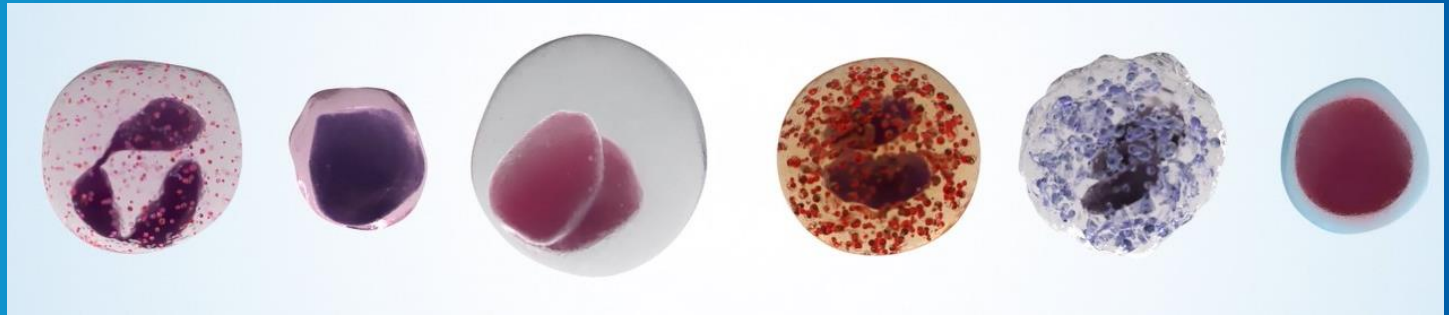


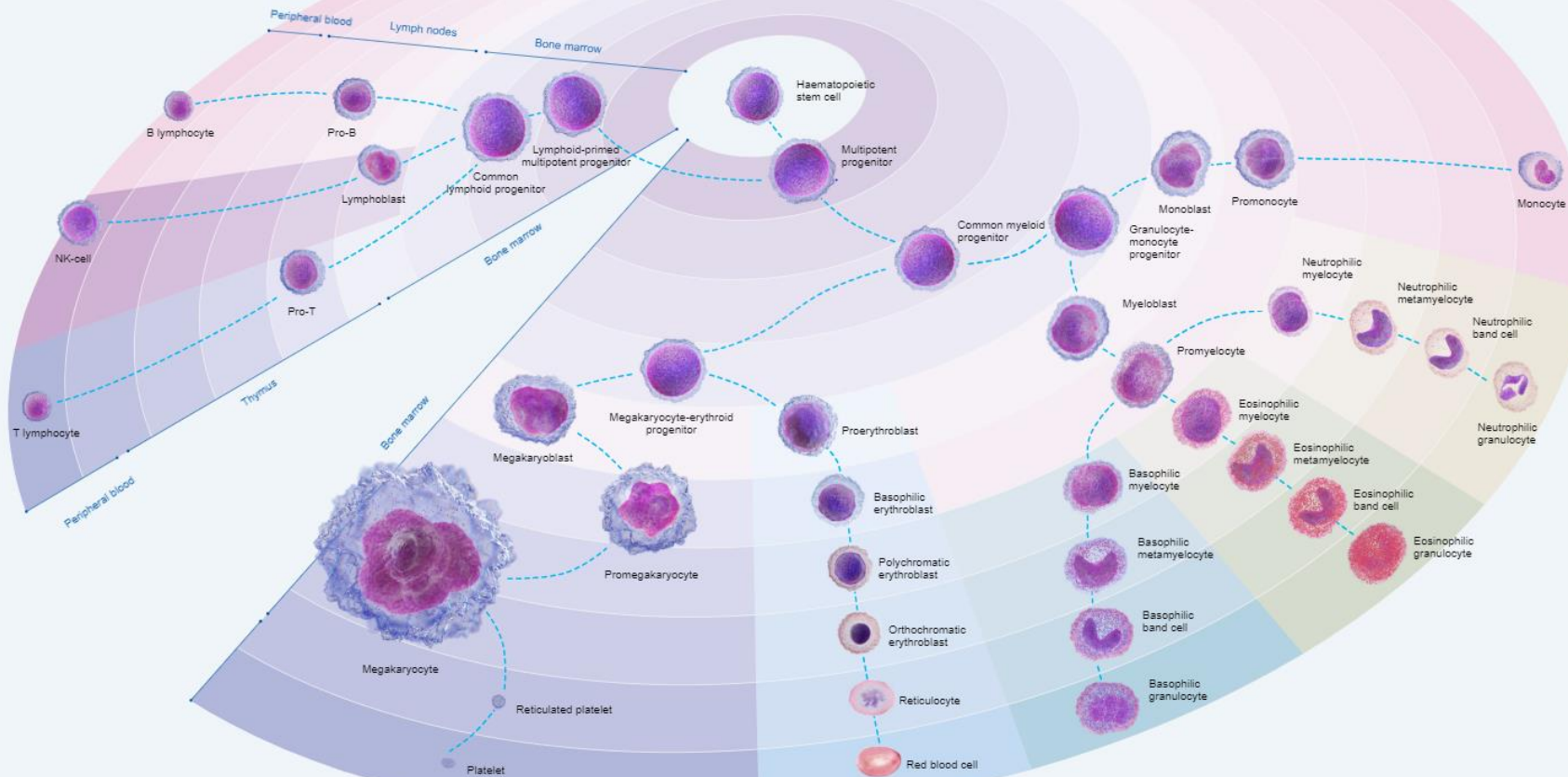
Principy vyšetřování parametrů KO

Soňa Vytisková, Šárka Pospíšilová

MBKH081p Klinická hematologie - přednáška

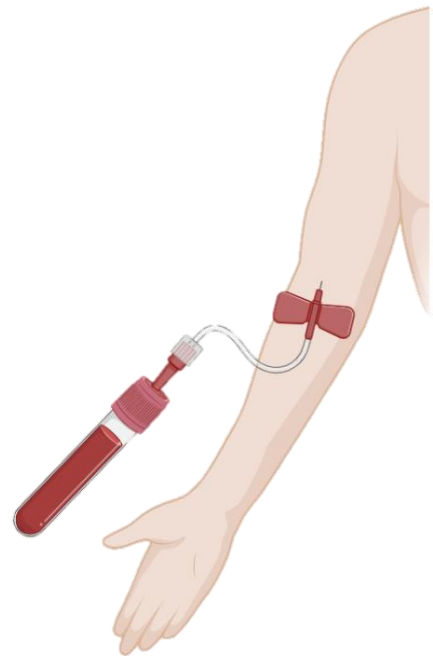


Hematopoéza



Krevní obraz

- Jedno ze základních vyšetření pro diagnostiku a sledování léčby řady onemocnění
- Jedno z nejvíce indikovaných laboratorních vyšetření napříč všemi odbornostmi
- Krevní obraz (KO) je komplexní soubor výsledků, které spolu úzce souvisí
- Analýza se provádí na hematologických analyzátorech
- Vyšetření se provádí z nesrážlivé periferní krve, jako protisrážlivé činidlo se do odběrových zkumavek používá standardně K_3EDTA , K_2EDTA nebo Na_2EDTA



Historie automatizované analýzy krevních buněk

Wallace H. Coulter (1913-1998)

- Impedanční princip počítání částic (**patent 1953**)
- American Society of Hematology uděluje od r. 2007 cenu Wallace H. Coultera za celoživotní přínos v hematologii



Wallace H. Coulter

1913-1998

Mr. Coulter was a prolific inventor and entrepreneur best known for developing the Coulter Principle — a technology used to count and size cells or particles as they flow through an aperture. The Coulter Principle led to major breakthroughs in science, medicine, and industry. Its first application, the Coulter Counter, provided the first high-throughput, standardized method to count different types of blood cells, revolutionizing the medical community's ability to screen for diseases through a simple blood test. The use of the Coulter Principle also modernized industry by establishing the reference method for quality control and standardization of particles used in paint, ceramics, toners, chocolate, beer, and even the purity of rocket fuel.

[Home - Wallace H. Coulter \(whcf.org\)](http://whcf.org)

[Coulter Counter-Model A | Smithsonian Institution \(si.edu\)](http://si.edu)

[Wallace H. Coulter Award for Lifetime Achievement in Hematology - Hematology.org](http://Hematology.org)

Historie automatizované analýzy krevních buněk

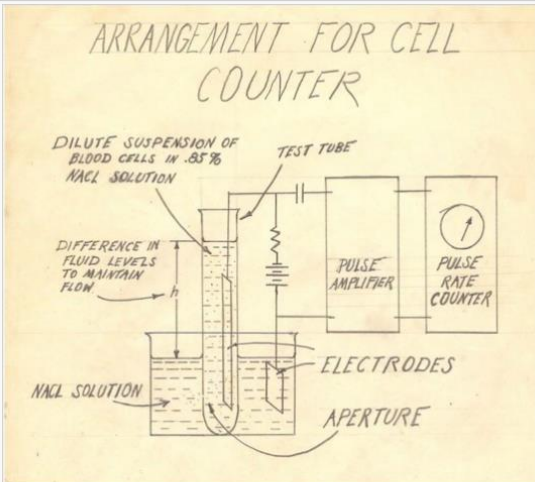


Figure 4.1. Third page of the ANL Proposal.^[117] This sketch is an accurate summary of the preferred embodiment (Figure 7) in Wallace's U.S. Patent 2,656,508 on the Coulter Principle. A blood sample was diluted in 0.85% saline (NaCl) solution, and the cellular suspension was poured into a test tube in which Gutilla had made a pinpoint aperture near its lower end. The filled tube was then stood upright in a container of saline solution enclosing an electrode, and a second electrode was placed in the tube. As the difference in liquid heights (the head) caused the cells, indicated by dots, to be carried out of the tube through the aperture, their relative non-conductivity caused a transient decrease in the electrical current flowing between the electrodes from the voltage source, indicated by the connected electrical symbols for a resistance (zig-zag line) and battery. A capacitor, indicated by the two parallel lines beneath "TEST TUBE," coupled the transient resistance change due to a cell's transiting the aperture to a pulse amplifier while blocking direct current from the battery. The amplified pulses triggered a pulse rate counter, which determined the number per second of cells transiting the aperture.

Oct. 20, 1953 W. H. COULTER 2,656,508
 MEANS FOR COUNTING PARTICLES SUSPENDED IN A FLUID
 Filed Aug. 27, 1949 2 Sheets-Sheet 2

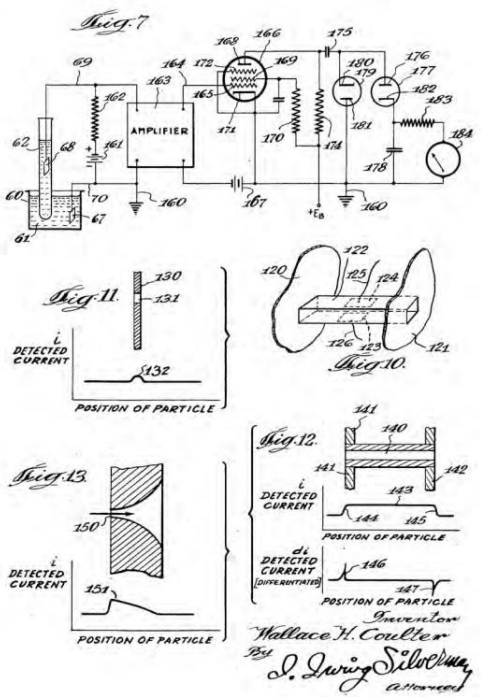
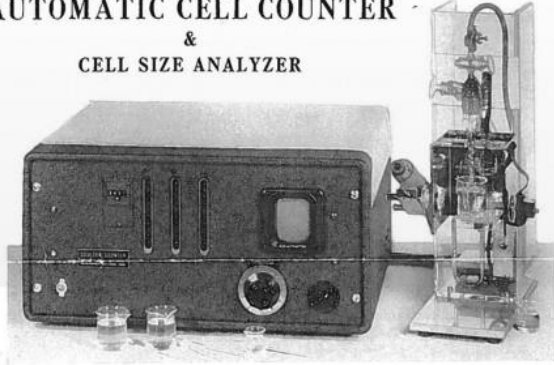


Figure 5.4. The first trade-show exhibition of the Model A counter.^[207] According to the Sun-Times legend, Ms. "Virginia Mackay of the University of Chicago demonstrates a Coulter automatic blood cell counter and cell-size analyzer at Conrad Hilton Hotel."

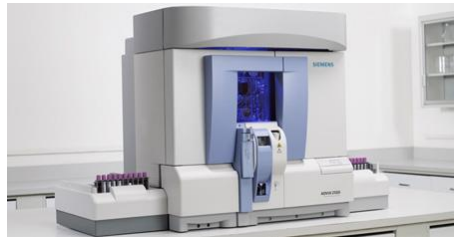
AUTOMATIC CELL COUNTER & CELL SIZE ANALYZER



The new COULTER COUNTER provides *accuracy, speed and reliability* not approached by any other method.

- Counts in excess of 6,000 individual cells per second.
- Each count is equivalent, in number of cells counted, to the average of 100 chamber counts to reduce the sampling error by a factor of approximately 10 times.
- Unit takes its own precisely metered sample from a sample beaker to eliminate counting chamber errors.
- An oscilloscope display provides immediate information on relative cell size and relative size distribution.
- Threshold level control provides a means of rapidly obtaining complete cell size distribution data.
- Oscilloscope display providing a check of circuit performance coupled with simplicity of mechanical design affords highest reliability.
- Sensitivity extends to particles smaller than 2 microns.
- Sample capacity exceeds 100 counts per hour on a production basis.

Coulter Electronics 5227 N. Kenmore Chicago 40, Illinois



Hematologické analyzátory

- Každý má svá jedinečná specifika
- Z měření získáváme informace o:
 - Počtu krevních buněk (kvantitativní analýza)
 - Velikosti, tvaru a složení buňky (kvalitativní analýza)
- Principy měření mohou být na jednotlivých analyzátorech různě kombinovány
- Různé kombinace pak umožňují různě přesnou kvantitativní i kvalitativní analýzu všech prošliých buněčných elementů
- Umožňují analýzu tělních tekutin

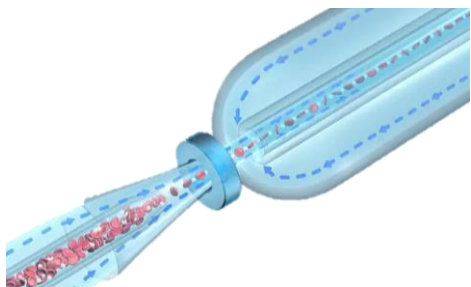
Používané reagensie

- Analýza nesrážlivé periférnej krvi
- Odběr krvi do solí EDTA (K, Na)
- Ředící roztoky (*isotonické roztoky*):
 - **Impedanční analýza**
vodivý roztok + nevodivá buňka
 - **Optická analýza**
opticky inaktivní roztok + opticky aktivní buňka
- Lyzační roztoky: hemolýza erytrocytů a dle typu analyzátoru může být i destrukce jiných krevních elementů
- Barvicí roztoky: barvení obsahu buňky (granula/enzymy, DNA, RNA)
- Čistící roztoky: čištění měřicího systému
- Firemní kontrolní materiál: simuluje plnou krev, kontrola funkčnosti přístroje

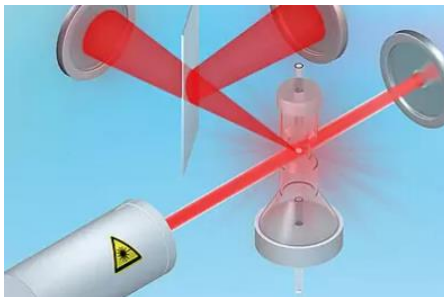


Základní principy měření

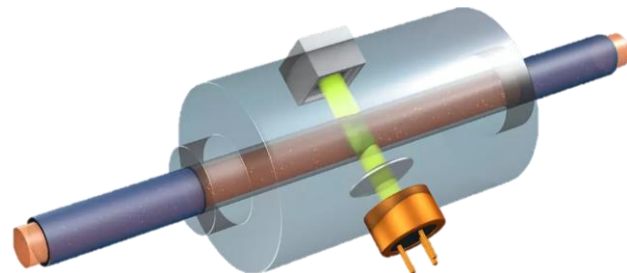
Impedanční analýza



Optická analýza



Absorbční spektrofotometrie



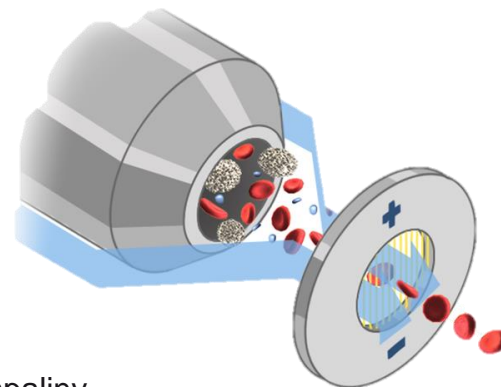
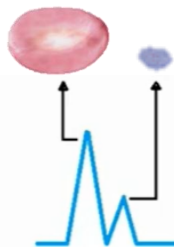
Impedanční analýza

Je založena na měření změny elektrického odporu (impedance) při průchodu jednotlivých buněk v průtokové měřící kytvě mezi dvěma elektrodami.

Mezi elektrodami je standardní vodivost, při průchodu buňky aperturou se vodivost naruší/změní (vodivý roztok + nevodivá buňka) → **impedanční impuls** (odpor).

Četnost impulsu → počet buněk

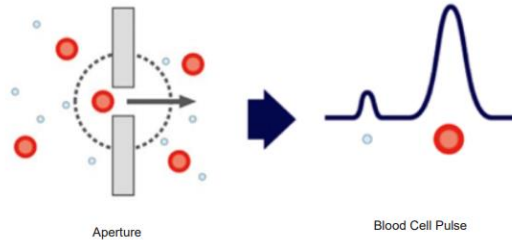
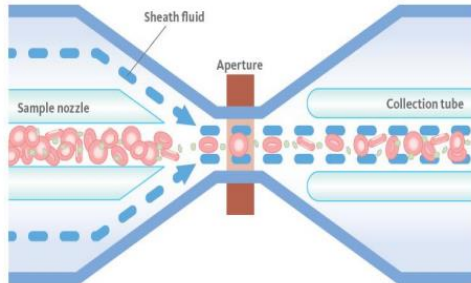
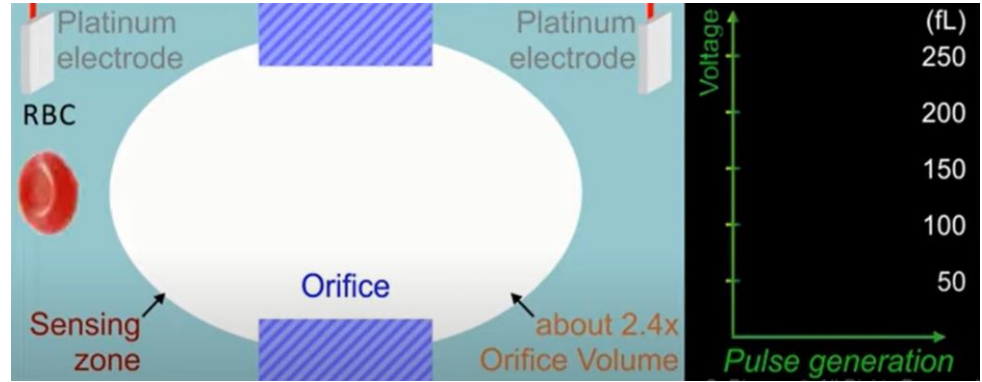
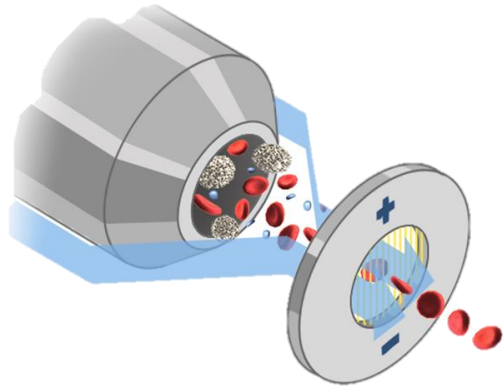
Velikost impulsu → velikost buňky



Využívá se hydrodynamická fokusace: unášení jednotlivých buněk proudem kapaliny.

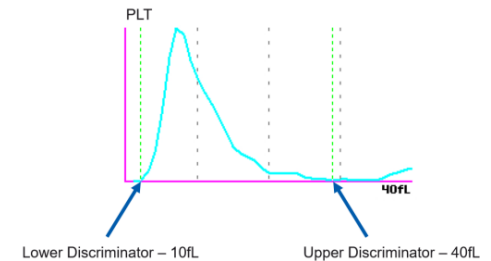
Měření může být doplněno například vysokofrekvenční analýzou: na stejnosměrné elektrické pole → superponováno vysokofrekvenční elektrické pole → pronikne cytoplazmou → pak se změní vysokofrekvenční vodivost buňky → ta odpovídá její fyzikálněchemické struktuře (kvalitativní analýza buňky).

Impedanční analýza




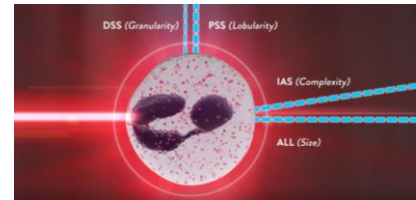
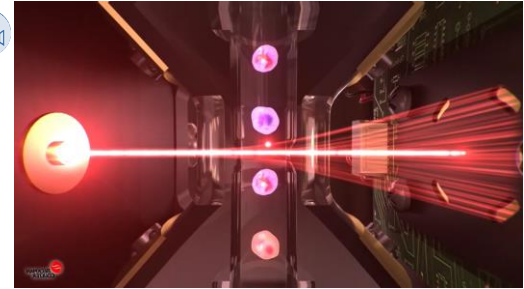
PLT Histogram

Normal PLT Histogram



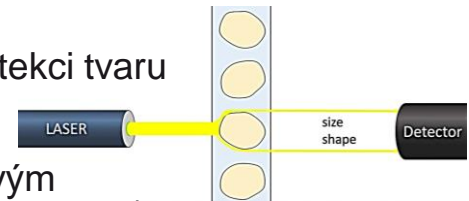
Optická analýza

- Využívá se **průtoková cytometrie** (spolu s hydrodynamickou fokusací) 
- Opticky inaktivní roztok + opticky aktivní buňka
- Každá buňka je ozářena monochromatickým laserovým paprskem
- Analyzuje se samostatně každá buňka v suspenzi
- Po interakci buňky s paprskem se provádí analýza



Detekuje se světlo:

- Prošlé (detekce paprsku ve směru 0° poskytuje informace o počtu a velikosti jednotlivých prošlých buněk)
- Odražené a depolarizované (detekce paprsku v různých úhlech slouží k detekci tvaru a velikosti buňky, jádra a granularity cytoplazmy)
- Fluorescence: barvení buňky speciálními barvami → ozáření buňky laserovým paprskem → detekce emitovaného světla o vyšší vlnové délce (detekce DNA, RNA)



Absorbční spektrofotometrie

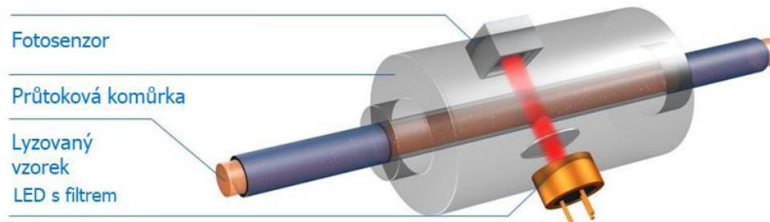
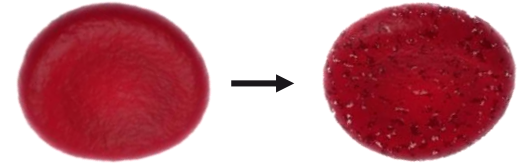
Metoda slouží ke stanovování množství hemoglobinu ve vzorku po předchozí lyzaci erytrocytů

Referenční metoda:

Fe^{2+} oxidován na Fe^{3+} , reakce s kyanidovými ionty
→ kyanmethemoglobinový komplex

Absorbční maximum při 540 nm (přímo úměrné koncentraci hemoglobinu)

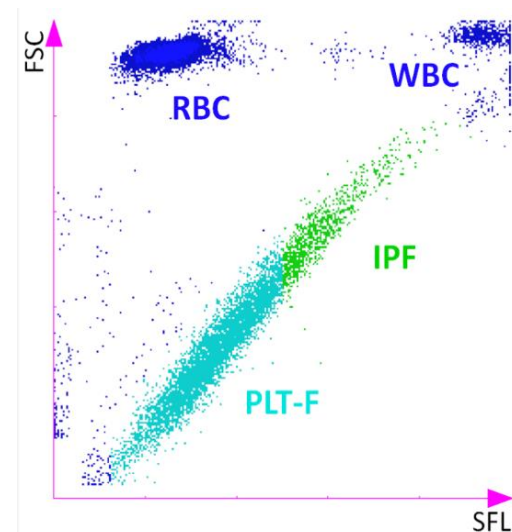
Dnes již bezkyanidové metody - použití sloučenin s podobnými vlastnostmi



Fluorescenční princip

- ❑ Nejnovější princip
 - ❑ fluorescenční obarvení RNA pro analýzu retikulocytů či trombocytů
 - ❑ fluorescenční obarvení DNA pro analýzu normoblastů
- ❑ V současnosti považován za nejpřesnější rutinní metodu stanovení PLT
- ❑ Lze odlišit nezralé frakce PLT (=IPF, rP) – dif dg trombocytopenií
- ❑ Příklady fluorescenčních barev:

Analyzátor	Měřicí kanál (barva)
Sysmex XE	RET kanál (polymethin)
Sysmex XN, XR	PLT-F kanál (phenoxazine)
Abbott CD Sapphire / Alinity H	RET kanál (CD4K530)
Mindray BC	RET kanál (cyanine)



Imunofluorescence (průtoková cytometrie)

- Tento princip využíval jediný hematologický analyzátor, který už není na trhu Abbott CD Sapphire
- Abbott CD Sapphire kombinoval impedanční, optický a imunofluorescenční princip měření
- Klasická průtoková cytometrie v současnosti slouží jako referenční metoda stanovení počtu trombocytů (CD41+CD61)



Table 3: CD designations and primary specificities of monoclonal antibodies for typical applications in routine haematology

CD Number	Primary Specificities
CD2	Thymocytes, mature T-cells and NK-cells
CD3	Thymocytes and mature T-cells
CD4	T-Helper cells and monocytes (weak expression)
CD8	T-Suppressor cells and some NK cells (weak expression)
CD13	Mature and immature myeloid cells (neutrophils and monocytes)
CD14	Monocytes (strong expression) and neutrophils (weak expression)
CD16	Neutrophils and NK-cells (subset)
CD19	B-cells
CD22	B-cells
CD33	Mature and immature myeloid cells (neutrophils and monocytes)
CD34	Haemopoietic progenitor cells
CD45	All haemopoietic cells
CD56	NK-cells (most)
CD61	Platelet Glycoprotein IIIa
CD64	Monocytes (high expression) and neutrophils (variable expression)
CD235a	Red blood cell Glycophorin A
HLA-DR (Ia)	Monocytes, immature neutrophils, B-cells and activated T-cells

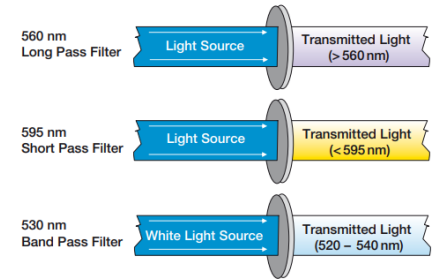
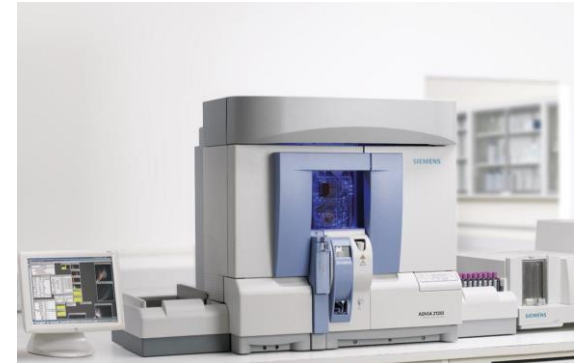
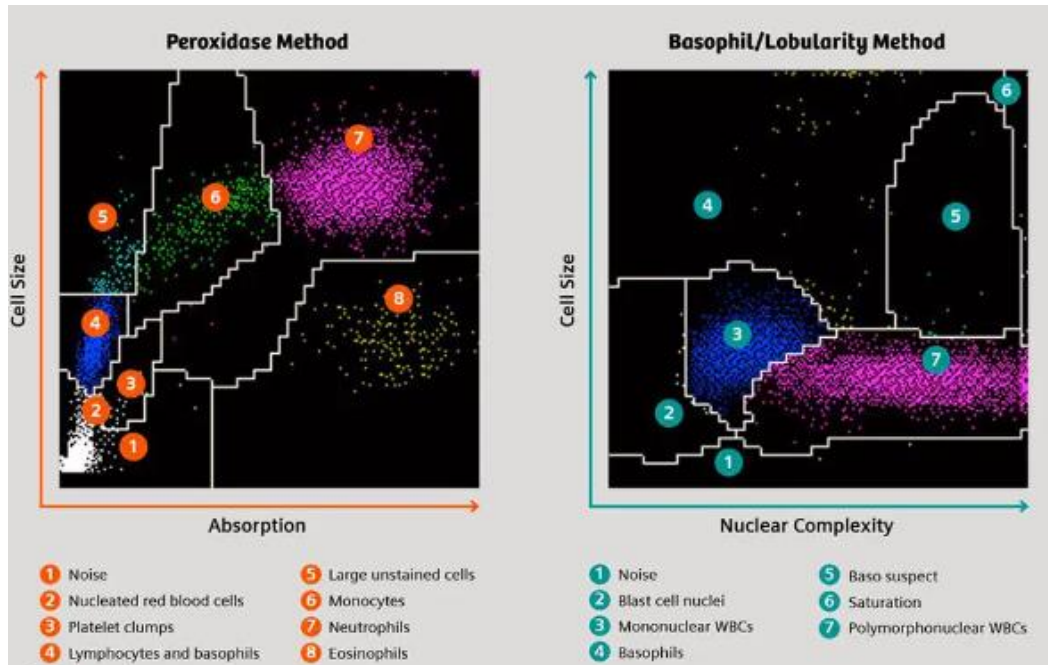


Figure 1: Characteristics of filter types commonly used in flow cytometry. For the filtering of CD-Sapphire excitation and emission wavelengths, FL1, FL2 and FL3 Band Pass filters are used.

Peroxidázový kanál (Advia)

- Barvení enzymu myeloperoxidázy v jaderných buňkách využívají analyzátoři Advia
- Jaderné buňky se dělí dle velikosti a intenzity myeloperoxidázy



Možnosti vyšetření

Kombinace vyšetření:

KO + (NRBC)

(KO = WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, PLT, MCH, MCHC, RDW, MPV)

KO + (NRBC)+ DIF

(DIF = NEU, LYM, MONO, EO, BASO, IG)

KO + (NRBC)+ RET

KO + (NRBC)+ DIF + RET

KO + (NRBC)+ DIF + (PLT-F)

KO + (NRBC)+ DIF + RET + (CD znaky)

Způsob vyšetření:

Manuální (otevřený, uzavřený)

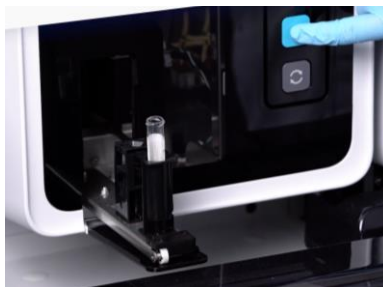
Ve stojánku (uzavřený)

Výkon:

KO 100 - 150 vzorků/hod

KO + DIF 75 - 119 vzorků/hod

Objem vyšetřovaného vzorku: od 80 μ L do 300 μ L vzorku



Hematologické analyzátoři – technické parametry

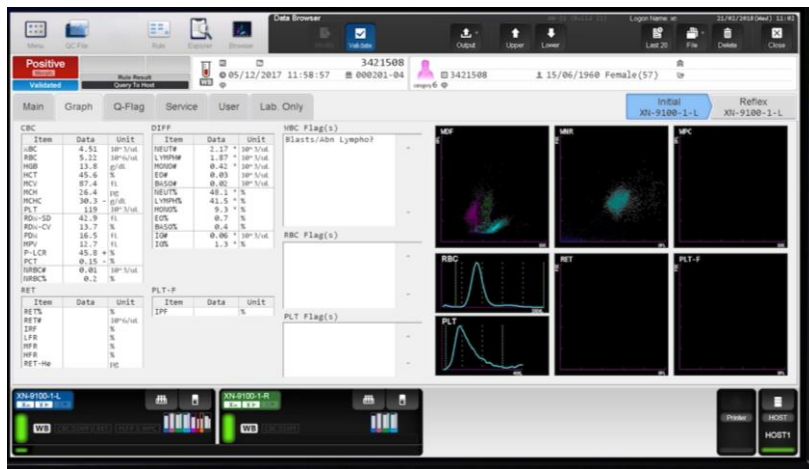
Databáze - 10 000 výsledků včetně grafiky, různé možnosti tiskových výstupů

Kontrola kvality - součást SW analyzátoři, volitelné možnosti grafických výstupů

Linearita - vysoká přesnost měřených parametrů i v extrémních hodnotách

Reagenta - rozdílný počet druhů a uložení

Načítání vzorků a reagenta pomocí čárových kódů



Hematologické analyzátořy – shrnutí

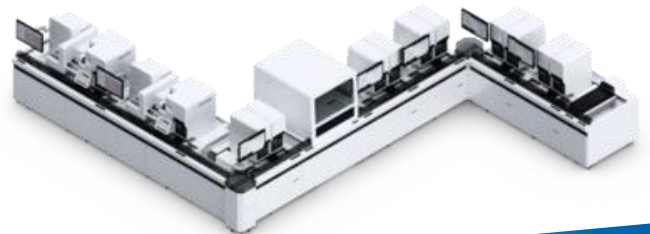
Výrazné zlepšení analytických možností analyzátořů (množství a kvalita vyšetřovaných parametrů)

Vysoký uživatelský komfort

Automatizace

Potřeba technicky schopného a vzdělaného personálu

Pozor na omezení způsobená interferencemi léků nebo uvolněných působků s krevními buňkami nebo některými substancemi používanými při stanovení



Hematologická linka (Sysmex XN)

Digitální
morfologie

Barvicí
automat

Nátěrový
automat

2x hematologický
analýzátor



Parametry krevního obrazu



Parametry KO – referenční intervaly (dospělí)

Parametr	zkratka	rozsah	jednotka
Leukocyty	WBC/LEU	4,0 - 10,0	x10⁹/l
Neutrofil	NEU#	2,0 - 7,0	x10 ⁹ /l
Lymfocyt	LY#	0,8 - 4,0	x10 ⁹ /l
Monocyt	MONO#	0,08 - 1,2	x10 ⁹ /l
Eozinofil	EO#	0 - 0,5	x10 ⁹ /l
Bazofil	BAZO#	0 - 0,2	x10 ⁹ /l
Nezralé granulocyty	IG#	0,00 - 0,06	x10 ⁹ /l
Neutrofil	NEU	45 - 70	%
Lymfocyt	LY	20 - 45	%
Monocyt	MONO	2 - 12	%
Eozinofil	EO	0 - 5	%
Bazofil	BAZO	0 - 2	%
Nezralé granulocyty	IG	0,00 - 0,6	%
Trombocyty	PLT/TROMBO	150 - 400	x10⁹/l
Nezralé trombocyty	IPF	1,1 - 6,1	%
Střední objem PLT	MPV	7,8 - 12,8	fl
Destičkový hematokrit	PCT	1,2 - 3,5	ml/l
Distribuční šířka PLT	PDW	12 - 18	%

Parametr	zkratka	rozsah	jednotka
Eryocyty	RBC/ERY	Ž 3,8 - 5,2 M 4,0 - 5,8	x10¹²/l
Hemoglobin	HBG	Ž 120 - 160 M 135 - 175	g/l
Hematokrit	HCT	Ž 0,35 - 0,47 M 0,40 - 0,50	
Střední objem ERY	MCV	82 - 98	fl
Střední obsah HGB	MCH	28 - 34	pg
Střední konc. HGB	MCHC	320 - 360	g/l
Distribuční šířka ERY	RDW	10,0 - 15,2	%CV
Retikulocyty	RETl#	25 - 100	x10 ⁹ /l
Retikulocyty	RETI	0,5 - 2,5	%
Retikulocytární HGB	RET-HE	28 - 35	pg
Nezralá frakce RETI	IRF	0 - 0,3	
Normoblasty	NRBC#	0 - 0,015	x10 ⁹ /l
Normoblasty	NRBC	0 - 0,1	/100 LEU

Ukázka výsledku KO v analyzátoru

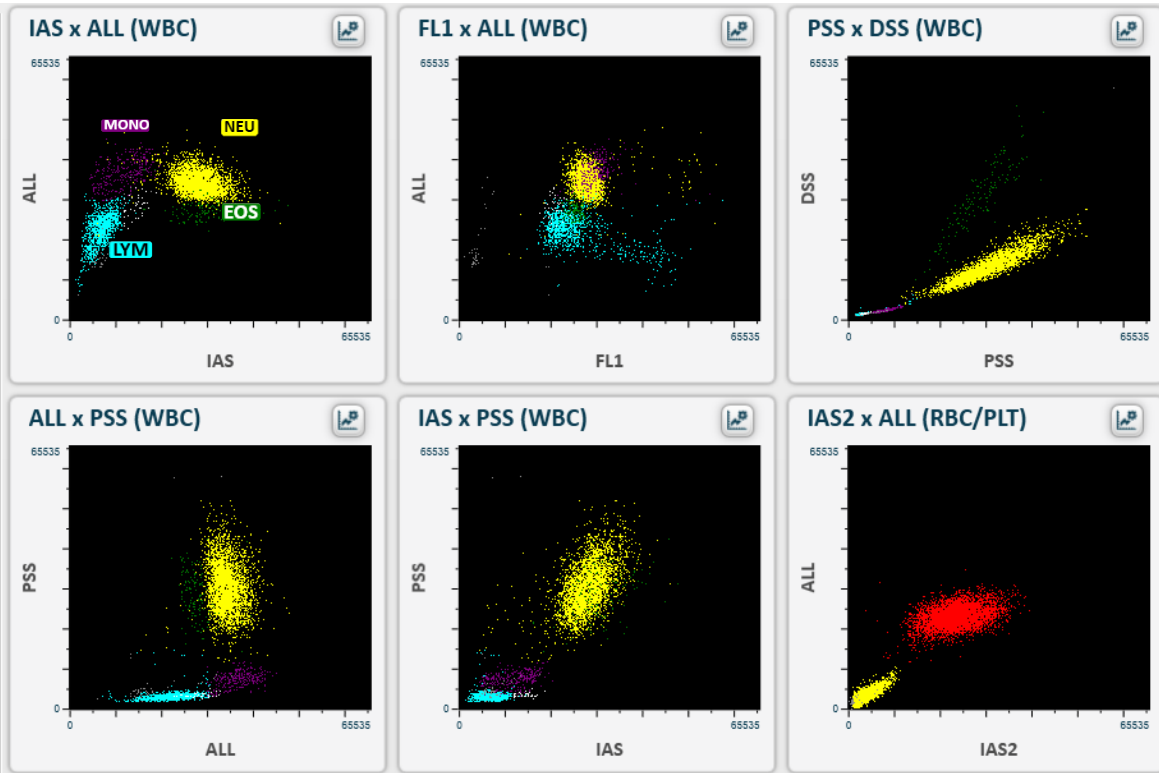
Numerical Results

WBC	9.61	10e9/L		
NEU	6.53	10e9/L	67.9	%
LYM	2.10	10e9/L	21.9	%
MONO	.574	10e9/L	5.97	%
EOS	.275	10e9/L	2.86	%
BASO	.063	10e9/L	.652	%
IG	.065	10e9/L	.672	%
NRBC	0.00	10e9/L		
NR/W	0.00			

RBC	4.52	10e12/L		
HGB	141.	g/L		
HCT	.419	L/L		
MCV	92.7	fL		
MCH	31.2	pg		
MCHC	336.	g/L		
RDW	12.6	%CV		

RETIC	97.1	10e9/L	2.15	%
IRF	0.13			
MCHr	32.1	pg		

PLT	269.	10e9/L		
MPV	10.4	fL		
%rP	1.69	%		



Hodnocení krevního obrazu

Numerické výsledky

Grafické výsledky (scattergramy, histogramy)

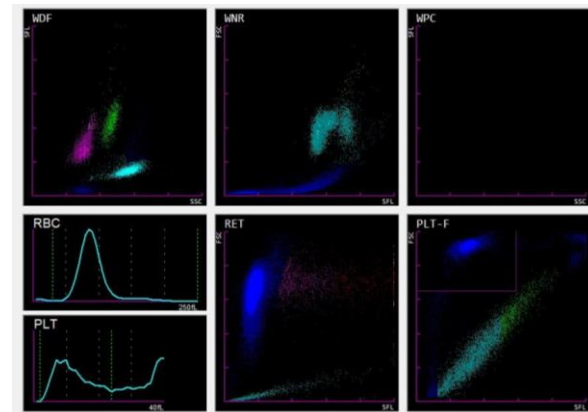
Hlášení analyzátoru

- Patologická hlášení
- Výsledky jsou mimo referenční rozmezí
- Interference
- Případná kontrola mikroskopem

Hodnotíme v souvislosti:

- Vyšetření poprvé / opakovaně
- Typ diagnózy
- Pacient: ambulantní, lůžkové odd., JIP...
- Vyšetření rutinní, statimové, speciální, vitální indikace
- Náhlé změny v KO
- Správný odběr, typ vyšetřovaného materiálu

CBC			DIFF			WBC Flag(s)
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit	IG Present
WBC	7.69	10 ⁹ /L	NEUT#	4.04	10 ⁹ /L	
RBC	4.17	10 ¹² /L	LYMPH#	2.20	10 ⁹ /L	
HGB	120	g/L	MONO#	1.38 +	10 ⁹ /L	
HCT	0.359	L/L	EOP	0.01	10 ⁹ /L	
MCV	86.1	fL	BASO#	0.06	10 ⁹ /L	
MCH	28.8	pg	NEUT%	52.6	%	
MCHC	334	g/L	LYMPH%	28.6	%	
PLT &F	63	10 ⁹ /L	MONO%	17.9 +	%	
RDW-SD	49.3	fL	EON	0.1	%	
RDW-CV	15.9 +	%	BASO%	0.8	%	
PDW	----	fL	IG#	0.20	10 ⁹ /L	
MPV	----	fL	IG%	2.6 +	%	
P-LCR	----	%				
PCT	----	%				
NRBC#	0.00	10 ⁹ /L				
NRBC%	0.0	/100WBC				
RET			PLT-F			WBC Flag(s)
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit	IG Present
RET%	2.56 +	%	IPF	18.7 +	%	
RET#	106.8 +	10 ⁹ /L				
IRF	33.5 +	%				
LFR	66.5	%				
MFR	18.4	%				
HFR	15.1	%				
RET-He	31.4	pg				



Počet červených krvinek (RBC = Red Blood Cells)

Hodnota vyjadřuje počet červených krvinek (erytrocytů) v 1 litru krve

Nejaderné buňky, za fyziologických podmínek „přežívají“ v periferní krvi cca 120 dní

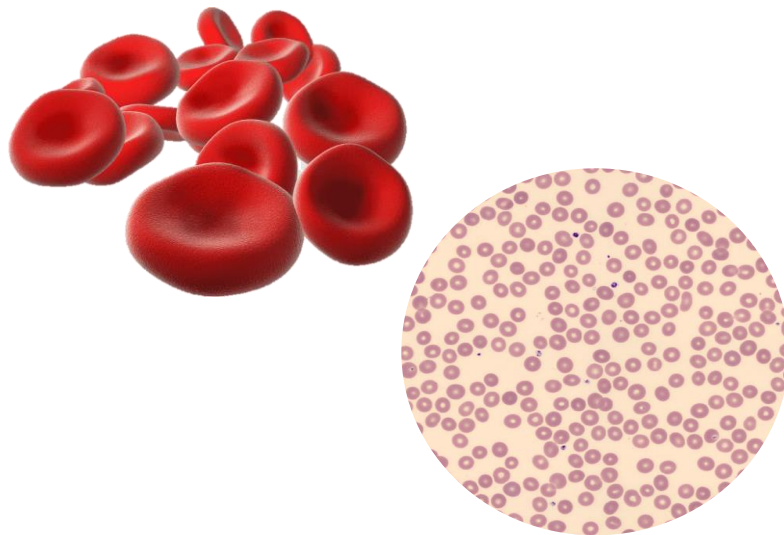
Jednotka: **$10^{12}/L$**

➤ Fyziologické hodnoty:

- Muži: $4,0 - 5,8 \times 10^{12}/L$
- Ženy: $3,8 - 5,2 \times 10^{12}/L$
- Novorozenci: vyšší hodnoty než dospělí
- Hodnoty se liší u různých věkových kategorií

➤ Zvýšený počet → „erytrocytóza“

➤ Snížený počet → „erytopenie“



Nejčastěji se stanovuje impedanční metodou, při optickém principu stanovení nejprve nutná sférizace erytrocytů!

Hemoglobin (HGB)

Koncentrace hemoglobinu v **g/L** (stanovení spektrofotometricky po lýze erytrocytů)

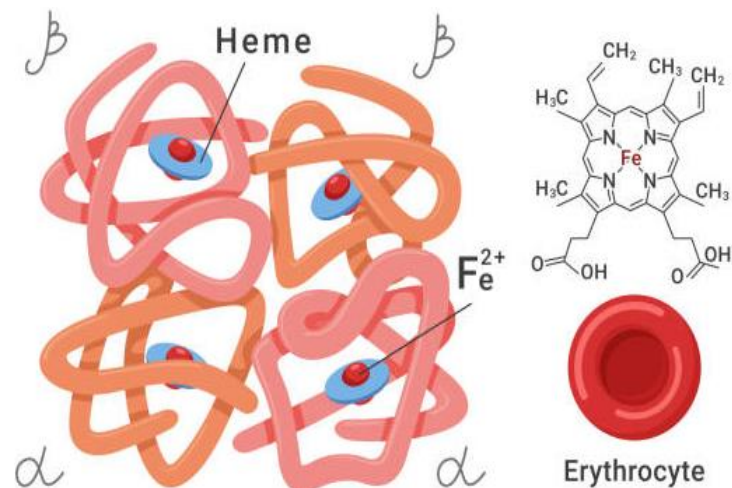
Fyziologické hodnoty:

- **Novorozenec:** 145 - 225 g/L
- **14. den po narození:** 125 - 205 g/L
- **1. rok:** 105 - 135 g/L (do dospělosti se postupně zvyšuje)

- **V dospělosti** rozdílné hodnoty u mužů a žen
- **Muži:** 135 – 175 g/L
- **Ženy:** 120 – 160 g/L

Zvýšený počet → „polyglobulie“ ev. „polycytémie“ (klonální)

Snížený počet → „anémie“



Hematokrit (HCT)

Udává poměr objemu erytrocytů ku celkovému objemu krve

Vyjadřujeme jako podíl

Hematokrit se může zjistit na hematologických analyzátoch 2 způsoby:

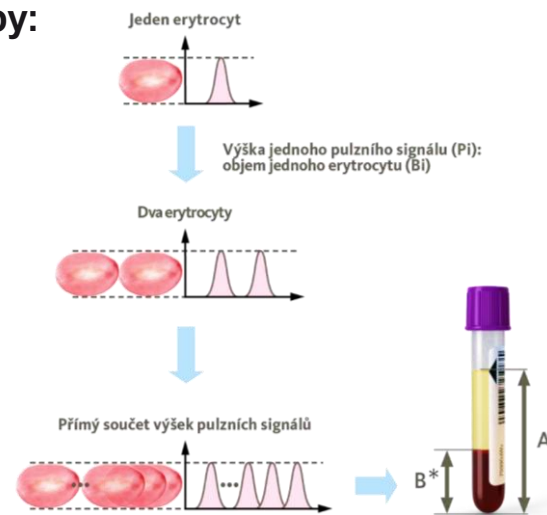
- Integrací napěťových impulsů
- Výpočtem: **$HCT = RBC \times MCV$**

Fyziologické hodnoty:

- Muži: 0,40 – 0,50
- Ženy: 0,35 – 0,47

Zvýšená hodnota → „polyglobulie“ ev. „polycytémie“ (klonální)

Snížená hodnota → „anémie“



*Celkový objem všech erytrocytů přítomných ve vzorku: Součet výšek pulzních signálů (změn elektrického odporu způsobených erytrocyty)

Střední objem erytrocytů (MCV = Mean Cell Volume)

Vyjadřuje průměrný objem buňky v hodnocených erytrocytech

Jednotka: **fL** (femtolitr)

MCV se zjistí:

- Přímým měřením na hematologických analyzátoch
- Výpočtem:
$$\text{MCV} = \frac{\text{HCT}}{\text{RBC}} \times 10^{15} \text{ (fL)}$$

Fyziologické hodnoty: 82 – 98 fL

- Hodnota MCV nad referenční rozmezí: „ makrocyty “
- Hodnota MCV v referenčním rozmezí: „ normocyty “
- Hodnota MCV pod referenční rozmezí: „ mikrocyty “



Náhlá velká změna v hodnotě MCV může ukazovat na záměnu pacienta

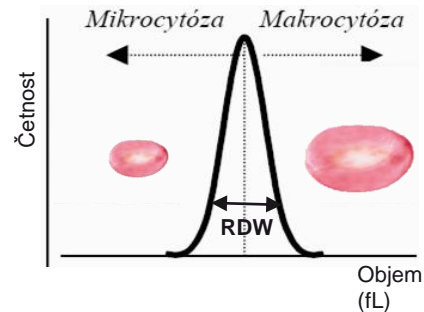
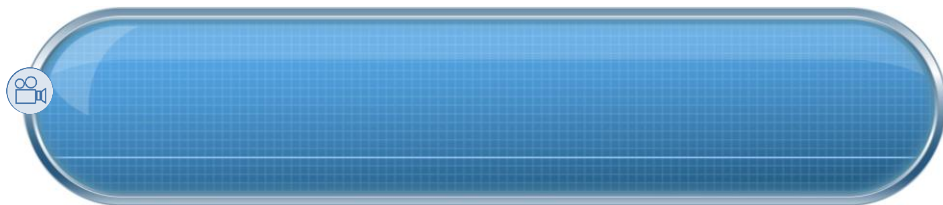
Histogram erytrocytů a trombocytů

Reprezentuje křivku závislosti objemů erytrocytů a trombocytů na jejich četnosti

Informuje o mikrocytóze a makrocytóze, dále i o anizo/izocytóze

Princip metody:

- Elektronické počítání jednotlivých středních objemů, které se vynáší na horizontální osu
- Vertikální osa pak reprezentuje četnost výskytu částice o určitém objem



Šíře distribuce erytrocytů (RDW = Red cell Distribution Width)

Jde o šíři nejčetnějších populací erytrocytů v histogramu

Jednotka:

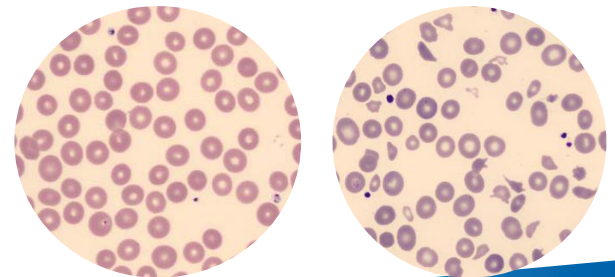
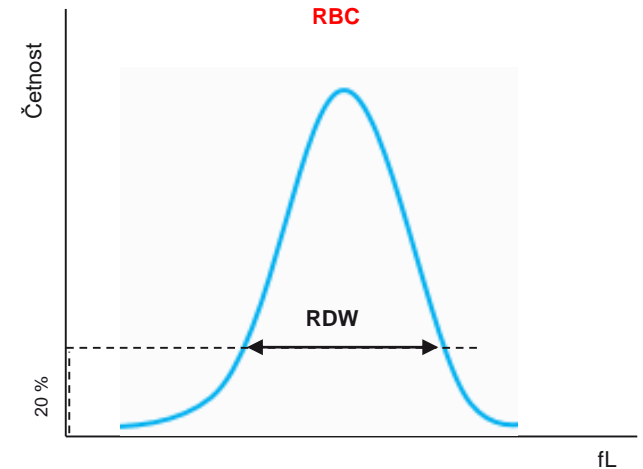
- % (pokud se vychází z variačního koeficientu CV)
- fL (pokud se vychází ze směrodatné odchylky SD)

Fyziologické hodnoty:

- CV: 10 – 15,2 %
- SD: 37 – 54 fL

Hodnoty v referenčním rozmezí: „, izocytóza “

Hodnoty vyšší než referenční rozmezí: „, anizocytóza “



Střední množství HGB v erytrocytu (MCH = Mean Corpuscular Hemoglobin)

Udává množství hemoglobinu v 1 erytrocytu

Jednotka: **pg**

Primárně jde o vypočtenou hodnotu získanou ze vzorce:
$$\text{MCH} = \frac{\text{HGB}}{\text{RBC}} \times 10^{12} \text{ (pg)}$$

(Ize ji získat i přímým měřením v optickém měření)

Fyziologické hodnoty:

➤ 28 – 34 pg



Střední koncentrace HGB v erythrocytech (MCH = Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)

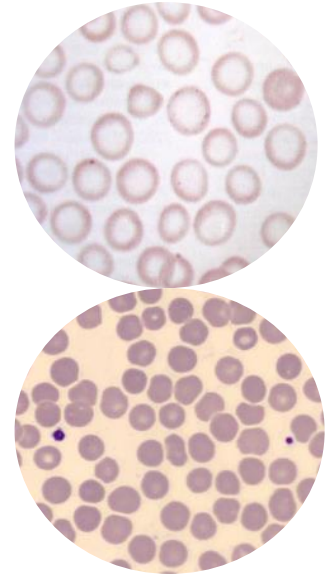
MCHC udává množství HGB v erythrocytární mase vyjádřené hodnotou hematokritu

Jednotka: **g/L**

Výpočet: **$MCHC = \frac{HGB}{HCT}$** (pg)

Fyziologické hodnoty:

- Stejně u mužů a žen
- 320 – 360 g/L
- Hodnota MCH a MCHC pod referenční rozmezí: „ hypochromní ery “
- Hodnota MCH a MCHC v normě: „ normochromní ery “
- Hodnota MCH a MCHC nad referenční rozmezí: „ hyperchromní ery “



! MCHC > 360 g/l → nesmysl (fyzikálně není možné, aby bylo více než 360 g HGB v 1 litru erythrocytů!) nevalidní hodnota HGB (chladové protilátky → zahřátí zkumavky na 37°C; chylózní krev, paraproteinémie)

- MCH a MCHC – stabilní parametry, informují nás o systémové chybě analyzátoru pomocí tzv. X-B analýzy

Retikulocyty (RET)

Jsou čerstvě vyplavené erythrocyty z kostní dřeně do periferní krve **obsahující RNA**. Jsou schopny na rozdíl od zralého erythrocytu ještě částečně syntetizovat HGB.

Jednotka:

Absolutní počet: **$10^9/L$**

Relativní počet: %

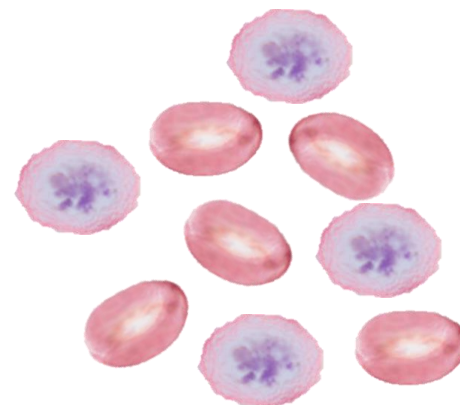
Fyziologické hodnoty:

0,5 – 2,5 %

25 – 100 x $10^9/L$

Klinická informace:

- Aktivita a regenerace kostní dřeně (chemoterapie, transplantace)
- Diagnostika a terapie anémií
- Léčba erythropoetinem – chronická onemocnění (např. chronické renální selhání)



Zvýšený počet → „ retikulocytóza “

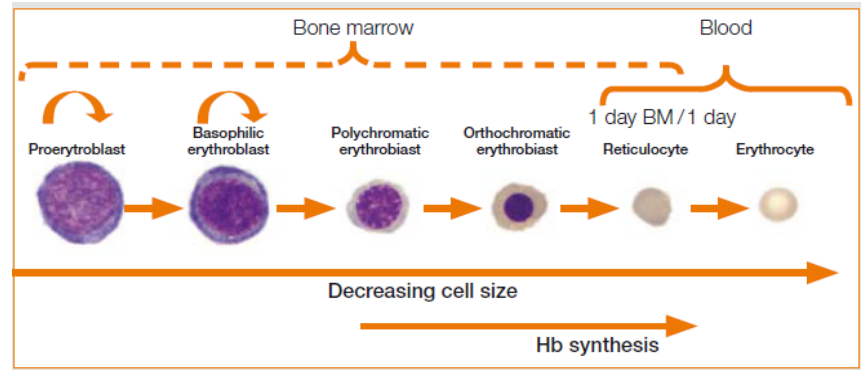
Snížený počet → „ retikulopenie “

Retikulocyty (RET)

Retikulocyt v elektronovém mikroskopu



Erytropoéza



- Obsahuje zbytky buněčných organel s RNA (ribosomy, zbytky endoplazmatického retikula)

Retikulocyty (RET)

Princip vyšetřování na analyzátorech:

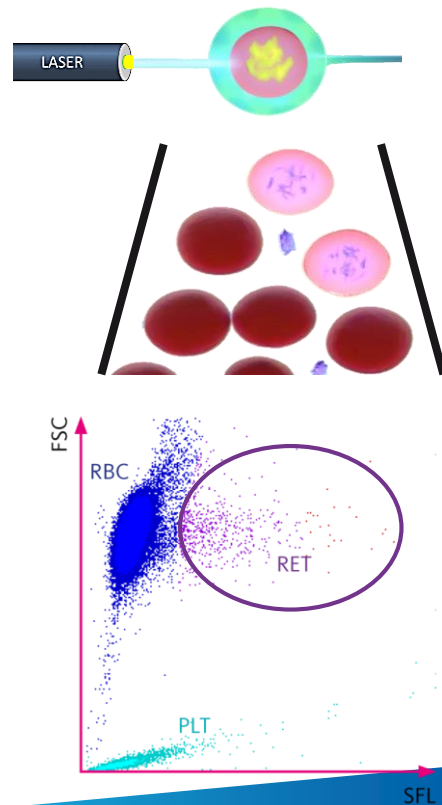
Inkubace alikvotu plné krve s RNA barvou, RNA struktury v retikulocytech se obarví

Hodnocení:

Počet se stanovuje většinou na principu průtokové fluorescenční cytometrie, kdy na osu x je vynesena míra fluorescence a na osu y velikost buňky

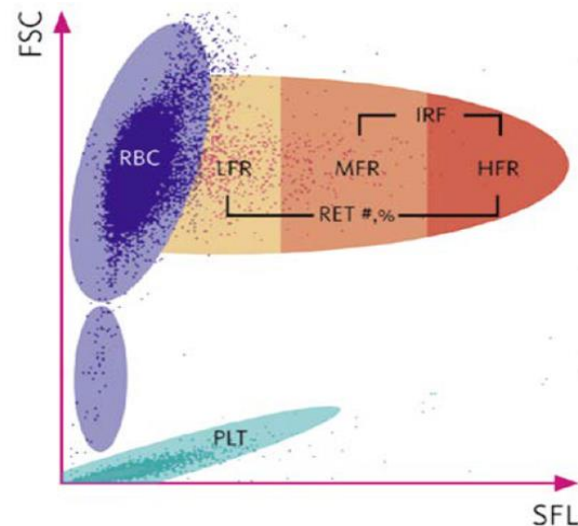
Případné interference:

- Howell-Jollyho tělíka
- Krevní parazité - Plasmodia



Retikulyocyty – rozšířené parametry

- **Hemoglobin v retikulyocytech** (RET-He, MCH_r , CH_r)
- Mladší a starší vývojové formy retikulyocytů (rozdělení na frakce podle obsahu RNA - čím větší obsah RNA, tím mladší) - informace o parametrech zralosti RET:
 - **Immature Reticulocyte Fraction** (IRF nebo IRFH)
 - Low-, Medium-, High- Fluorescent Ratio (LFR, MFR, HFR)
 - Středně a vysoce nezralá frakce RET (IRFMH)
 - Mean Fluorescence Index (MFI)
- Retikulohematokrit
- MCV_{RET} = střední objem retikulyocytů



Erytropoéza a hemoglobinizace

Erytrocyty - odráží historii erytropoézy

- **životnost až 120 dnů**
- parametry: RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW

	Kvantitativní parametr	Kvalitativní parametr
Erytrocyty	RBC, HCT	MCV, MCH, MCHC, RDW
Retikulocyty	RET, IRF	RET-He (=MCH _r = CHr) MCV _r

Retikulocyty - odráží aktuální stav erytropoézy

- **dozrívání v periferní krvi 1-3 dnů**
- parametry: RET, IRF, RET-He
- **RET, IRF** ve zvýšených hodnotách informují o počínající reakci kostní dřeně na stimulaci, nic však nevyovídají o skutečné kvalitě retikulocytů – obsahu hemoglobinu v nich
- **RET-He** vyhodnocuje hemoglobinizaci (resp. Fe, které je v danou chvíli skutečně využíváno k biosyntéze hemoglobinu)

Nezralé frakce RET (IRF)

Mladé formy retikulocytů - ve zvýšených hodnotách:

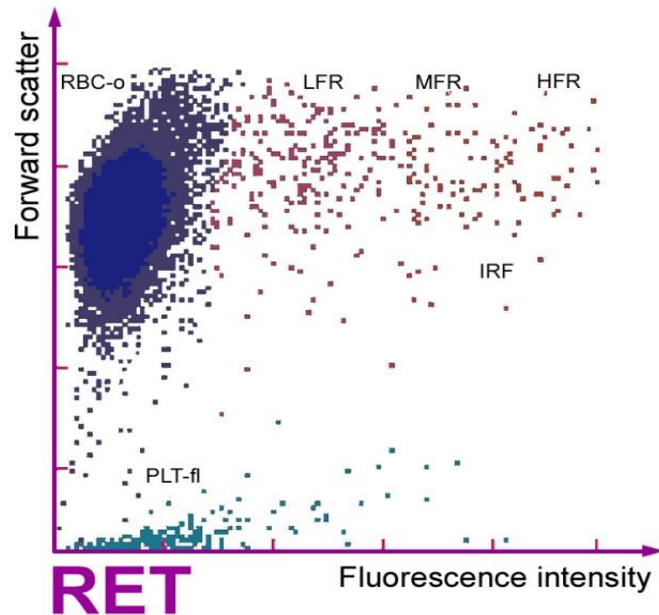
- informují o počínající reakci kostní dřeně na stimulaci
- nevypovídají nic o skutečné kvalitě retikulocytů (obsahu hemoglobinu v nich)

Referenční rozmezí u zdravých dospělých

1,6 – 10,5 %

Parametr aktivace erythropoézy – účinnost léčby

- Hodnocení vývojově nejmladší populace retikulocytů z jejich celkového počtu
- Stimulace či útlum erythropoézy **v řádu hodin**
- Management podání transfuzí erytrocytů
- Monitorování terapie erythropoetinem



Retikulocytární hemoglobin (RET-He, MCH_r, CH_r)

Střední obsah hemoglobinu v retikulocyty (pg)

- popisuje kvalitu právě vznikajících erytrocytů!
- významný parametr při **posuzování metabolismu** (a dostupnosti) **Fe** pro erytropoézu
 - poskytuje informace v horizontu dní – „krátkodobý ekvivalent MCH“
 - referenční rozmezí: 28 – 36 pg
- méně než 28 pg je projevem nedostatku nebo nedostupnosti funkčního železa pro erytropoézu

RET-He – kazuistika

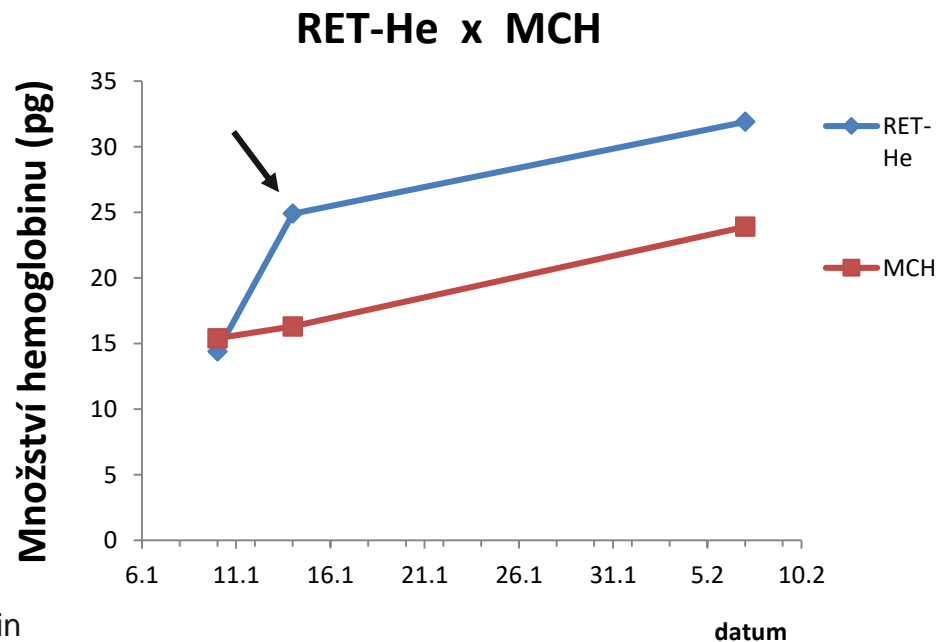
Pacientka K.V. *99, při preventivní prohlídce zjištěna mikrocytární anémie

↓ RBC	3,97	$\times 10^{12}/L$
↓ HGB	61	g/L
↓ HCT	0,23	
↓ MCV	58,7	fl
↓ MCH	15,4	pg

Biochemie:

↓ Fe	2,8	$\mu\text{mol}/L$
↓ Ferritin	1,8	$\mu\text{g}/L$

- dg anémie z nedostatku železa, léčba: Aktiferrin, Pyridoxin
- už při kontrole po 5 dnech léčby nárůst **RET-He**



Normoblasty / erytroblasty (NRBC)

Erytrocyty vznikají v kostní dřeni z jaderných prekurzorů

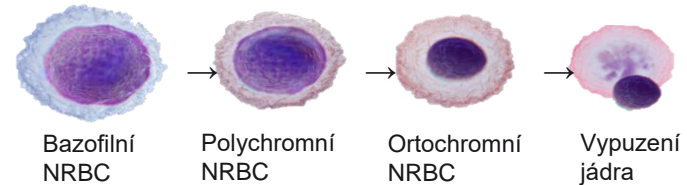
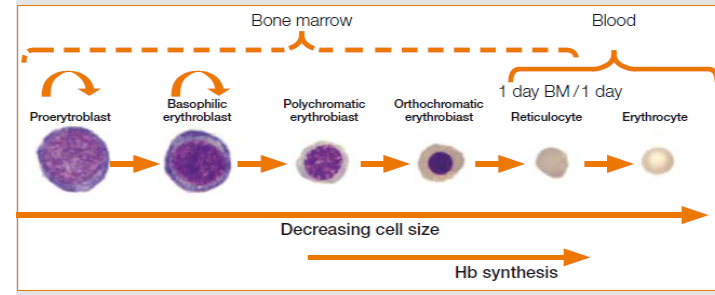
- ❑ za fyziologického stavu erytroblasty po dozrání vypudí v kostní dřeni jádro a ve formě retikulocytů se vyplavují do periferní krve
- ❑ za patologických stavů se mohou jaderné prekurzory vyplavit do periferní krve = **normoblasty**

Jednotka:

- Absolutní počet: **$10^9/L$**
- Relativní počet: počet **NRBC/100 WBC (%)**

- Fyziologické hodnoty:
 - Novorozenci (0-3 dny): $0 - 1,30 \times 10^9/L$
 $0 - 8,3 \text{ NRBC}/100\text{WBC} (\%)$
 - Novorozenci (4+ dní): $0 \times 10^9/L$
 $0 \text{ NRBC}/100\text{WBC}$

- **U dospělých se fyziologicky NRBC nevyskytují v periferní krvi**



Normoblasty

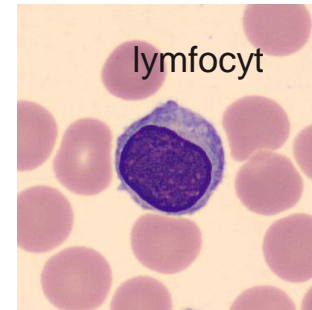
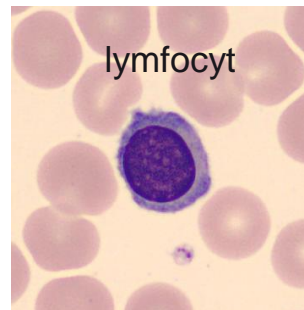
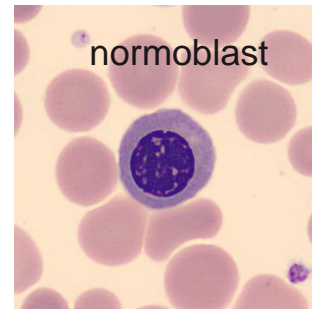
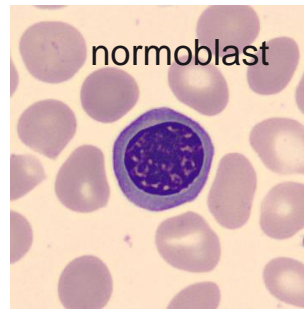
- Dříve obtížně detekovatelné díky podobnosti s WBC

Analýza:

Jejich odlišení bylo možné pouze mikroskopicky:

počet NRBC na 100 WBC
následně nutno provést korekci počtu
WBC dle vzorce:

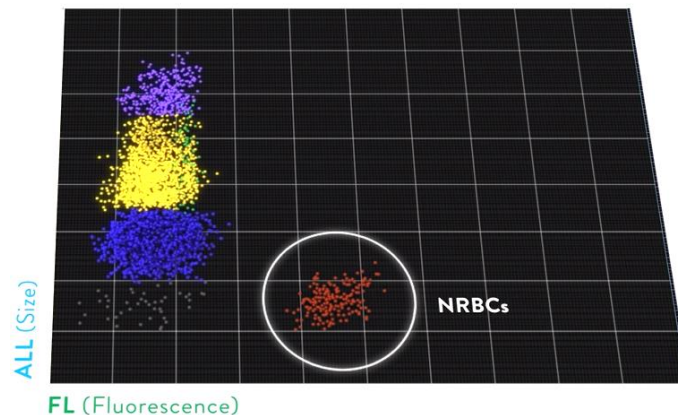
$$\text{korigované WBC (x10}^9\text{/L)} = \frac{\text{WBC (x10}^9\text{/L)} \times 100}{(100 + \text{NRBC}/100 \text{ WBC})}$$



Normoblasty

Princip vyšetřování na analyzátoch:

- Erythrocyty a erythroblasty se vystaví působení lyzačního roztoku
- Leukocyty se nelyzují
- Obarvení **fluorescenčním barvivem** afinitním k jaderné DNA
- Stanovení na principu průtokové fluorescenční cytometrie



! Vysoké počty NRBC mohou ovlivnit absolutní počet leukocytů

Normoblasty

Klinické využití: Pozitivní hodnota od $>0.1/100$ WBC

- Neonatologie**
- vyloučení falešně zvýšených hodnot WBC – zejména u septických pacientů a pacientů s nízkými hodnotami WBC
 - nezávislý prediktor mortality u předčasně narozených dětí

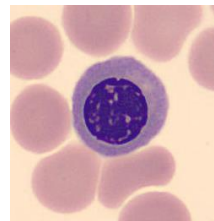
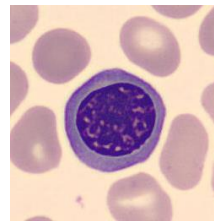
Hematoonkologická onemocnění - známka inefektivní nebo extramedulární erythropoézy
(NRBC v remisi mizí)

Kriticky nemocní pacienti - JIP

- » nezávislý negativní prognostický faktor (nárůst NRBC koreluje s celkovou mortalitou)

Hematopoetický stres – infekce, hypoxie

Prognostický marker závažného onemocnění



Počet bílých krvinek (WBC = White Blood Cells)

Hodnota vyjadřuje počet bílých krvinek v 1 litru krve

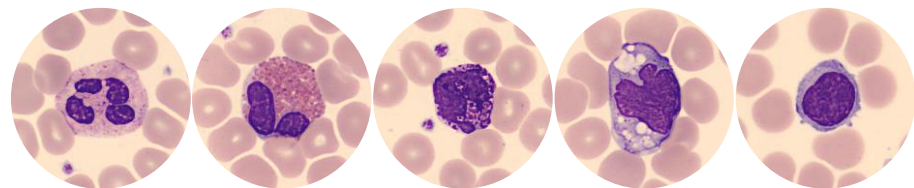
Jednotka: **$10^9/L$**

Fyziologické hodnoty:

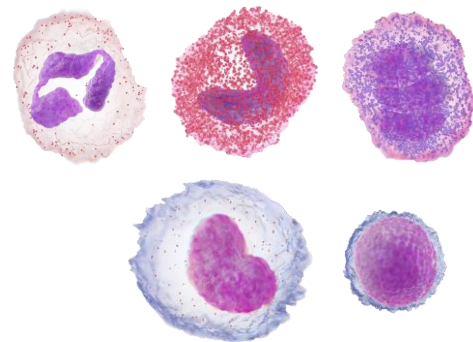
Novorozenci: $9 - 30 \times 10^9/L$

Tento počet lehce klesá až do 8 - 10 let

Dospělí: $4,0 - 10,0 \times 10^9/L$



- Zvýšený počet WBC → „ leukocytóza “
- Snížený počet WBC → „ leukopenie “



! Výsledek může být zkreslený při zvýšeném počtu normoblastů (>10 %), nutno přepočítat počet leukocytů

$$\text{korigované WBC (x10}^9\text{/L)} = \frac{\text{WBC (x10}^9\text{/L)} \times 100}{(100 + \text{NRBC}/100 \text{ WBC})}$$

Neutrofilý (NEU)

Hodnota vyjadřuje absolutní a relativní počet neutrofilů v 1 litru krve

Jednotky

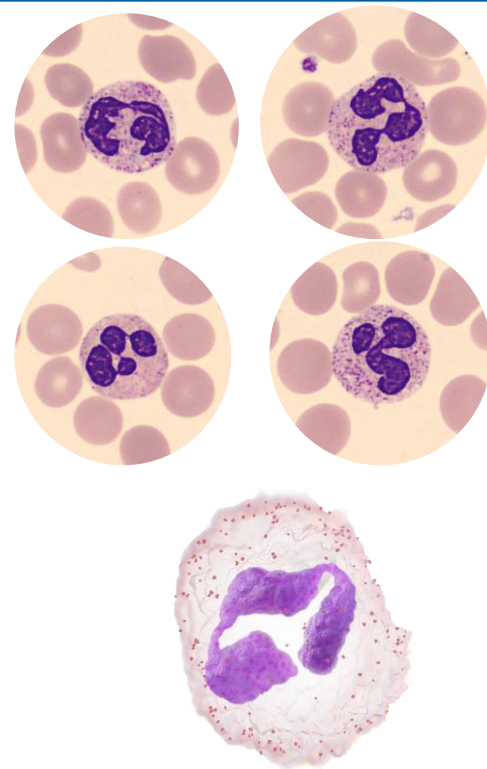
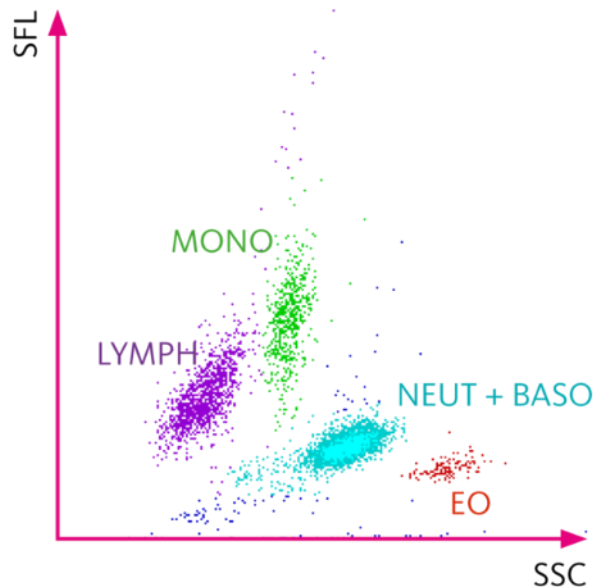
- Absolutní počet: $10^9/L$
- Relativní počet: **podíl, %**

Fyziologické hodnoty:

- Absolutní počet: $2,0 - 7,0 \times 10^9/L$
- Relativní počet: $0,45 - 0,70$ (45 – 70 %)

Zvýšený počet → „neutrofílie“

Snížený počet → „neutropenie“



Lymfocyty (LYM)

Hodnota vyjadřuje absolutní a relativní počet lymfocytů v 1 litru krve

Jednotky

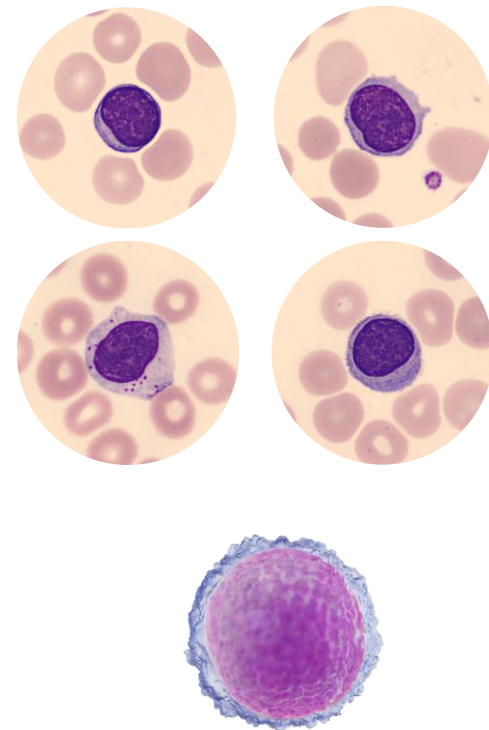
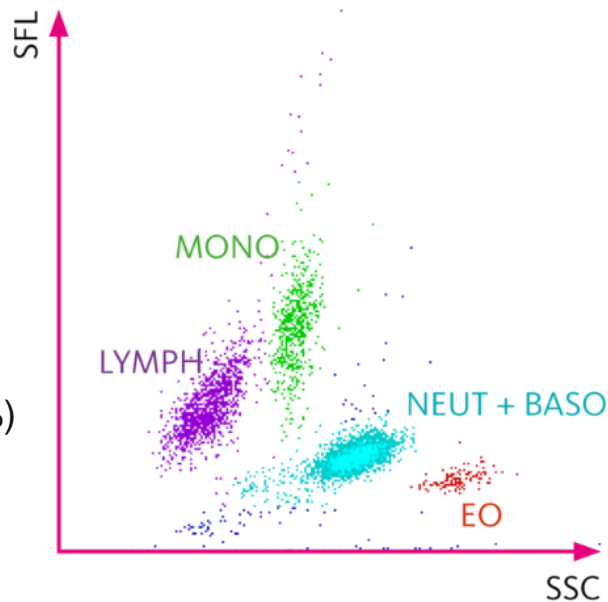
- Absolutní počet: $10^9/L$
- Relativní počet: **podíl, %**

Fyziologické hodnoty:

- Absolutní počet: $0,8 - 4,0 \times 10^9/L$
- Relativní počet: $0,20 - 0,45$ (20 – 45 %)

Zvýšený počet → „lymfocytóza“

Snížený počet → „lymfocytopenie“



Monocyty (MONO)

Hodnota vyjadřuje absolutní a relativní počet monocytů v 1 litru krve

Jednotky

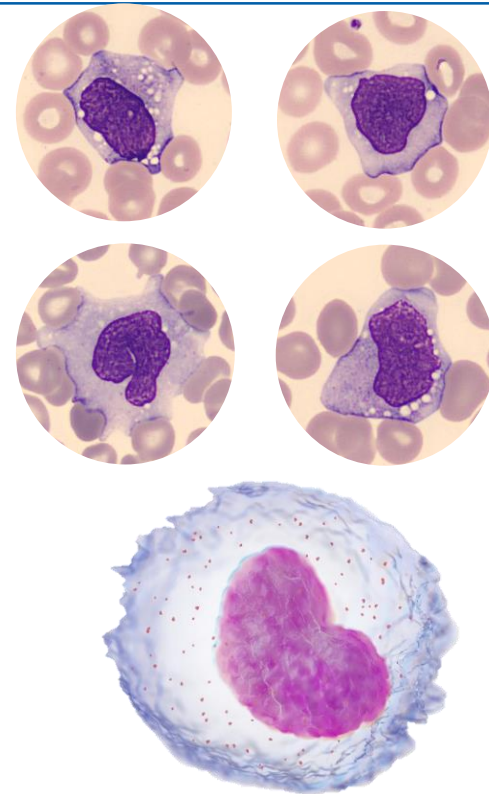
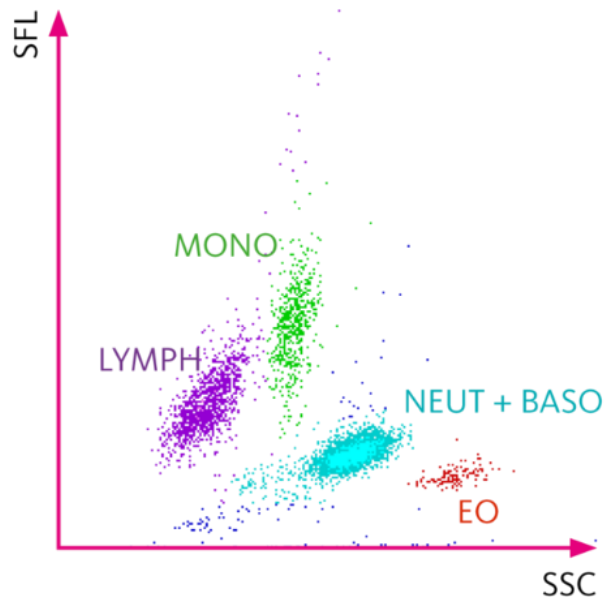
- Absolutní počet: $10^9/L$
- Relativní počet: **podíl, %**

Fyziologické hodnoty:

Absolutní počet: $0,08 - 1,2 \times 10^9/L$

Relativní počet: $0,02 - 0,12$ (2 – 12 %)

- Zvýšený počet → „monocytóza“
- Snížený počet → „monocytopenie“



Eozinofily (EOS)

Hodnota vyjadřuje absolutní a relativní počet eozinofilů v 1 litru krve

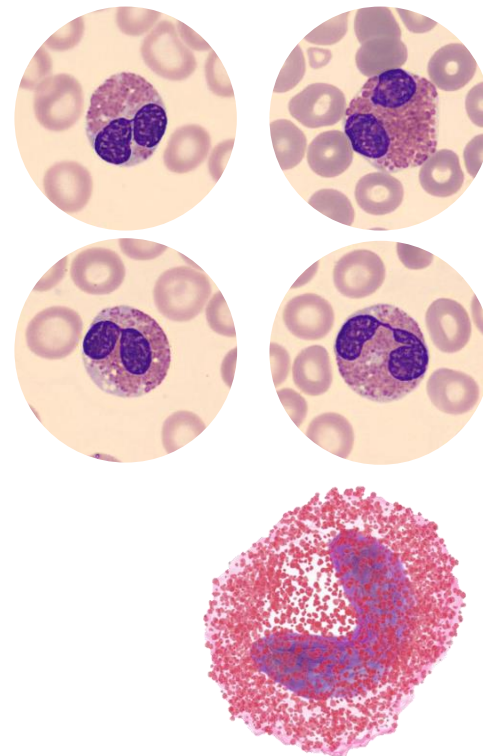
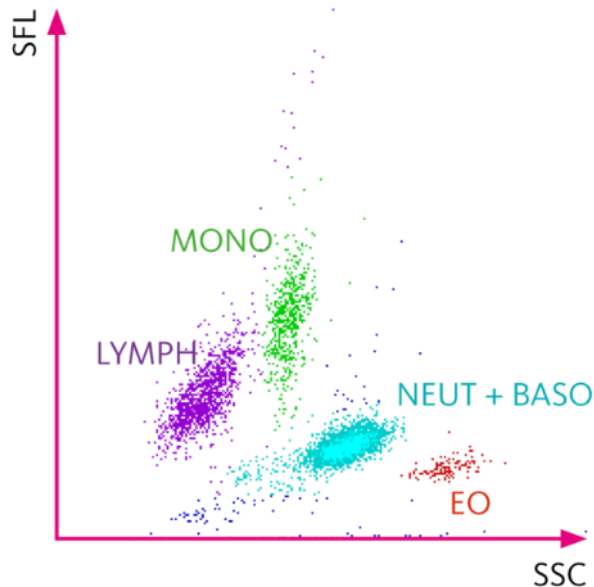
Jednotky

- Absolutní počet: $10^9/L$
- Relativní počet: **podíl, %**

Fyziologické hodnoty:

- Absolutní počet: $0,0 - 0,5 \times 10^9/L$
- Relativní počet: $0 - 0,05$ ($0 - 5 \%$)

Zvýšený počet → „ eozinofílie “



Bazofily (BASO)

Hodnota vyjadřuje absolutní a relativní počet bazofilů v 1 litru krve

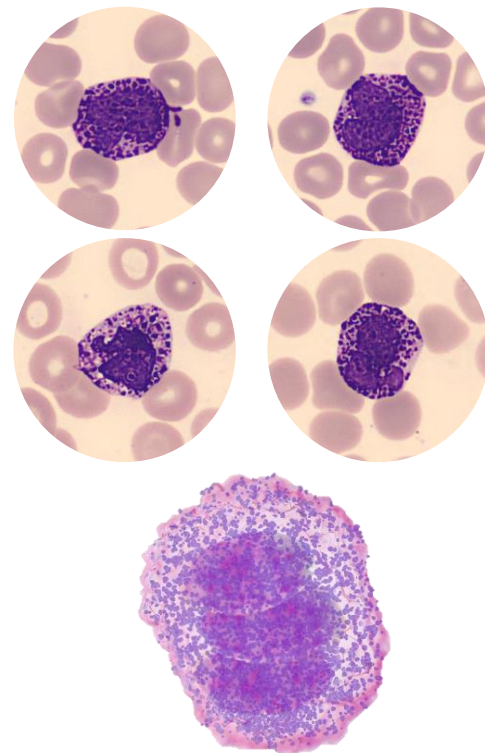
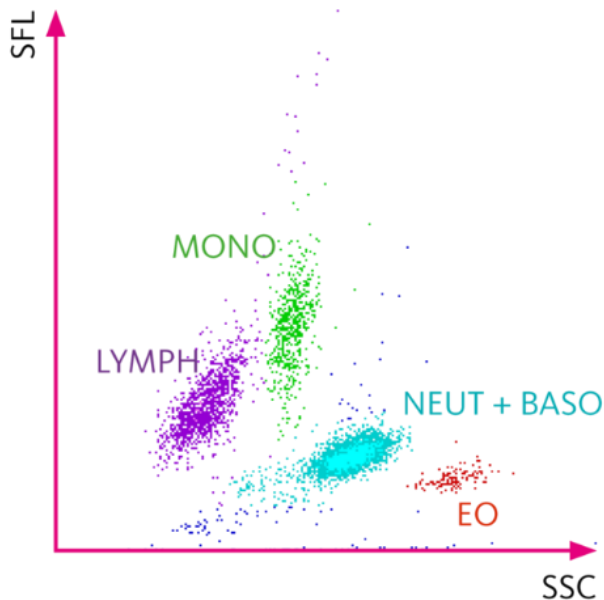
Jednotky

- Absolutní počet: $10^9/L$
- Relativní počet: podíl, %

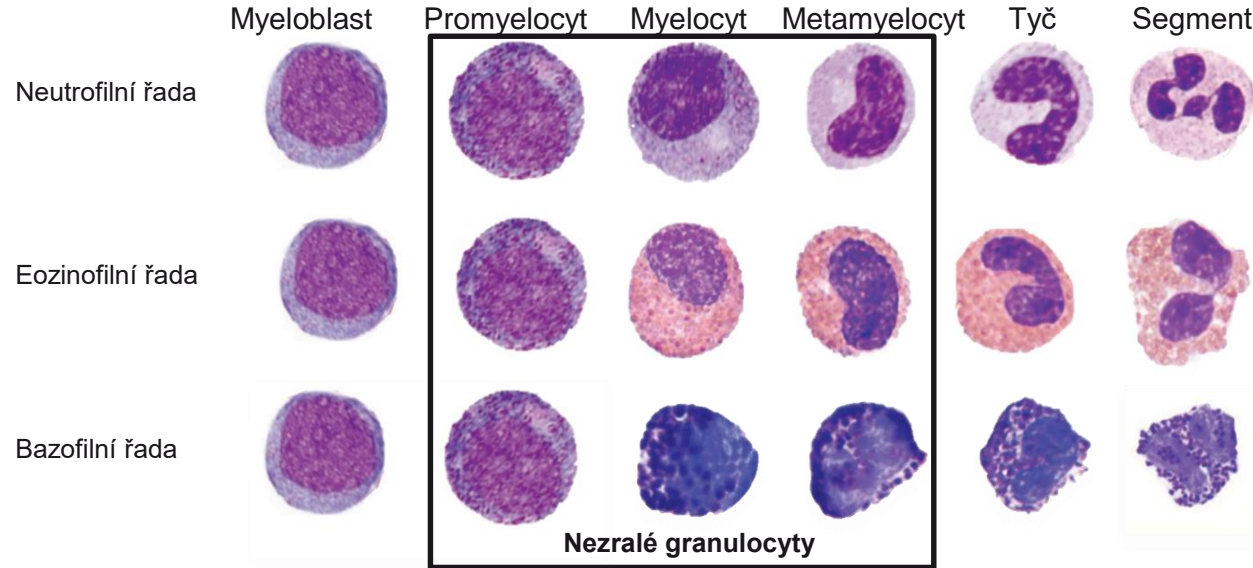
Fyziologické hodnoty:

- Absolutní počet: $0,0 - 0,2 \times 10^9/L$
- Relativní počet: $0 - 0,02$ ($0 - 2 \%$)

Zvýšený počet → „ bazofílie “



Nezralé Granulocyty (IG – Immature Granulocytes)



- u nejmodernějších analyzátorů součást měření každého KO+Diff
- přítomnost IG = patologický posun doleva
 - » včasná reakce kostní dřeně na infekci/sepsi vyplavení z kostní dřeně působením cytokinů uvolněných při zánětu

Nezralé Granulocyty (IG – Immature Granulocytes)

Referenční rozmezí u zdravých dospělých

IG # 0,00 - 0,06 x 10⁹/L

IG % 0,00 - 0,6 %

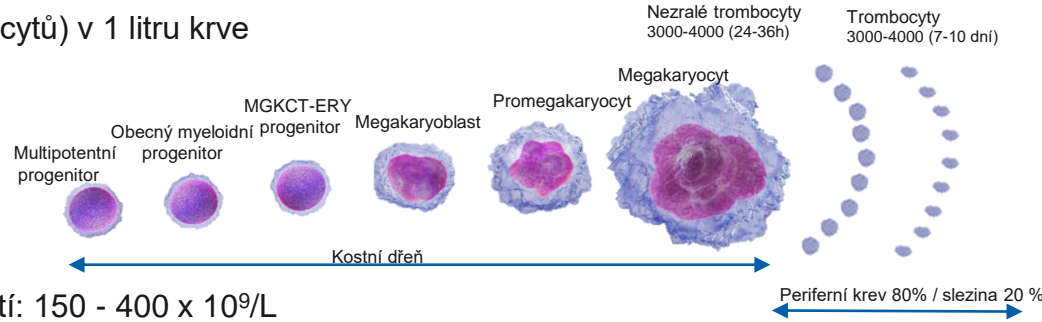
- význam mají nejen absolutní hodnoty, ale i dynamika
 - Diagnostika závažných infekcí, zánětů, myeloproliferativních onemocnění, G-CSF (podání růstových granulocytárních faktorů)
 - Zahájení včasné léčby ATB (sepsy)
 - Monitoring vývoje onemocnění pacientů na JIP (významné v kombinaci s NRBC)

IG%		
Percentage of immature granulocytes		
	Male and Female	
Age	N	% of WBC
≤2 days	87	0.0 - 1.7
2 - <14 days	100	0.0 - 1.9
14 - 30 days	98	0.0 - 1.3
31 - 90 days	86	0.0 - 0.9
91 - 180 days	87	0.0 - 0.5
0.5 - <2 years	100	0.0 - 0.9
2 - <6 years	91	0.0 - 0.8
6 - <12 years	100	0.0 - 0.3
12 - <18 years	100	0.0 - 0.3
>18 years	91	0.0 - 0.6

Počet krevních destiček (PLT = Platelets)

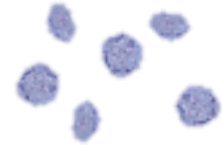
- Hodnota vyjadřuje počet krevních destiček (trombocytů) v 1 litru krve
- Jedná se o útržky cytoplazmy megakaryocytů

Jednotka: $10^9/L$



Počet destiček se výrazně neliší u mužů a u žen a dětí: $150 - 400 \times 10^9/L$

- **Je-li počet destiček $< 100 \times 10^9/L$, je nutná mikroskopická kontrola**
- Zvýšený počet PLT → „trombocytóza“ (reaktivní) či „trombocytémie“ (klonální)
- Snížený počet PLT → „trombocytopenie“
- V rámci KO parametr nejnáchylnější k interferencím



Obří PLT nebo mikroshluky PLT mohou při impedančním stanovení ovlivnit počet RBC (vyšší hodnoty) a vést k falešně nižším počtům PLT



U onemocnění s výskytem fragmentů WBC nebo RBC v periferní krvi je možné získat falešně vyšší počty PLT

Falešné zvýšení počtu trombocytů

- ❑ Přítomnost fragmentocytů (schistocytů) či extrémních mikrocytů
- ❑ Přítomnost kryoglobulinu
- ❑ Přítomnost fragmentů cytoplazmy leukocytů (akutní leukémie, leukemizované lymfomy)
- ❑ Přítomnost lipidů (postprandiální, i.v. parenterální výživa)

Vydání špatného výsledku může zapříčinit:

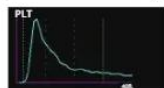
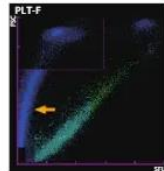
- ❑ nepodání transfuze trombocytů v indikovaných případech závažné trombocytopenie
- ❑ nadměrné došetřování falešných trombocytóz (trepanobiopsie, sternální punkce)

Fragmenty erytrocytů/mikrocyty

Závažná popálenina

Day 1 after injury

RBC	4.15 $10^{12}/L$ *
HGB	123 g/L
HCT	0.365 L/L *
MCV	88.0 fL
MCH	29.6 pg *
MCHC	337 g/L *
PLT&F	187 $10^9/L$
PLT-I	1012 $10^9/L$ *
RDW-SD	57.1 fL *
RDW-CV	19.3 % *
PDW	19.3 fL +
MPV	12.6 fL
P-LCR	42.9 %
PCT	0.0128 L/L +
RET#	41.1 $10^9/L$ *
RET%	0.99 % *
IRF	9.1 % *
LFR	90.9 % *
MFR	6.7 % *
HFR	2.4 % *
RET-He	27.8 pg *
FRC%	19.26 % *



Flags

RBC Flag(s)
RBC Abn Distribution
RET Abn Scattergram
Fragments?

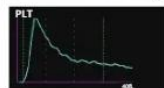
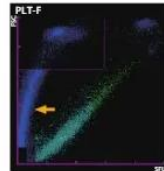
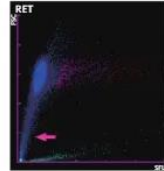
PLT Flag(s)

Other tests

CD61+ 204 $\times 10^9/L$

Day 2 after injury

RBC	3.35 $10^{12}/L$ *
HGB	95 g/L
HCT	0.309 L/L *
MCV	92.2 fL *
MCH	28.4 pg *
MCHC	307 g/L *
PLT&F	85 $10^9/L$
PLT-I	476 $10^9/L$ +
RDW-SD	70.7 fL *
RDW-CV	22.7 % *
PDW	---- fL
MPV	---- fL
P-LCR	---- %
PCT	---- L/L
RET#	66.7 $10^9/L$ *
RET%	1.99 % *
IRF	21.7 % *
LFR	78.3 % *
MFR	13.8 % *
HFR	7.9 % *
RET-He	26.6 pg *
FRC%	15.51 % *



Flags

RBC Flag(s)
RBC Abn Distribution
Anisocytosis
Anemia
RET Abn Scattergram
Fragments?

PLT Flag(s)

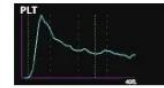
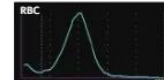
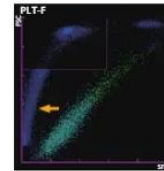
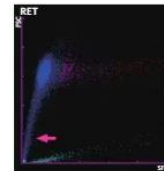
PLT Abn Distribution

Other tests

CD61+ 95 $\times 10^9/L$

Day 3 after injury

RBC	2.6 $10^{12}/L$
HGB	75 g/L -
HCT	0.248 L/L -
MCV	95.4 fL
MCH	28.8 pg
MCHC	302 g/L -
PLT&F	55 $10^9/L$
PLT-I	191 $10^9/L$
RDW-SD	73.7 fL +
RDW-CV	22.4 % +
PDW	---- fL
MPV	---- fL
P-LCR	---- %
PCT	---- L/L
RET#	54.9 $10^9/L$
RET%	2.11 %
IRF	28.6 %
LFR	71.4 %
MFR	17.0 %
HFR	11.6 %
RET-He	28.4 pg
FRC%	14.68 % *



Flags

RBC Flag(s)
Anisocytosis
Anemia
RET Abn Scattergram
Fragments?

PLT Flag(s)

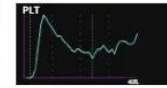
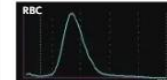
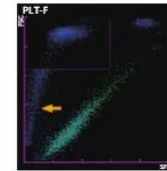
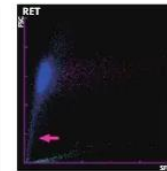
PLT Abn Distribution
Thrombocytopenia

Other tests

CD61+ 75 $\times 10^9/L$

Day 4 after injury

RBC	3.27 $10^{12}/L$
HGB	94 g/L
HCT	0.289 L/L
MCV	88.4 fL
MCH	28.7 pg
MCHC	325 g/L
PLT&F	45 $10^9/L$ -
PLT-I	79 $10^9/L$
RDW-SD	59.1 fL +
RDW-CV	18.8 % +
PDW	---- fL
MPV	---- fL
P-LCR	---- %
PCT	---- L/L
RET#	45.8 $10^9/L$
RET%	1.40 %
IRF	23.3 %
LFR	76.7 %
MFR	16.1 %
HFR	7.2 %
RET-He	27.5 pg
FRC%	4.31 % *



Flags

RBC Flag(s)
Anemia
Fragments?

PLT Flag(s)

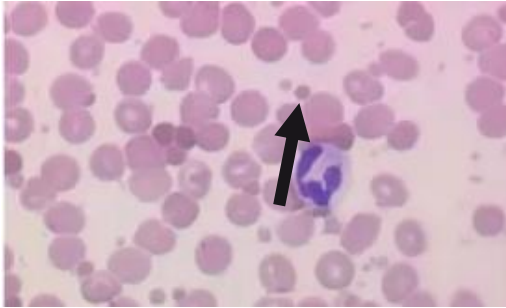
PLT Abn Distribution
Thrombocytopenia

Other tests

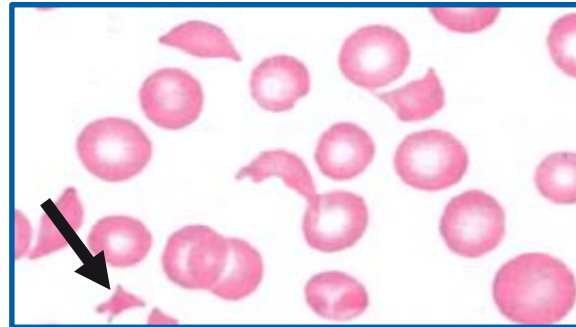
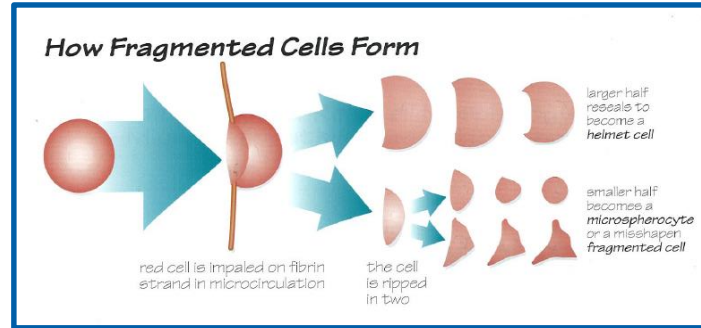
CD61+ 54 $\times 10^9/L$

Fragmenty erytrocytů/extrémní mikrocyty

Závažná popálenina (mikrocyty)



TTP (schistocyty)



Microangiopathic Hemolytic Anemia



triangulocyte



schistocytes

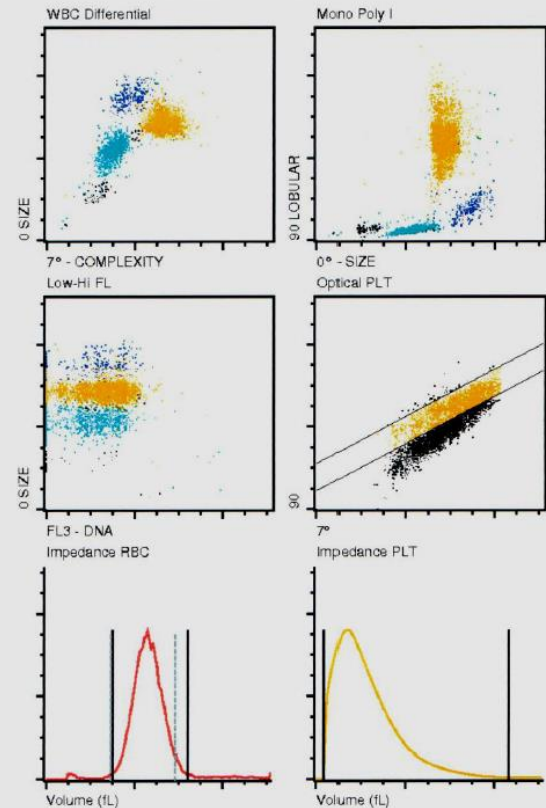
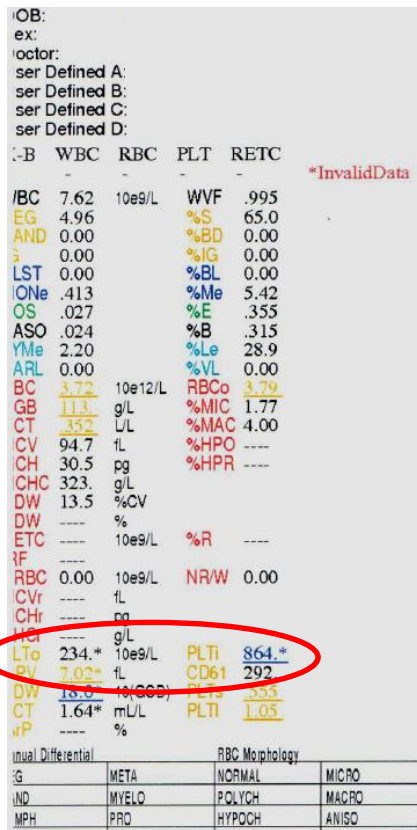
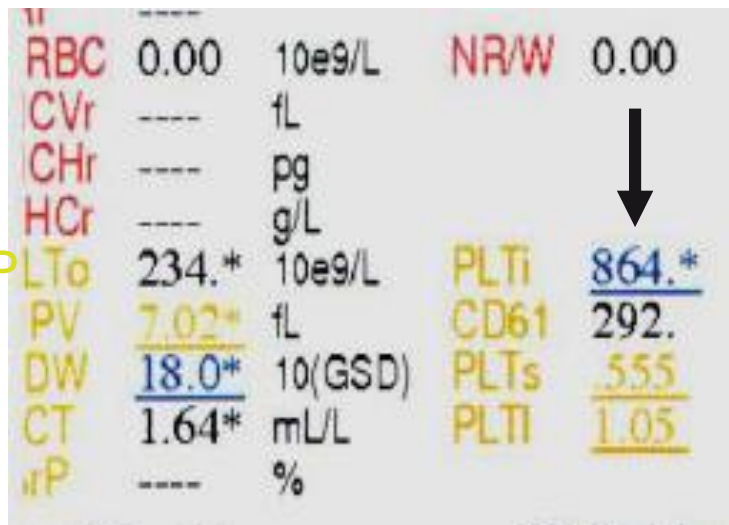


pre-keratocyte

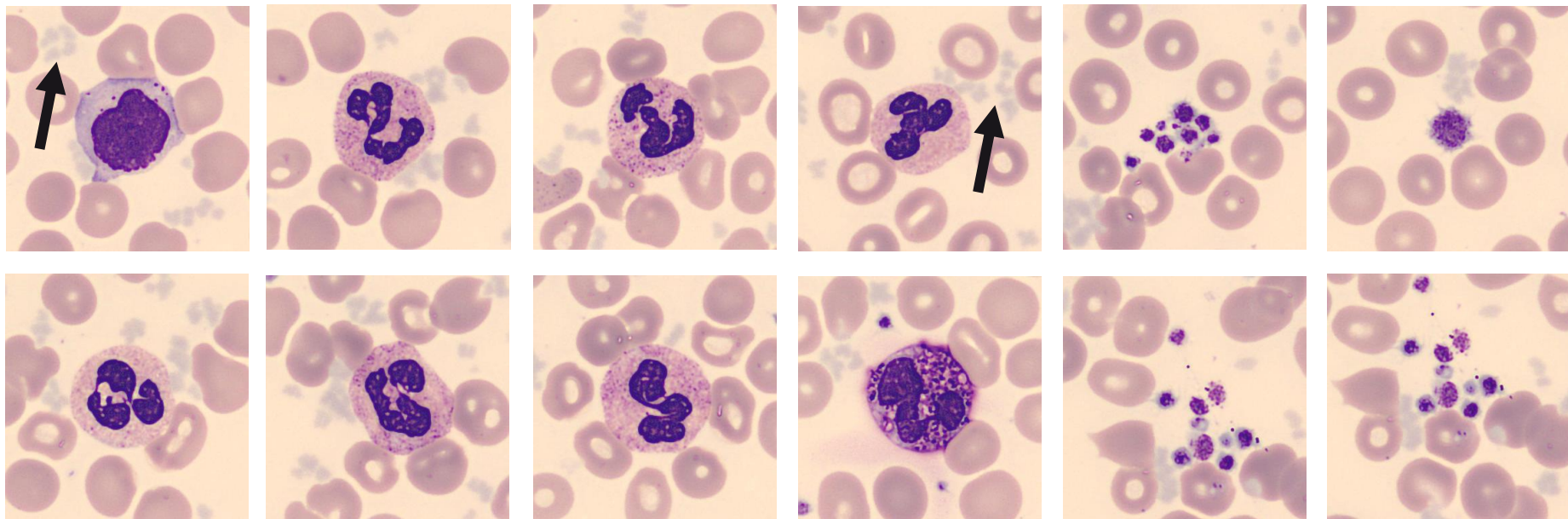
keratocyte
(horn cell)

Přítomnost kryoglobulinu

- Jedná se o protilátky IgG či IgM
- Mohou být mono i polyklonální
- Někdy lze odstranit zahřátím na 37°C



Kryoglobulin



Fragmenty cytoplazmy leukocytů

Aktuální leukémie

WBC	297.85	10 ⁹ /L	+		
RBC	3.15	10 ¹² /L			
HGB	104	g/L			
HCT	0.354	L/L			
MCV	112.4	fL	+		
MCH	33.0	pg			
MCHC	294	g/L	-		
PLT&F	7	10 ⁹ /L	*		
PLT-I	25	10 ⁹ /L	-		
RDW-SD	72.3	fL	+		
RDW-CV	18.2	%	+		
PDW	9.7	fL	*		
MPV	7.7	fL	*		
P-LCR	7.6	%	*		
PCT	0.0002	L/L	*		
NRBC	0.92	10 ⁹ /L		0.3	/100WBC

NEUT	40.49	10 ⁹ /L	*	13.6	% *
LYMPH	162.89	10 ⁹ /L	*	54.7	% *
MONO	91.77	10 ⁹ /L	*	30.8	% *
EO	0.13	10 ⁹ /L	*	0.0	% *
BASO	2.57	10 ⁹ /L	+	0.9	%
IG	2.55	10 ⁹ /L	*	0.9	% *
RET	26.5	10 ⁹ /L		0.84	%
IRF	20.8	%			
LFR	79.2	%			
MFR	17.2	%			
HFR	3.6	%			
RET-He	32.3	pg			
IPF	0.5	10 ⁹ /L	*	7.6	% *

WBC Flag(s)

WBC Abn Scattergram

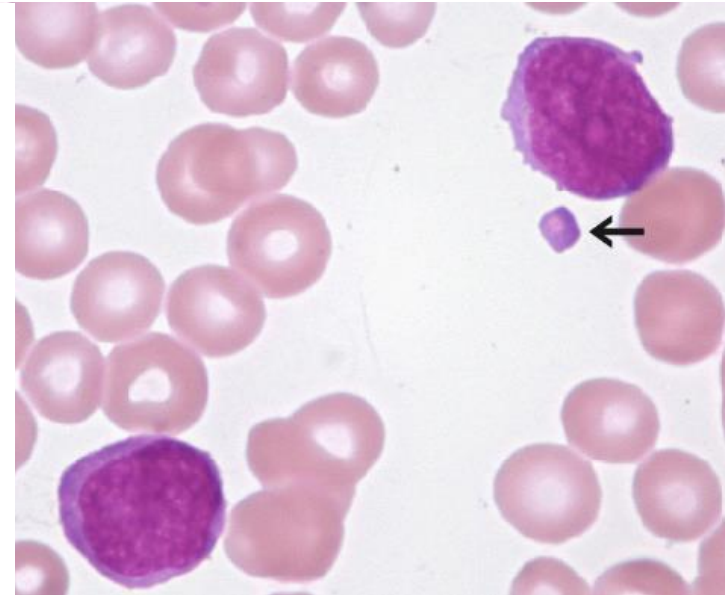
Neutrophilia
Lymphocytosis
Monocytosis
Basophilia
Leukocytosis
IG Present
Blasts?
Left Shift?
Abn Lympho?

RBC Flag(s)

Anisocytosis
Macrocytosis
RET Abn Scattergram

PLT Flag(s)

Thrombocytopenia
PLT Clumps?



Fragmenty cytoplazmy leukocytů

Aktuální leukémie

WBC	492.30 $10^9/L$	@		
RBC	3.91 $10^{12}/L$			
HGB	100 g/L			
HCT	0.331 L/L			
MCV	84.7 fL	-		
MCH	25.6 pg	-		
MCHC	302 g/L	-		
PLT&F	9 $10^9/L$	-		
PLT-I	35 $10^9/L$	-		
RDW-SD	52.2 fL			
RDW-CV	17.5 %	+		
PDW	21.4 fL	*		
MPV	11.6 fL	*		
P-LCR	40.0 %	*		
PCT	0.0004 L/L	*		
NRBC	0.18 $10^9/L$		0.0 /100WBC	

NEUT	22.97 $10^9/L$	*	4.6 %	*
LYMPH	381.87 $10^9/L$	*	77.6 %	*
MONO	76.13 $10^9/L$	*	15.5 %	*
EO	0.04 $10^9/L$		0.0 %	
BASO	11.29 $10^9/L$	+	2.3 %	+
IG	2.03 $10^9/L$	*	0.4 %	*
RET	10.6 $10^9/L$		0.27 %	
IRF	21.6 %			
LFR	78.4 %			
MFR	17.2 %			
HFR	4.4 %			
RET-He	30.9 pg			
IPF	1.8 $10^9/L$	*	19.5 %	*

WBC Flag(s)

WBC Abn Scattergram

Neutrophilia
Lymphocytosis
Monocytosis
Basophilia
Leukocytosis
IG Present
Blasts?
Abn Lympho?

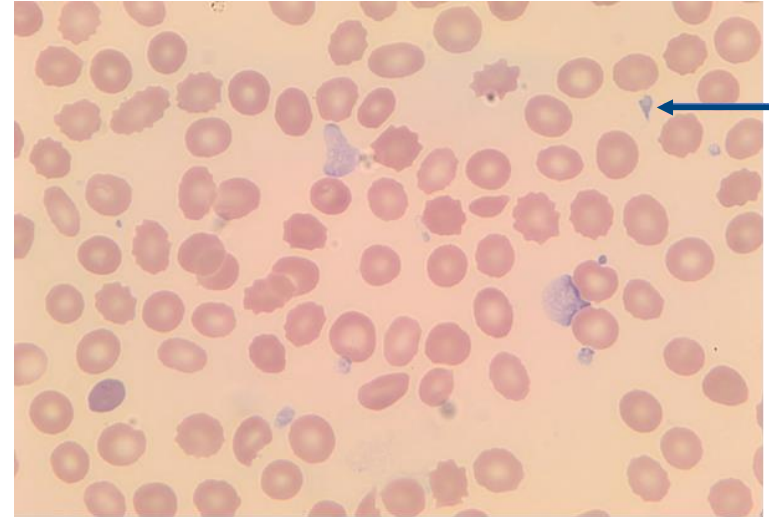
RBC Flag(s)

RET Abn Scattergram

PLT Flag(s)

PLT Abn Distribution

Thrombocytopenia



Substituce trombocytů

<input type="checkbox"/> Nekomplikovaní nemocní	$PLT \leq 10 \times 10^9/L$
<input type="checkbox"/> Zavedení CŽK	$PLT \leq 20 \times 10^9/L$
<input type="checkbox"/> Lumbální punkce atraumatická	$PLT \leq 20 \times 10^9/L$
<input type="checkbox"/> Nekomplikovaná extrakce 1 zubu	$PLT \leq 30 \times 10^9/L$
<input type="checkbox"/> Extrakce více zubů, punkce kloubů	$PLT \leq 50 \times 10^9/L$
<input type="checkbox"/> Větší chirurgické a ortopedické výkony	$PLT \leq 80 \times 10^9/L$
<input type="checkbox"/> Neurochirurgická operace	$PLT \leq 100 \times 10^9/L$

2×10^{11} trombocytů /TU → vzestup PLT o 20 – 30 $\times 10^9/L$



Falešné snížení počtu trombocytů

- Přítomnost shluků trombocytů
- Destičkový satelitismus
- Přítomnost makro/giga trombocytů

Vydání špatného výsledku může zapříčinit:

- nadměrné došetřování falešných trombocytopenií (sternální punkce)
- přerušování (chemoterapeutické) léčby
- odložení výkonů (kanylace, lumbální punkce, extrakce zubů.....)

Shluky trombocytů

Shluk = ≥ 3 trombocyty

Jedná se o laboratorní fenomén

Nejčastěji indukován EDTA (ale i citrát, heparin,...)

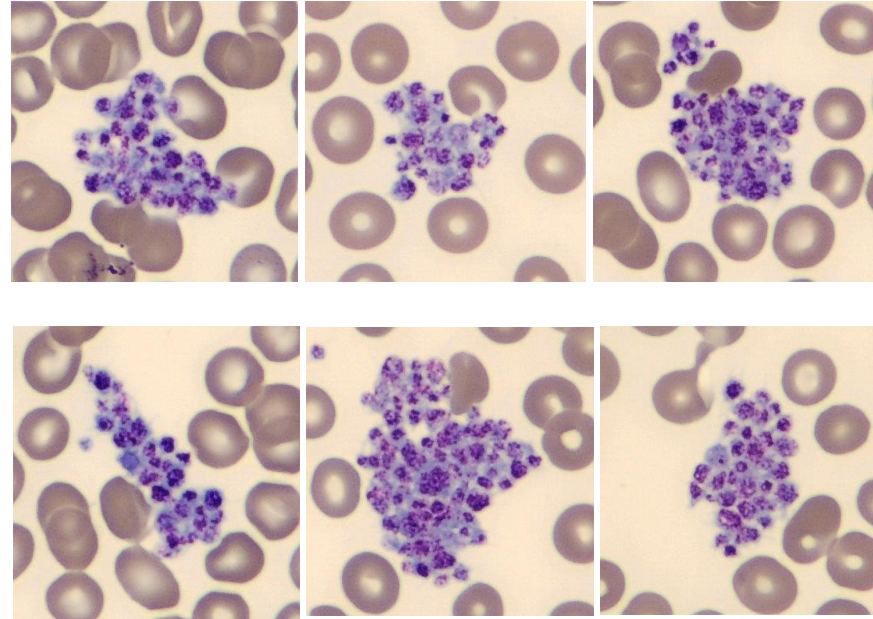
Způsobeno antitrombocytárními protilátkami proti **GPIIb/IIIa**

- Ab proti kryptickému epitopu
- epitop je v přítomnosti EDTA odhalen
- dochází k aktivaci tyrosinkinázy
- což vede k tvorbě shluků trombocytů

Prevalence v populaci 0,1-0,2 % (hospitalizovaní až 2 %)

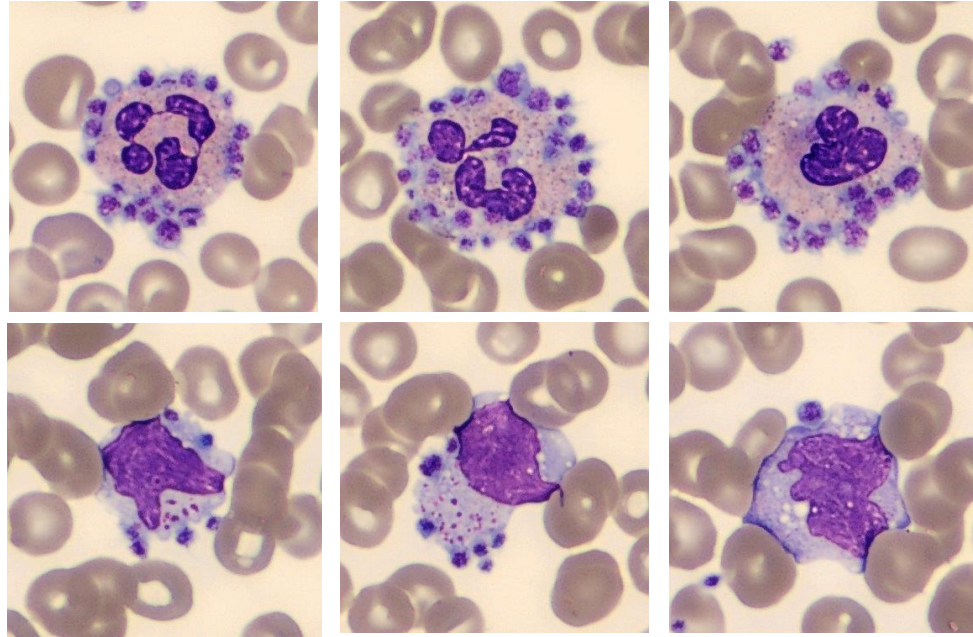
- V rámci trombocytopenických vzorků 15-20 %

V kontrolním nátěru se mohou nacházet na okrajích preparátu (nelze využít některé typy DM!).



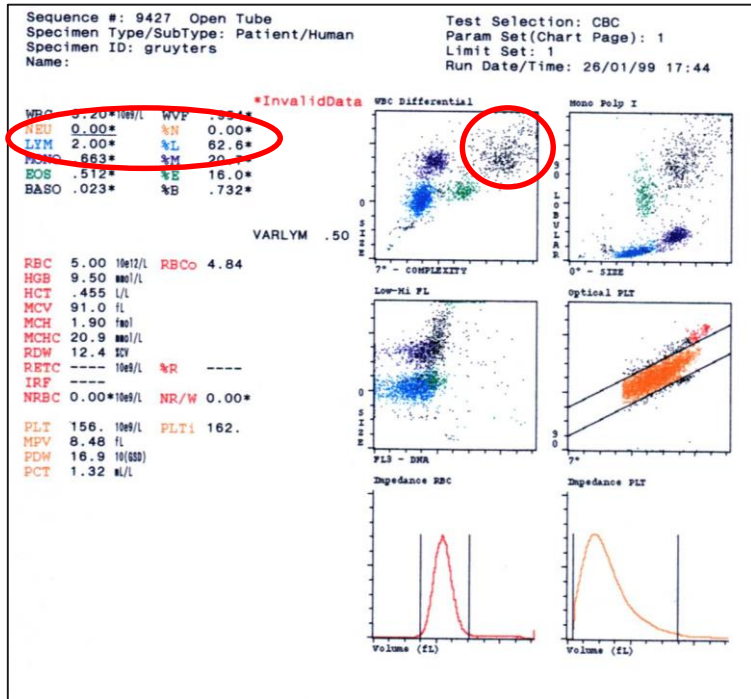
Satelitismus trombocytů

- Jedná se o raritní laboratorní fenomén
- Nejčastěji indukován EDTA (ale i citrát sodný, heparin)
- Patofyziologický mechanismus DS není dosud zcela přesně objasněn.
 - EDTA kontaktem s neutrofily a trombocyty „obnaží“ jejich membránové proteiny
 - receptor Fc gama neutrofilů a destičkový glykoproteinový komplex IIb/IIIa), což vede k následné tvorbě protilátek.
 - výsledkem je satelitismus, kdy protilátky působí jako můstek mezi membránou neutrofilů a trombocyty.



Satelitismus trombocytů

Abbott CD Sapphire

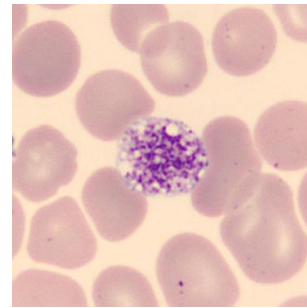
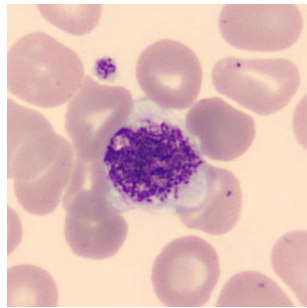
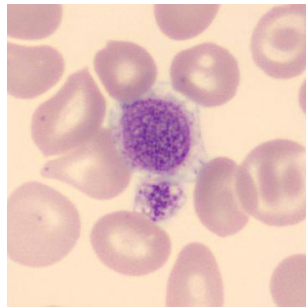
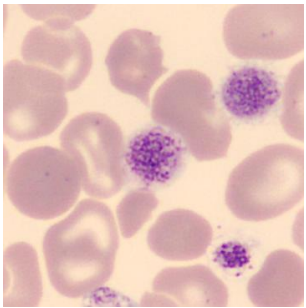
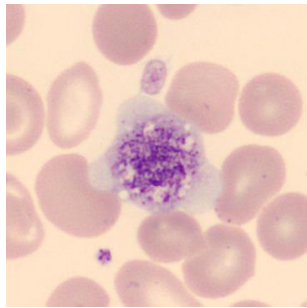
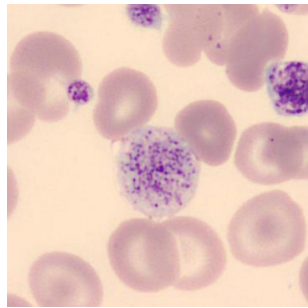
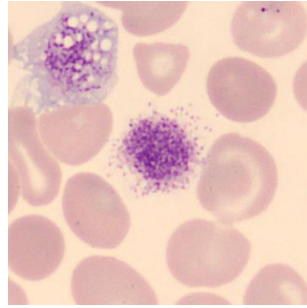
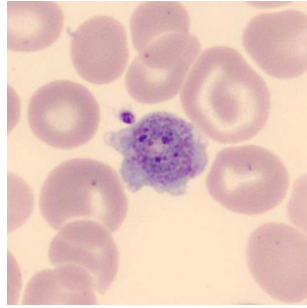
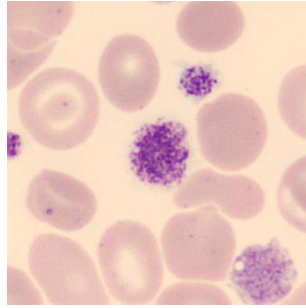
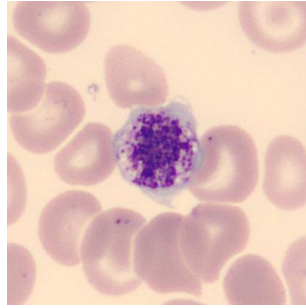
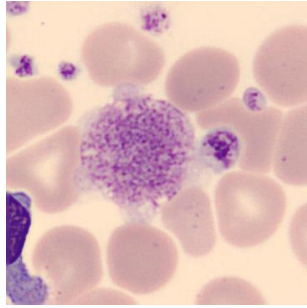
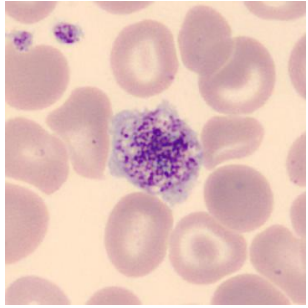


Sysmex XN (satelitismus + shluky)

CBC			DIFF			WBC Flag(s)		
Item	Data	Unit	Item	Data	Unit			
WBC	5.29	10 ⁹ /L	NEUT#	4.16	10 ⁹ /L			
RBC	4.30	10 ¹² /L	LYMPH#	0.55	10 ⁹ /L			
HGB	127	g/L	MONO#	0.50	10 ⁹ /L			
HCT	0.391	L/L	EO#	0.03	10 ⁹ /L			
MCV	90.9	fL	BASO#	0.05	10 ⁹ /L			
MCH	29.5	pg	NEUT%	78.6	%			
MCHC	325	g/L	LYMPH%	10.4	%			
PLT	129 *	10 ⁹ /L	MONO%	9.5	%			
RDW-SD	50.4	fL	EO%	0.6	%			
RDW-CV	15.2	%	BASO%	0.9	%			
PDW	13.9 *	fL	IG#	0.02	10 ⁹ /L			
MPV	11.7 *	fL	IG%	0.4	%			
P-LCR	37.5 *	%					RBC Flag(s)	
PCT	0.15 *	%						
NRBC#	0.00	10 ⁹ /L						
NRBC%	0.00	/100WBC						
RET							PLT Flag(s)	
Item	Data	Unit						
RET%		%						
RET#		10 ⁹ /L						
IRF		%						
LFR		%						
MFR		%						
HFR		%						
RET-He		pg						
						PLT Clumps?		

Makro/giga trombocyty

Impedanční princip započítá makrotrombocyty do erytrocytů



Postupy jak odhalit interference

1. Znáť dokonale princípy analyzátorů (možné interference na daném analyzátoru)
2. Vyloučit sraženinu (dřevěná špejle)
3. Vždy ověřovat *poprvé* $PLT \leq 100 \times 10^9/L$ mikroskopicky



Poprvé $PLT \leq 100 \times 10^9/L$
Opakovaně za definovaný čas /
velké kolísání hodnot

Ověřit mikroskopicky

Shluky?

NE

ANO

Zaznamenat ověření do LIS a
výsledkové listiny.
Blasty v nátěru?

NEVYDÁVAT hodnotu PLT!
Popř. ihned informovat lékaře!!
Vyšetřit z **ThromboExact** či
citrátu

všechny $PLT \leq 50 \times 10^9/L$

Přeměřit PLT-O / PLT-F

Patologické PLT hlášení
+ $PLT \leq 150 \times 10^9/L$

Přeměřit PLT-O / PLT-F



$PLT > 800 \times 10^9/L$

Zvážit dif mikroskopicky

Blasty
Dysgranularita
Posun doleva
mMGKCTy

Suspektní MPO

Mikroskopické ověření počtu trombocytů

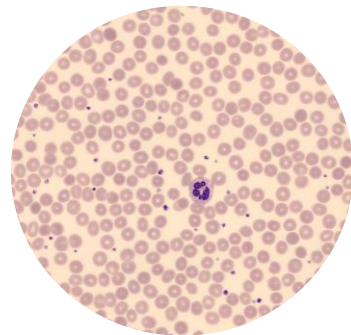
- ❑ Pokud nalezneme shluky PLT (nutno hodnotit i v okrajích/cípech preparátu!), hodnota trombocytů z analyzátrou je nevalidní a doporučíme odběr do **zkumavky s jiným protisrážlivým činidlem** (nejčastěji zkumavka ThromboExact = $MgSO_4$, citrát sodný, CTAD,...)
- ❑ Pokud nenalezneme shluky či satelitismus trombocytů, počet trombocytů lze orientačně ověřit z nátěru periferní krve (nízká přesnost stanovení, CV 10-25 %, u trombocytopenických vzorků CV až 40 %)
- ❑ Provádí se přepočtem na známý počet erytrocytů z KO
- ❑ Počítáme trombocyty na 1000 erytrocytů (5 zorných polí s cca 200 erytrocyty) a pak použijeme vzorec:

$$[PLT] \times 10^9/L = [PLT_{mikro}] / 1000 \text{ ERY} \times [RBC] \times 10^{12}/L$$

Příklad: mikroskopicky 50 trombocytů / 1000 ERY

RBC = $4,0 \times 10^{12}/L$

PLT = $200 \times 10^9/L$



Střední objem krevní destičky (MPV = Mean Platelet Volume)

Vyjadřuje průměrný objem hodnocených trombocytů

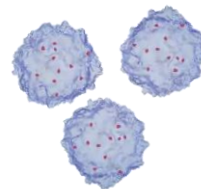
Jednotka: **fL**

MPV je přímo měřená veličina

Fyziologické hodnoty:

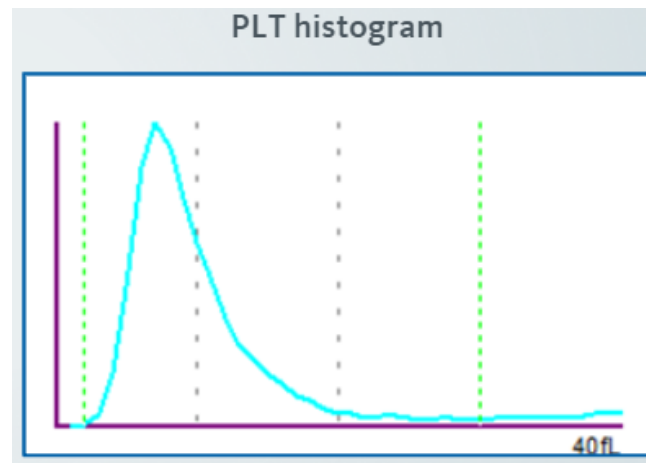
7,8 – 12,8 fL

Informuje o mikrotrombocytóze a makrotrombocytóze



! Při interpretaci nutné vyloučit případné shluky trombocytů

- Hodnoty nižší než referenční rozmezí: „ mikrotrombocytů “
- Hodnoty vyšší než referenční rozmezí: „ makrotrombocytů, gigantické trombocytů “



Šíře distribuce destiček (PDW = Platelet Distribution Width)

PDW reprezentuje šíři destičkového histogramu

Jde o šíři nejčetnějších populací trombocytů v jejich histogramu podle CV

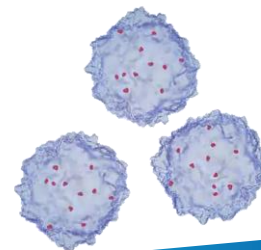
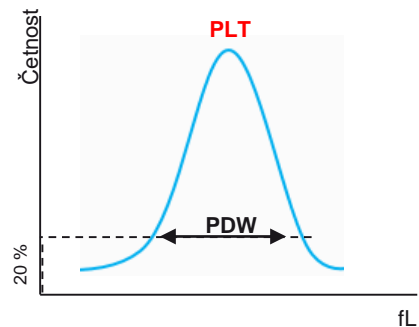
Jednotka:

- % (pokud se vychází z variačního koeficientu CV)
- fL (pokud se vychází ze směrodatné odchylky SD)

Fyziologické hodnoty:

- CV: 12 – 18 %
 - SD: 9 – 17 fL
-
- Informuje o anizocytóze trombocytů

❗ Při interpretaci nutné vyloučit případné shluky trombocytů



Destičkový hematokrit (PCT = Plateletcrit, trombokrit)

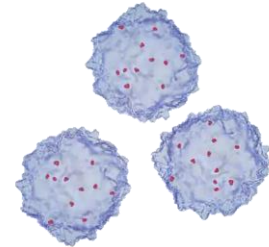
PCT nás informuje o tom, jakou část objemu v celkovém objemu plazmy zaujmají destičky

Jednotka: **ml/L**

Tato hodnota se získá ze vztahu: **$PCT = PLT \times MPV$**

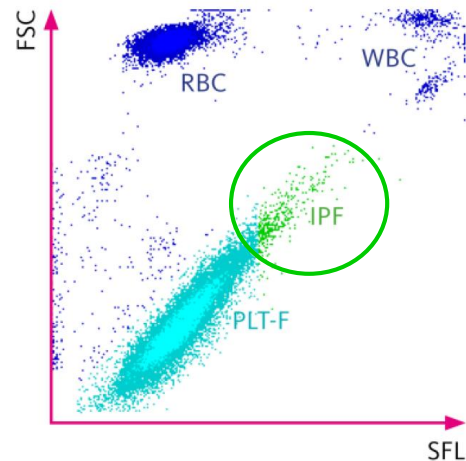
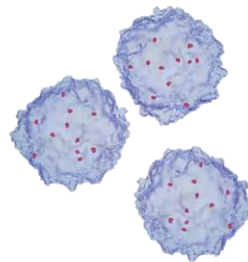
Fyziologické hodnoty:

- 1,2 - 3,5 ml/L



Frakce nezralých trombocytů (IPF = Immature platelet fraction)

- IPF vyjadřuje počet mladých (1-2 dny starých) trombocytů, které jsou retikulované - mají vyšší obsah RNA
- Jde o marker produkce trombocytů v kostní dřeni, podobně jako je počet retikulocytů markerem produkce erytrocytů
- Jednotka: %
- Fyziologické hodnoty:
Dospělí: 1 – 6 %
- Princip vyšetřování na analyzátorech:
 - Inkubace alikvoty plné krve s RNA barvou, RNA struktury se obarví
 - Počet se stanovuje na principu průtokové fluorescenční cytometrie



IPF pomáhá v diferenciální diagnostice trombocytopenií - k odlišení trombocytopenie způsobené sníženou produkcí trombocytů (nízká nebo normální hodnota IPF) od trombocytopenie způsobené zvýšenou destrukcí/spotřebou trombocytů (vysoká hodnota IPF)

Metrologická návaznost

SEKK

Divize EHK

Certifikace 2024 – hematologie

(příloha dokumentu Certifikace 2024 – obecný úvod)

KO – Krevní obraz

Zkouška	Referenční metoda	Certifikovaný referenční materiál	D _{max} pro EHK	Teoretický D _{max}	Typ AV
Leukocyty	Elektronické počítání v jednonálové impedanční apertuře		15 % (počet > 4 · 10 ⁹ /L) 18 % (počet ≤ 4 · 10 ⁹ /L)	15 %	CVP
Erytrocyty	Elektronické počítání v jednonálové impedanční apertuře		7 %	4,4 %	CVP
Hemoglobin	Fotometrická hemoglobinkyanidová	WHO International Standard, NIBSC code 98/708, JCCRM 912	6 %	4,2 %	CVP
Hematokrit	Mikrohematokritová		10 %	4 %	CVP
MCV			10 %	2,4 %	CVP
Trombocyty	Elektronické počítání v jednonálové impedanční apertuře		18 %	13 %	CVP



Průtoková cytometrie (CD41+CD61)

RET - Retikulocyty

Zkouška	Referenční metoda	Certifikovaný referenční materiál	D _{max} pro EHK	Teoretický D _{max}	Typ AV
Počet retikulocytů (analýzátor)	Průtoková cytometrie		40 %	17 %	CVP

Zdroje

Videa - analyzátoři: <https://www.corelaboratory.abbott/us/en/offerings/brands/alinity/Alinity-h-hematology-system.html> (Advanced MAPSS), hematologická linka <https://youtu.be/Qao813dmmPw?feature=shared>

Referenční meze (děti): https://labsekce.hematology.cz/wp-content/uploads/2023/12/Doporuceni_LS_CHS_CLS_JEP-Ref_meze_deti-KO_Diff_Ret_NRBC_v03_rev01.pdf

Referenční meze (dospělí): https://labsekce.hematology.cz/wp-content/uploads/2021/08/Doporuceni_LS_CHS_CLS_JEP-Ref_meze_dospeli-KO_Diff_Ret_NRBC_v02_rev02.pdf

https://www.youtube.com/watch?v=oeAp_EuYOqA

<https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/technologies/>

<https://www.youtube.com/watch?v=bYfZk9PU3XI>

<https://www.youtube.com/watch?v=lQmUN7dk4zQ>

<https://www.sysmex.cz/academy/klinicke-informace/nadstavbove-parametry/frakce-nezralych-trombocytu-ipf/>

Hematopoéza přehled: <https://www.sysmex-europe.com/academy/knowledge-centre/haematopoiesis/>

Děkuji za pozornost

