složením běžnému vzorku populace zpracovávané v naší laboratoři.

Odchylka preklasifikovaných vzorků v digitálním mikroskopu se pohybovala do 5 %. Výjimku tvořily neutrofilní segmenty s průměrnou odchylkou 12,6 %. Její hodnota byla neuspokojivá, téměř 3x větší (přesněji 2,74x) než odchylka celkového průměru. Celková průměrná odchylka všech buněčných populací před manuální reklasifikací byla 4,6 %. Neutrofilní tyče s odchylkou 5,5 % byly těsně pod hranicí a ještě přijatelné.

Průměrná odchylka chyby všech zkoumaných populací leukocytů po manuální korekci byla 2,2 %. Její hodnota byla téměř srovnatelná s klasickou mikroskopií. Z výše uvedených odchylek vyplývá, že správnost preklasifikace automaticky byla 95,4 % a po manuální korekci obsluhou 97,6 %. Hodnoty jsou vztažené ke zlatému standardu, jehož správnost je 100 %. Obdobná studie 84 pacientů s hematologickými malignitami ukazuje celkovou přesnost zařazení buněk digitálním mikroskopem 95 % a po manuální reklasifikaci je 98 % (Cornet et al. 2008). V porovnání s naší studií jsou výsledné hodnoty v podstatě stejné, jen počet analyzovaných vzorků byl 50.

Z další studie, ve které bylo zkoumáno 120 pacientů s abnormálními nálezy v krevním nátěru, lze porovnat korelační koeficienty jejich a našich výsledků. Jedná se o korelace mezi preklasifikací samotným digitálním automaticky a klasickou mikroskopií. Korelace udávající studie jsou pro neutrofilie 0,88, lymfocyty 0,94, monocyty 0,67 a tyče 0,69 (Kratz et al. 2005). Korelace našich výsledků jsou pro neutrofilie 0,91, lymfocyty 0,96, monocyty 0,89 a tyče 0,78. Rozdíly mezi neutrofilie a lymfocyty jsou nepatrné, ale hodnoty našich korelací pro monocyty a tyče vykazují lepší výsledky i přesto, že analýza vzorků proběhla přes nestandardně zhotovené a obarvené nátěry.

Z naměřených hodnot vyplývá, že časová náročnost analýzy diferenciálního rozpočtu leukocytů mikroskopem Cella Vision DM96™ byla větší než u klasické mikroskopie. Celkový průměrný čas vyhodnocení digitální morfologie je 9'55'', kde čas stanovení automaticky trval v průměru 2'30'' a čas obsluhy provádějící manuální korekci

byl v průměru 6'55''. Výsledný průměrný čas standardní mikroskopie byl 5'10''.

Významným aspektem, který ovlivňuje výsledky preklasifikace je kvalita zhotovení nátěru a především jeho obarvení. Sledované vzorky pro analýzu diferenciálu leukocytů byly připraveny manuálním způsobem a obarveny za použitím barvicích roztoků MGG Quick Stain. Tato banální metoda nabarvení vyhovuje klasické mikroskopii, ale zcela nevyhovuje digitální. Nátěry byly přebarvené a pravděpodobně hůře hodnotitelné. Z tohoto důvodu obsluha vynaložila delší čas na manuální reklasifikaci leukocytů zařazených do neodpovídajících buněčných tříd.

Po ukončení studie jsem měla možnost pracovat s krevními nátěry zhotovenými v nátěrové a barvicím atomatu, který připraví vzorky se standardní úrovní. Tloušťku nátěru zhotoví na základě hodnoty hematokritu. Po zkušenosti jsem zjistili, že u takto připravených nátěrů je časová náročnost podstatně menší.

Pro skupinu leukopenických vzorků ($0,1-3,9 \cdot 10^9 \text{ G/l}$) je časově výhodnější manuální reklasifikace diferenciálního rozpočtu v digitálním atomatu než vyhodnocení klasickým mikroskopem. Zanedbáme-li čas samotné preklasifikace digitálního mikroskopu, který je v průměru 2'30'' na jeden nátěr, tak časová úspora manuální reklasifikace těchto vzorků je téměř 50 %, než u nátěrů s normálními či většími počty leukocytů. I přes vliv barvení, byly u těchto vzorků leukocyty správně zařazeny do buněčných populací a nebyla nutná větší manuální korekce, tudíž i naměřený čas byl kratší.

Studie ukazují, že leukopenické vzorky pod $2,0 \cdot 10^9 \text{ G/l}$ leukocytů klasifikuje digitální morfologie z více než 200 buněk a v poměrně krátkém čase. Na rozdíl od konvenční mikroskopie, kdy trvá velice dlouho dohledat 100 leukocytů a je nutné použít více nátěrů. Celkové úspory času se odhadují na 30 % klasické mikroskopie (Cornet et al. 2008, Ceelie et al. 2007, Briggs et al. 2009). Kvalita obrázků buněk leukopenických vzorků je srovnatelná se vzorky s počtem leukocytů v referenčním rozmezí (Yu et al. 2012). Naopak dle našich výsledků je kvalita lepší.

Pracovní náročnost v obsluze digitálního mikroskopu není složitá. Spíše je nenáročná, ale vyžaduje určitou znalost morfologie jednotlivých buněčných populací. Po zkušenosti vím, že nejlépe digitální mikroskop klasifikuje buňky morfologicky

„jednoduché“ jako jsou neutrofily, klasické lymfocyty, monocyty, eosinofily, basofily, ale také prekurzory neutrofilní řady (Kratz et al. 2005). Problém nastává při záchytu blastů. V případě akutní myeloidní leukemie (AML) je schopen detekovat blasty a identifikovat je jako myeloblasty a dále vyhodnotit další vývojové buňky myeloidní řady. V případě akutní lymfoblastické leukemie (B-ALL) není schopen blasty klasifikovat jako lymfoblasty. V této souvislosti má smysl spoléhat na konvenční mikroskopii (Cornet et al. 2008). Navíc kvalitou digitálního obrazu je někdy velmi obtížné rozlišit strukturu jaderného chromatinu, a tak zajistit správnou klasifikaci blastů (Bilard et al. 2010).

Mimo jiné digitální mikroskop umožňuje diferenciální počet jaderných buněk v tělních tekutinách (např. mozkomíšní mok, pleurální tekutina apod.). Morfologická analýza je přizpůsobena vzorkům zpracovaným metodou cytospinu a klasifikuje buňky do 5 tříd (neutrofily, lymfocyty, eosinofily, makrofágy a ostatní). Cella Vision DM96™ se osvědčil jako spolehlivý a efektivní, přispívající k celkovému zlepšení kvality v oblasti nejen morfologické analýzy vzorků periferní krve, ale i jiných tělních tekutin (Riedl et al. 2010).

Finanční náročnost vychází z časové, respektive z času obsluhy provádějící manuální reklasifikaci digitálně vyhodnoceného nátěru. Ta je dražší o časový rozdíl mezi klasikou a digitálním mikroskopem. Vezmeme-li v úvahu ještě cenu přístroje, tak finanční zatíženost mnohonásobně stoupne. Přesto jsou tu významné aspekty, pro které je digitální morfologie pořizována. Patří sem archivace výsledků a jejich zpětná dohledatelnost včetně všech snímků buněk, možnost tzv. konzultace na dálku, ukládání snímků do elektronických lékařských záznamů. Digitální systém je také dobrým pomocníkem v edukaci pracovníků a stážistů. Zavedení tohoto morfologického systému do laboratoře by bylo i přes finanční náročnost přínosné.

6. Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo ve zkušebním provozu porovnat diferenciální rozpočet leukocytů analyzovaný digitálním mikroskopem Cella Vision DM96™ s klasickou mikroskopií jako zlatým standardem. Důraz jsem kladla na porovnání správnosti měření. Dále jsem vyhodnotila pracovní, časovou a finanční náročnost. Zpracovala jsem 50 vzorků, připravila krevní nátěry pro vyhodnocení v klasickém mikroskopu a zároveň v digitálním automatu. Sledovala jsem časovou zatíženost obou metod včetně času manuální korekce. Výsledky jsem zanesla do tabulek a grafů. Tím byl cíl mé práce splněn.

Hypotéza, že výsledky diferenciálního rozpočtu leukocytů vyhodnocené digitálním systémem Cella Vision DM96™ jsou neuspokojivé, se potvrdila, zejména kvůli výrazným odchylkám neutrofilů. Vyhodnocení ostatních leukocytárních populací bylo uspokojivé.

Výsledné hodnoty diferenciálu leukocytů po manuální reklasifikaci jsou srovnatelné s klasickou mikroskopií, tím byla potvrzena druhá hypotéza.

Časová náročnost digitální morfologie je větší než u klasické mikroskopie, tím třetí hypotéza nebyla potvrzena. Pravděpodobným vlivem, který významně ovlivnil výsledky bylo manuální zhotovení a barvení nátěrů. Tím nebyly zcela dodrženy podmínky doporučeného postupu uvedeného v příloženém manuálu, které jsou nutné pro optimální analýzu.

Měření analýz ukázalo, že pro leukopenické vzorky bylo časově výhodnější stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů na digitálním mikroskopu Cella Vision DM96™. Pro skupiny vzorků s větším počtem leukocytů byla časově výhodnější klasická mikroskopie. Tím byla potvrzena i čtvrtá hypotéza.

7. Seznam použitých zdrojů

- ADAM, Z., KREJČÍ, M., VORLÍČEK J. et al. *Hematologie – přehled maligních nemocí*. Praha: Grada 2008, s. 198.
- BARTŮŇKOVÁ, J., ŠEDIVÁ, A. *Imunologie – minimum pro praxi*. Praha: Triton 1999, s. 38.
- BECKMAN COULTER. Systém pro buněčnou analýzu UniCel DxH 800 Coulter: Návod k použití. 2012.
- BIO-OPTIKA. Návod k použití: MGG Quick stain. Milano, 2008.
- BRIGGS, C., HARRISON, P., MACHIN, S.J. *Continuing developments with the automated platelet count*. Int J Lab Hematol 2007; 29:77-91.
- BOUDAL, P. *UniCel® DxH800*. In Vitro Diagnostika 2010; 16:4-7.
- BRIGGS, C., LONGAIR, I., SLAVIK, M., THWAITE, K., MILLS, R., THAVARAJA, V., FOSTER A., ROMANIN D , MACHIN, SJ. *Can automated blood film analysis replace the manual differential? An evaluation of the CellaVision DM96 automated image analysis system*. Int J Lab Hematol 2009; 31:48-60.
- BILLARD, M., LAINE, E., ARMOOGUM, P., ALBERTI, C., FENNETAU, O., DA COSTA, L. *Evaluation of the CellaVision™ DM automated microscope in pediatrics*. Int J Lab Hematol 2010; 32:530-538.
- CELLA VISION AB. *Průručka uživatele: Cella Vision DM96*. Lund, 2010.
- CEELIE, H., DINKELAAR, RB., GELDER, W. *Examination of peripheral blood films using automated microscopy : evaluation of Diffmaster Octavia and CellaVision DM96*. J Clin Pathol 2007; 60:72-79.
- CORNET, E., PEROL, JP., TROUSSARD, X. *Performance evaluation and relevance of the CellaVision™ DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases*. Int J Lab Hematol 2008; 30:536-42.
- DONNER, L. *Klinická hematologie*. Praha: Avicenum 1985, s. 9.

- GENTILHOMME, O., TREILLE-RITOUET, D., BRYON, P.-A. *Cytologie Hématologique. Les cellules normales. Coloratio au May-Grünwald Giemsa RAL*. Réactifs R.A.L. 1989.
- GOOSENS, W., WAN DUPPEN, V., VERWILGHEN, R.J. *K₂ and K₃EDTA: the anticoagulant of choice in routine haematology?* Clin Lab Haematol 1991; 13:291-295.
- HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. Praha: Triton 2009, s. 151.
- JURÁŇOVÁ, J., FABER, E., INDRÁK, K. *Automatická digitální morfologie – analýza krevního nátěru a tělních tekutin*. Zdravotnické noviny – Příloha: Lékařské listy 2010; 4:3.
- KRAT, Z.A., BENGTSSON, H.I., CASEY, J.E., KEEFE, J.M., BEATRICE, G.H., GRZYBEK, D.Y., LEWANDROWSKI, K.B., VAN COTT, E.M. *Performance evaluation of the CellaVision DM96 system: WBC differentials by automated digital image analysis supported by an artificial neural network*. Am J Clin Pathol 2005; 124:770-81.
- PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Buňka a krvetvorba. Český Těšín: Finidr 2002, s. 147.
- PECKA, M. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Fyziologie a patofyziologie krevní buňky. Český Těšín: Finidr 2006.
- PECKA, M. *Přehled laboratorní hematologie II*. Bílá krevní řada. Krevní destička. Praha: Galén 1996, s. 19.
- PECKA, M., BLÁHA, M., FÁTOROVÁ, I. et al. *Praktická hematologie. Laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art, s.r.o 2010.
- PENKA, M., BULÍKOVÁ, A., MATÝŠKOVÁ, A. et al. *Neonkologická hematologie*. Praha: Grada Publishing, a.s. 2009, s. 19-22.
- PENKA, M., TESAŘOVÁ, E., JANKŮ, L. et al. *Hematologie a transfuzní lékařství II. Transfuzní lékařství*. Praha: Grada Publishing, a.s. 2012, s. 132-133.

- PENKA, M.,TESAŘOVÁ, E., BLATNÝ, J. et al. *Hematologie a transfúzní lékařství I.* Hematologie. Praha:Grada Publishing,a.s. 2011, s. 3-24.
- RIEDL J.A., DINKELAAR R.B., van GELDER W. *Automated morphological analysis of cells in body fluids by the digital microscopy system DM96.* J Clin Pathol. 2010; 63:538-43.
- SAKALOVÁ, A., BÁTOROVÁ, A., MISTRÍK, M. et al. *Klinická hematológia.* Martin: Osveta 2010, s. 30-31.
- SOP KO1. *Oddělení klinické hematologie.* Nemocnice České Budějovice, a.s. 2007.
- SURCOUF, C., DELAUNE, D., SAMSON, T., FOISSAUD, V. *Automated cell recognition in hematology: CellaVision DM96 TM systém.* Annales de Biologie Clinique. 2009; 67:419-424.
- WARREN, G. et al. *Optical technology in blood cell counting.* Sysmex J Int 1999; 9:21-30.
- YU H., OK C.Y., HESSE A., NORDELL P., CONNOR D., SJOSTEDT E., PECHET L., SNYDER L.M. *Evaluation of an Automated Digital Imaging System, Nextslide Digital Review Network, for Examination of Peripheral Blood Smears.* Archives of Pathology & Laboratory Medicine 2012; 136:660-667.

8. Klíčová slova

Leukocyty

Krevní nátěr

Diferenciální rozpočet leukocytů

Digitální mikroskop

Korelační koeficient

Key words

Leukocytes

Blood smear

Differential leucocyte count

Digital microscope

Correlation coefficient

9. Přílohy

Tabulka 4. Neutrofily

	mikroskopie %	DM – před korekcí %	chyba skóre	DM – po korekci %	chyba skóre
1	68	58	10	70	2
2	74	59	15	74	0
3	77	66	11	71	3
4	38	32	6	38	0
5	91	75	16	88	3
6	58	70	12	54	4
7	11	5	6	6	5
8	13	6	7	7	6
9	56	42	14	51	5
10	66	45	21	52	14
11	87	86	1	90	3
12	91	86	6	85	6
13	88	74	14	81	7
14	73	51	22	68	5
15	31	23	8	18	13
16	42	36	6	41	1
17	66	51	15	58	8
18	79	69	10	78	1
19	91	62	29	83	8
20	84	58	26	86	2
21	40	26	14	36	4
22	40	43	3	42	2
23	89	67	22	87	2
24	76	56	20	76	0
25	50	41	9	43	7
26	69	66	3	66	3
27	82	48	34	64	18
28	46	51	5	55	9
29	79	70	9	83	4
30	75	54	21	70	5
31	63	44	19	54	9
32	24	20	4	22	2
33	72	66	8	67	5
34	54	28	26	43	11
35	75	72	3	83	8
36	60	46	14	54	6
37	50	44	6	56	6
38	75	70	5	76	1
39	92	79	13	93	1
40	56	52	4	56	0
41	65	55	10	73	8
42	76	49	27	71	5
43	17	14	3	19	2
44	56	44	12	50	6
45	93	78	15	90	3
46	80	51	29	76	4
47	14	16	2	21	7
48	89	63	26	86	3
49	31	28	3	33	2
50	57	46	11	50	7
průměr			12,7		4,9

Tabulka 5. Lymfocyty

	mikroskopie %	DM – před korekcí %	chyba skóre	DM – po korekci %	chyba skóre
1	15	14	1	14	1
2	21	20	1	20	1
3	10	11	1	12	2
4	21	22	1	25	4
5	1	2	1	2	1
6	12	15	3	14	2
7	57	59	2	74	17
8	68	68	0	80	12
9	30	21	9	36	5
10	28	27	1	37	9
11	3	4	1	4	1
12	1	4	3	4	3
13	7	10	3	12	5
14	12	19	7	20	8
15	68	52	16	76	8
16	30	24	6	36	6
17	22	25	3	28	6
18	11	11	0	13	2
19	1	3	2	3	2
20	2	2	0	2	0
21	17	14	3	16	1
22	28	19	9	21	7
23	4	5	1	5	1
24	10	9	1	8	2
25	40	44	4	45	5
26	12	12	0	12	0
27	11	24	13	22	11
28	28	24	4	24	4
29	7	7	0	7	0
30	3	6	3	6	3
31	12	15	3	16	4
32	42	47	5	49	7
33	18	19	1	22	4
34	2	0	2	2	0
35	5	4	1	6	1
36	30	26	4	30	0
37	29	24	5	24	5
38	13	12	1	12	1
39	2	2	0	3	1
40	32	27	5	31	1
41	6	1	5	2	4
42	5	7	2	5	0
43	13	13	0	16	3
44	32	30	2	36	4
45	4	4	0	4	0
46	10	18	8	16	6
47	44	43	1	49	5
48	5	6	1	6	1
49	28	18	10	30	2
50	31	32	1	38	7
průměr			3,1		3,7

Tabulka 6. Monocyty

	mikroskopie %	DM – před korekcí %	chyba skóre	DM – po korekci %	chyba skóre
1	5	9	4	8	3
2	4	5	1	5	1
3	6	9	3	6	0
4	28	28	0	26	2
5	4	7	3	2	2
6	3	8	5	3	0
7	25	17	8	16	9
8	14	9	5	8	6
9	7	14	7	8	1
10	5	7	2	7	2
11	6	2	4	3	3
12	7	6	1	6	1
13	3	4	1	1	2
14	2	16	14	3	1
15	1	9	8	4	3
16	18	18	0	14	4
17	0	5	5	3	3
18	4	3	1	2	2
19	6	13	7	7	1
20	1	6	5	3	2
21	8	18	10	9	1
22	7	9	2	8	1
23	0	5	5	2	2
24	3	9	6	3	0
25	6	4	2	4	2
26	6	14	8	14	8
27	6	12	6	9	3
28	10	8	2	9	1
29	5	8	3	8	3
30	3	3	0	3	0
31	3	3	0	2	1
32	25	27	2	26	1
33	6	9	3	9	3
34	3	9	6	3	0
35	11	8	3	8	3
36	2	5	3	4	2
37	4	9	5	8	4
38	6	7	1	7	1
39	0	1	1	0	0
40	4	8	4	7	3
41	2	3	1	2	0
42	2	12	10	4	2
43	56	51	5	51	5
44	6	8	2	8	2
45	0	4	4	3	3
46	4	6	2	5	1
47	37	24	13	21	16
48	2	4	2	3	1
49	14	16	2	14	0
50	10	9	1	7	3
průměr			4,0		2,4

Tabulka 7. Tyče

	mikroskopie %	DM – před korekcí %	chyba skóre	DM – po korekci %	chyba skóre
1	6	14	8	5	1
2	1	8	7	0	1
3	2	4	2	4	2
4	3	7	4	2	1
5	2	14	12	6	4
6	25	2	23	29	4
7	2	3	1	2	0
8	0	1	1	0	0
9	5	9	4	1	4
10	0	8	8	2	2
11	0	2	2	3	3
12	1	4	3	5	4
13	1	9	8	4	3
14	6	5	1	3	3
15	0	0	0	0	0
16	5	7	2	3	2
17	6	10	4	7	1
18	6	13	7	6	0
19	2	11	9	7	5
20	6	12	6	6	0
21	32	27	5	39	7
22	25	26	1	23	2
23	4	16	12	0	4
24	1	15	14	2	1
25	0	1	1	0	0
26	1	3	2	3	2
27	1	4	3	3	2
28	7	5	2	4	3
29	7	9	2	2	5
30	12	28	16	12	0
31	20	34	14	27	7
32	4	2	2	1	3
33	1	0	1	0	1
34	41	45	4	46	5
35	3	7	4	1	2
36	5	9	4	4	1
37	3	11	8	2	1
38	2	3	1	2	0
39	6	14	12	4	2
40	2	1	1	0	2
41	24	36	12	23	1
42	15	12	3	21	6
43	4	5	1	1	3
44	4	6	2	1	3
45	3	8	5	2	1
46	6	12	6	2	4
47	2	6	4	2	0
48	2	12	10	3	1
49	11	5	6	8	3
50	0	4	4	1	1
průměr			5,5		2,3

Tabulka 8. Eosinofily

	mikroskopie %	DM – před korekcí %	chyba skóre	DM – po korekci %	chyba skóre
1	5	0	5	1	4
2	0	2	2	0	0
3	0	0	0	0	0
4	2	2	0	3	1
5	0	1	0	1	1
6	0	0	0	0	0
7	5	2	3	2	3
8	5	5	0	5	0
9	0	3	3	2	2
10	1	2	1	1	0
11	0	3	3	0	0
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	3	3	3	3
16	3	3	0	2	1
17	1	1	0	0	1
18	0	0	0	0	0
19	0	2	2	0	0
20	6	3	3	3	3
21	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0
23	1	2	1	2	1
24	2	2	0	2	0
25	4	4	0	4	0
26	1	0	1	0	0
27	0	4	4	2	2
28	3	1	2	1	2
29	0	0	0	0	0
30	3	1	2	1	2
31	0	1	1	1	1
32	1	2	1	2	1
33	0	1	1	1	1
34	0	0	0	0	0
35	5	0	5	0	5
36	1	4	3	4	3
37	11	8	3	8	3
38	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0
40	4	4	0	4	0
41	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0
43	1	1	0	1	0
44	2	3	1	3	1
45	0	0	0	0	0
46	0	1	1	1	1
47	2	5	3	5	3
48	1	1	0	0	1
49	0	1	1	1	1
50	0	5	5	5	5
průměr			1,2		1,0

Tabulka 9. Basofily

	mikroskopie %	DM – před korekcí %	chyba skóre	DM – po korekci %	chyba skóre
1	0	1	1	1	1
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	2	2	0	0
8	0	0	0	0	0
9	2	2	0	2	0
10	0	0	0	1	1
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	2	2	1	1
16	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	2	2	0	0
20	0	2	2	0	0
21	0	1	1	0	0
22	0	1	1	0	0
23	2	2	0	1	1
24	0	1	1	0	0
25	0	1	1	1	1
26	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0
28	0	1	1	1	1
29	0	1	1	0	0
30	0	1	1	0	0
31	0	0	0	0	0
32	2	0	2	0	2
33	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0
35	1	1	0	0	1
36	0	2	2	0	0
37	1	0	1	0	1
38	0	2	2	0	0
39	0	0	0	0	0
40	0	2	2	0	0
41	0	0	0	0	0
42	0	2	2	0	0
43	0	3	3	0	0
44	0	2	2	1	1
45	0	1	1	0	0
46	0	3	3	0	0
47	0	2	2	2	2
48	0	4	4	0	0
49	1	9	8	1	0
50	2	2	0	1	1
průměr			1		0,3