

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

**Srovnání patologických nálezů
na hematologickém analyzátoru
CellaVision DM96 s optickou mikroskopií**

The comparison of pathological findings in hemathological
analyzing machine CellaVision DM96 with optical microscopy

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Jana Zuchnická

Garant bakalářské práce z KBLV: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Lucie Šáchová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 15. 7. 2011

podpis:.....

Děkuji MUDr. Janě Zuchnické za odborné vedení, poskytnuté informace, rady a motivaci k sepsání této práce. Děkuji garantovi Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za pečlivé přečtení celého textu a připomínky, které pomohly odstranit určité jeho nejasnosti a nepřesnosti. Děkuji také upřímně svým kolegyním v laboratoři Ústavu klinické hematologie FN Ostrava za pomoc a podporu při psaní této práce.

Abstrakt

Diferenciální rozpočet leukocytů je i v současné době klinicky důležitým a často požadovaným laboratorním vyšetřováním.

Do nedávné doby bylo možné provádět toto laboratorní vyšetření pouze pomocí světelného mikroskopu, bylo časově náročné a vyžadovalo nepřetržitou přítomnost specialistů – cytologů na pracovišti.

Nová generace hematologických analyzátorů umožňuje provádět analýzu krevních nátěrů snadněji. V praxi je od roku 2004 používán nový digitální morfologický analyzátor CellaVision DM96 firmy Sysmex.

V experimentálním souboru bylo vyšetřeno 62 vzorků periferní krve od dospělých i dětských pacientů. Krevní obrazy byly stanoveny na analyzátoru Sysmex XE-5000. Diferenciální rozpočty leukocytů byly vyšetřeny na automatickém analyzátoru CellaVision DM96 a následně zhodnoceny pomocí světelného mikroskopu Olympus model BX41TF. Výsledky byly porovnány a statisticky vyhodnoceny. Získané výsledky prokázaly shodu v případě zralých a kvalitativně normálních elementů u většiny pacientů. Kvalitativně abnormální vzorky je ovšem nezbytné prohlédnout i mikroskopicky, obzvláště pokud se jedná o první záchyt. Klasický mikroskop je tedy v současné hematologické laboratoři i nadále nepostradatelný při analýze patologických nálezů.

Abstract

The leukocyte differential count is important and frequently demanded laboratory examination, even nowadays.

Until recently, there was a possibility to execute this laboratory examination only using the microscope. It was time-consuming and it required the continuous presence of specialists – cytologists– in the laboratory.

The new generation of hematological analyzers enables to execute the analysis of peripheral blood smears easier. In practice, there is being used the new digital morphological analyzer CellaVision DM96 by Sysmex corp. since the year 2004.

In the experimental file, there was 62 samples of peripheral blood examined from children and adult patients. Blood counts have been established on Sysmex XE-5000 analyzer. Differential counts of leukocytes were examined on CellaVision DM96 analyzer and then using the microscope Olympus BX41TF. The results were compared and statistically evaluated. Gained results proved sameness among the most of the patients. It is also necessary to check qualitatively abnormal samples under the microscope, especially when we are talking about the first detection. It implies that classical microscope is still essential during the analysis of pathological findings.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	8
I. ÚVODNÍ ČÁST	9
1. ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE	9
II. TEORETICKÁ ČÁST	10
1. HEMATOLOGIE.....	10
1. 1. Laboratorní diagnostika v hematologii	10
1. 1. 1. Krevní obraz	10
1. 2. Patofyziologie krve	11
1. 2. 1. Vývoj krevních buněk	11
1. 2. 2. Diferenciace a zrání krevních buněk.....	12
1. 2. 3. Tvorba a vývoj červených krvinek - erytropoéza.....	14
1. 2. 3. 1. Abnormality zralých červených krvinek	14
1. 2. 4. Tvorba a vývoj bílých krvinek - leukopoéza	16
1. 2. 4. 1. Vývoj granulocytů.....	16
1. 2. 4. 2. Vývoj monocyto-makrofágové řady.....	17
1. 2. 4. 3. Vývoj lymfocytů	17
1. 2. 4. 4. Vývoj megakaryocytů a vznik krevních destiček – trombocytů.....	18
2. CELLAVISION DM96.....	20
2. 1. Použití CellaVision DM96.....	20
2. 1. 1. Aplikace pro analýzu periferní krve	21
2. 1. 2. Aplikace pro analýzu tělních tekutin.....	21
2. 1. 3. Aplikace skenování nátěrů	21
2. 1. 4. Další možnosti využití	22
2. 2. Popis analyzátoru CellaVision DM96.....	23
3. MATERIÁL A METODY	24
3. 1. Biologický materiál	24
3. 2. Přístroje	24
3. 3. Reagencie	24
3. 4. Pappenheimova metoda	24
3. 4. 1. Zhotovení nátěru periferní krve	25
3. 4. 1. 1. Manuální zhotovení nátěrů.....	25
3. 4. 1. 2. Zhotovení nátěru na barvicím automatu	25

3. 4. 2. Fixace a barvení nátěrů	26
3. 4. 2. 1. Barvení manuální	26
3. 4. 2. 2. Barvení pomocí barvicího automatu Sysmex SP-1000i	26
3. 4. 3. Hodnocení nátěru periferní krve.....	27
3. 4. 3. 1. Mikroskopické hodnocení krevního nátěru	28
3. 4. 3. 1. 1. Kvantitativní hodnocení	28
3. 4. 3. 1. 2. Hodnocení relativního počtu	29
3. 4. 3. 1. 3. Hodnocení morfologických změn	29
3. 4. 3. 2. Hodnocení krevního nátěru pomocí CellaVision DM96	30
3. 5. Metoda regresní a korelační analýzy	35
III. PRAKTICKÁ ČÁST	36
1. CHARAKTERISTIKA VYŠETŘOVANÉHO SOUBORU	36
2. METODIKA VÝZKUMU	36
3. VÝSLEDKY	39
3.1. Metoda regresní a korelační analýzy	39
3. 2. Hodnocení morfologie erytrocytů a leukocytů	42
3. 2. 1. Hodnocení celého souboru	42
3. 2. 2. Hodnocení patologických nálezů	44
4. DISKUSE	46
5. ZÁVĚR	49
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51
PŘÍLOHY:	53

SEZNAM ZKRATEK

BE	blastické elementy
BTE	bazofilní tečkování erytrocytů
KO	krevní obraz
LIS	laboratorní informační systém
MCV	střední objem erytrocytu
N/C	nukleo-cytoplazmatický poměr
NRBC	erytroblasty
RBC	erytrocyty
PLT	trombocyty
SOP	standardní operační postup
WBC	leukocyty

I. ÚVODNÍ ČÁST

1. ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE

Laboratorní diagnostika se v posledních letech dynamicky rozvíjí, a to především s rozvojem moderní analytické techniky a informačních technologií. Laboratorní vyšetřovací metody jsou základem správné diagnózy většiny chorob, vyvíjejí se rychle nové a nové, stále citlivější a specifitější metody.

Hematologie patří mezi klasické obory laboratorní diagnostiky. Automatizace při vyšetření krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu bílých krvinek z periferní krve přináší řadu výhod, ve složitějších případech má však stále nezastupitelnou úlohu „manuální diferenciál“, tj. diferenciace buněk v optickém mikroskopu zkušeným laborantem. V posledních desetiletích je však zaznamenána také snaha o automatizaci analýzy krevních nátěrů.

V praxi je od roku 2004 používán nový automatický systém CellaVision DM96 firmy Sysmex určený k diagnostickému použití *in vitro*. Aplikace pro analýzu periferní krve je určena pro diferenciální rozpočet bílých krvinek, stanovení morfologie červených krvinek a odhad počtu krevních destiček.

Cílem této bakalářské práce je srovnání patologických výsledků krevního nátěru zhodnoceného pomocí automatického analyzátoru CellaVision DM96 a metodou optické mikroskopie pomocí světelného mikroskopu.

II. TEORETICKÁ ČÁST

1. HEMATOLOGIE

1. 1. Laboratorní diagnostika v hematologii

Hematologie je klinicko-laboratorní obor, u kterého stanovení přesné diagnózy závisí jak na pečlivém klinickém vyšetření, tak na kvalitním laboratorním zázemí. Proto je nutné hodnotit všechny aspekty vyšetření, tj. výsledky vstupních (screeningových) laboratorních vyšetření, vždy ve vztahu ke klinickému stavu nemocného (včetně anamnézy). Pokud po komplexním zhodnocení vznikne naléhavé podezření na krevní onemocnění, je indikováno podrobné hematologické vyšetření s využitím celé palety diagnostických možností (Zima, 2002).

Nedílnou součástí vyšetřovacího postupu jsou:

- anamnéza a fyzikální nález;
- laboratorní vyšetření, které dělíme na:
 - rutinní,
 - speciální,
 - doplňkové (Zima, 2002).

Mezi hematologická laboratorní vyšetření patří krevní obraz (KO) s diferenciálním rozpočtem leukocytů, stanovení počtu retikulocytů, hemokoagulační vyšetření a vyšetření kostní dřeně.

1. 1. 1. Krevní obraz

Krevní obraz patří mezi základní laboratorní vyšetření. Využívá se k diagnostice a ke sledování léčby různých nemocí (Pecka, 2010).

Analýza krevního obrazu se provádí na automatických analyzátoch krevních buněk. Hematologické analyzátory zaznamenaly v posledním desetiletí výrazný rozvoj v užitých technologiích. Měření na analyzátoch poskytují informace o počtu, velikosti, tvaru a složení krevních buněk. Použití jednotlivých principů umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzy všech prošliých buněčných elementů. Kombinací různých detekčních principů je možné velmi přesně stanovit i pětipopulační diferenciální

rozpočet leukocytů, absolutní a relativní počty retikulocytů a normoblastů z plné krve (Pecka, 2010).

Součástí vyšetření krevního obrazu je i morfologické vyšetření krevního nátěru, které se ovšem neprovádí rutinně, ale pouze v indikovaných případech. Při mikroskopickém vyšetření krevního nátěru získáme informaci o morfologii a velikosti erytrocytů, jejich tvaru, přítomnosti retikulocytů, o množství a zastoupení podtypů bílých krvinek, včetně nezralých forem bílé krevní řady, které se v periferním krevním obraze objevují za chorobných stavů a morfologických anomálií všech krevních řad (Zima, 2002).

1. 2. Patofyziologie krve

1. 2. 1. Vývoj krevních buněk

Místem tvorby převážné většiny krevních elementů v dospělosti je kostní dřeň, jejíž celková hmotnost u dospělého jedince činí 1600 - 3000 gramů. Mikroskopickou architekturu krvetvorné tkáně tvoří síť retikulárních buněk a vláken, v níž jsou pak uloženy vlastní elementy vývojových řad a rozsáhlý systém krevních sinusů (Klener, 2003).

Krevní buňky jsou derivátem mezenchymových nediferencovaných buněk, ze kterých se diferencují hemocytoblasty. Hemocytoblasty jsou totipotentní buňky ve smyslu hematopoézy, tj. dávají vznik kmenovým buňkám všech krevních řad, a pluripotentní ve smyslu obecné diferenciaci, tj. dávají vznik jen určitým, avšak několika rozdílným buněčným řadám, resp. liniím (Kozák, 2001).

Z genetického hlediska dochází u nich k derepresi těch genů, které určují další diferenciaci buňky směrem ke krevním buňkám. Do jisté míry je dokladem toho specifická morfologie a složení buněk jednotlivých krevních řad, včetně specifických genotypických markerů na jejich povrchu (Kozák, 2001).

Denní produkce krevních buněk kostní dřeně je ohromná a dosahuje u dospělého člověka více než 215 miliard buněk. Ani tato obrovská aktivita však nepředstavuje plnou sílu kostní dřeně a za určitých okolností se může několikanásobně zvýšit. Možnost zvýšení produkce je dána tím, že kostní dřeň obsahuje velkou rezervu kmenových krevních buněk, a to i kmenových buněk pluripotentních (Kozák, 2001).

1. 2. 2. Diferenciace a zrání krevních buněk

Krevní elementy pocházejí z nediferencované pluripotentní kmenové buňky, která má schopnost diferenciace a vlastní sebeobnovy (Klener, 2003).

Diferenciaci krevních buněk a některé jejich funkce ovlivňují četné humorální faktory (Klener, 2003), mající charakter glykoproteinů. Z nich je nejvíce známý erythropoetin vedoucí k diferenciaci do červené řady. GM-CSF (tj. granulo-makrofágové kolonie stimulující faktor) podněcuje diferenciaci do granulocytů a monocytové-makrofágové řady. G-CSF (tj. granulocytové kolonie stimulující faktor) podněcuje diferenciaci granulocytů. M-CSF (tj. makrofágové kolonie stimulující faktor) podněcuje tvorbu makrofágů a trombopoetin stimuluje tvorbu krevních destiček (Kozák, 2001).

Podobný účinek na diferenciaci a produkci buněk jednotlivých krevních řad jako růstové faktory mají také některé interleukiny a interferony. Z nich je to zejména interleukin 3, který stimuluje progenitorové buňky všech krevních řad. Dále interleukin 1 (hematopoetin), který mj. potencuje odpověď kmenových buněk na specifické růstové faktory. Interleukin 4 (B Stimulating Factor) je růstovým faktorem pro B-lymfocyty. Interleukin 5 (B-Cell Growth Factor) stimuluje diferenciaci B-lymfocytů a tvorbu specifických protilátek. Přisuzuje se mu rovněž stimulační efekt na eozinofilní granulocyty. Podobný efekt na B-lymfocyty má i interleukin 6. Prostřednictvím těchto růstových faktorů působí na krvetvorbu i další faktory, včetně hormonů a autonomního nervového systému. Za fyziologických okolností faktory ovlivňující hematopoézu působí ve vzájemné souhře (Kozák, 2001).

Významnou úlohu pro proliferaci kmenových buněk mají i vnitřní faktory zakotvené v genetické výbavě každé buňky. Z nich nejvíce jsou předmětem současného výzkumu buněčné protoonkogeny, z nichž některé přímo podmiňují syntézu růstových faktorů nebo receptorů buněk, na které růstové faktory působí. Při výčtu faktorů účastnících se regulace krvetvorby nelze opomenout ani úlohu látek nezbytných pro tvorbu krvinek. Z těchto látek jsou obecně známy vitamíny, jako je vitamín C, B₆ a B₁₂ a další látky, jako je kyselina listová a kovy (z nich zejména Fe, Cu, Co) atd. (Kozák, 2001).

Pluripotentní kmenová buňka se diferencuje na progenitorové kmenové buňky, které jsou zasvěcené – určené pro další diferenciaci do jedné nebo několika krevních řad. Sebeobnova progenitorových kmenových buněk je velmi malá, na rozdíl od schopnosti další diferenciace. Většina těchto buněk je také za fyziologických okolností v cyklu, tj. dále se dělí – proliferuje. Tyto buňky vzniklé účinkem příslušných

specifických faktorů se nazývají podle toho, jakým směrem jsou diferencovány (Kozák, 2001).

Rozeznáváme:

Pluripotentní progenitorové buňky, které jsou schopny diferenciaci do více krvetvorných řad:

- CFU-GEMM – smíšený myeloidní progenitor, diferencuje se do granulocytové, erytroidní, megakaryocytové a makrofágové řady,
- CFU-L – lymfoidní progenitor, dává vznik oběma liniím lymfocytu (T i B)

Determinované progenitorové buňky, které jsou již zadány pro vznik jedné (vyjíměčně dvou) buněčných řad:

- CFU-GM – granulocyto-makrofágový progenitor,
- CFU-G – granulocytový progenitor, více vyžralá buňka nežli předchozí, dává vznik neutrofilům,
- CFU-M – monocytový progenitor, dává vznik monocytům a makrofágům,
- CFU-Eo – eozinofilní progenitor,
- CFU-Ba – bazofilní progenitor,
- CFU-Meg – progenitor pro megakaryocyty,
- BFU-E – méně vyžralý progenitor červené krevní řady,
- CFU-E – erytroidní progenitor, vyžralejší buňka červené řady (Lexová, 2000).

Progenitorové kmenové buňky se dále diferencují na prekurzorové buňky, které jsou již poměrně přesně definovatelné mikroskopickými metodami. Další diferenciaci a zrání prekurzorových buněk jednotlivých krevních řad má některé společné rysy. Obecně platí, že pro další diferenciaci a zrání prekurzorových kmenových buněk, tj. proerytroblastů, myeloblastů, monoblastů, megakaryoblastů a lymfoblastů, je charakteristické hrubnutí – kondenzace chromatinové struktury buněčného jádra. Ta je vlastně morfologickou expresí její biosyntetické inaktivace. Terminální fází zrání normoblastů či patologických megaloblastů dochází dokonce ke ztrátě jádra. Dalším znakem pokračující diferenciaci a zrání krevních buněk všech řad je postupné snižování aktivity jadérek, tj. transkripce ribozomální kyseliny ribonukleové. To se projevuje tím, že velká aktivní jadérka se zmenšují, dochází k jejich transformaci na jadérka prstenčítá, a nakonec až na velmi malé mikronukleoly, které jsou morfologickou expresí ireverzibilní inhibice transkripce této kyseliny (Kozák, 2001). Zralé krevní elementy jsou vyplavovány do obvodové krve (Klener, 2003).

1. 2. 3. Tvorba a vývoj červených krvinek - erythropoéza

Diferenciace a zrání červených krvinek probíhá v kostní dřeni a za fyziologických stavů jsou v periferní krvi jen zralé erytrocyty a malý počet retikulocytů. Vývoj a zrání erytroblastů v kostní dřeni trvá kolem jednoho týdne a doba života červené krvinky v periferní krvi je kolem 120 dní (Kozák, 2001).

Základní charakteristikou málo diferencovaných a nezralých lidských červených krvinek je jejich jadernost. Ke ztrátě jádra dochází po vyhasnutí jeho biosyntetické aktivity až ve zralých erytrocytech. Souběžně s vývojem buněk červené řady dochází ke zmenšování jejich velikosti (Kozák, 2001).

Normoblastová vývojová řada

- Proerytroblast
- Makroblast
- Bazofilní normoblast
- Polychromatofilní normoblast
- Ortochromatofilní normoblast
- Retikulocyt
- Erytrocyt

Normální erytrocyty (normocyty) jsou bezjaderné neúplné buňky bikonkávního diskoidního tvaru s centrálním projasněním o průměru 6,7 až 7,7 μm . Vnitřek červených krvinek je vyplněn hemoglobinem (Pecka, 2002).

Během diferenciace a zrání erytroblastů může dojít k řadě abnormalit, které bývají označovány jako dysplastické a často vyúsťují v tzv. inefektivní erythropoézu (Kozák, 2001).

1. 2. 3. 1. Abnormality zralých červených krvinek

Abnormality zralých červených krvinek registrovatelné morfologicky se rozdělují na abnormality velikosti, tvaru, struktury a barvitelnosti (Kozák, 2001).

Odchytky velikosti

Mikrocyty - erytrocyty s menším průměrem než 6,7 μm a se střední hodnotou objemu (Mean Corpuscular Volume – MCV) pod 80 fl.

Makrocyty a megalocyty - erytrocyty jejichž průměr je větší než 7,7 μm a MCV větší než 95 fl (Kozák, 2001).

Odchylky tvaru

Sférocyty - kulovitěho nebo bochníkovitěho tvaru.

Ovalocyty - oválněho tvaru.

Eliptocyty - eliptickěho tvaru, někdy až tvaru doutníku.

Leptocyty (terčovitě erytrocyty) - tenké erytrocyty chudé na hemoglobin, který je uložen na obvodě a v centru krvinky - v místě, kde se velká membrána nedostatečně vyplněného erytrocytu mírně vyklenuje (připomínají mexický klobouk).

Drepanocyty - mají úzký měsíčkovitě až srpkovitě tvar.

Poikilocyty - různěho, někdy až bizarněho tvaru, nejčastěji mají tvar visící vodní kapky nebo hrušky.

Schistocyty - útržky erytrocytů, často tvaru helmice či prasklé vaječné skořápky, vznikající přetržením erytrocytu na fibrinových vláčkách.

Akantocyty - erytrocyty s ostnatými výběžky.

Echinocyty - připomínají zdánlivě konfiguraci povrchu ježka.

Stomatocyty - tvaru pootevřených úst.

Dakryocyty - tvaru slzy nebo kapky.

Keratocyty - rohovitě erytrocyty, které mohou mít jeden nebo dva výběžky.

Knizocyty - mají most z hemoglobinu přes své centrální pole, to vede ke dvěma a více vpáčením membrány (trikonkávni tvar) (Pecka, 2006).

Strukturní abnormality

Bazofilní tečkování erytrocytů - jemná, sytě tmavomodrá zrnka v erytrocytech, jsou zbytkem bazofilní cytoplazmy erytroblastů.

Heinzova tělíška - jsou denaturovaným hemoglobinem, na obvodu červené krvinky tvoří oválné, modře se barvící útvary.

Howellova-Jollyho tělíška - vznikají pravděpodobně ze zbytků jaderných chromozomů, jsou to 1 až 3 červenofialová až zářivě červeně zbarvená kulovitá tělíška.

Cabotovy-Schleipovy prstence - jsou zbytkem jaderné membrány erytroblastů, nacházíme fialově červené až tmavě červené tenké kroužky, kličky nebo smyčky.

Pappenheimerova tělíška - jsou granula obsahující železo, která jsou viditelná v běžném panoptickém barvení tehdy, je-li železo agregováno s mitochondriemi a ribozómy (Pecka, 2006).

Odchylky barvitelnosti

Při správném panoptickém barvení mají všechny erytrocyty podobné zbarvení do růžova, při přebarvení do hněda. U chorobných stavů se erytrocyty mohou zbarvit různě (Pecka, 2006).

Hypochromie svědčí pro nízký obsah hemoglobinu v erytrocytu (Kozák, 2001), centrální projasnění erytrocytu je výraznější.

Anulocyty jsou erytrocyty velmi chudé na hemoglobin, který je uložen na obvodu krvinky v podobě prstence (Pecka, 2006).

Při polychromazii nacházíme erytrocyty s modravým nebo šedofialovým nádechem (Pecka, 2006), erytrocyty obsahují stále větší množství RNA a to svědčí pro překotnou denukleariaci ještě v ne zcela zralém erytoblastu při překotném a urychleném vyplavování červených krvinek z kostní dřeně z nejrůznějších příčin (Kozák, 2001).

Anizochromie svědčí pro nestejný obsah hemoglobinu v erytrocytech, a to vede k jejich odlišné barvitelnosti, nacházíme erytrocyty, které se barví normálně i erytrocyty, které se barví slabě (Pecka, 2006).

1. 2. 4. Tvorba a vývoj bílých krvinek - leukopoéza

1. 2. 4. 1. Vývoj granulocytů

Vývoj granulocytů se za normálních okolností odehrává v kostní dřeni a trvá déle než jeden týden. Doba, po kterou jsou neutrofilny – počínaje neutrofilní tyčkou – v periferní krvi, je jen několik hodin, u eozinofilů a bazofilů až jeden týden. Určité množství granulocytů v periferní krvi necirkuluje, ale je pod vnitřním povrchem cév, kde vytváří snadno mobilizovatelnou zásobu označovanou jako marginální (Kozák, 2001).

Charakteristickým znakem buněk granulocytové řady je tvorba granul v jejich cytoplazmě, která začíná již v prekurzorové kmenové buňce (Kozák, 2001). Rozeznáváme granulaci primární – azurofilní a sekundární – specifickou. Azurofilní granulaci lze pozorovat již v myeloblastech, pak se její množství zvyšuje v promyelocytech, od stadia myelocytů opět její zastoupení ubývá. V metamyelocytech již jen vzácně najdeme ojedinělá azurofilní granula. Sekundární – specifická granulace je trojího typu – neutrofilní, eozinofilní a bazofilní. Tento typ granulace se objevuje v myelocytech, nejprve v oblastech cytoplazmy v okolí buněčného jádra a přetrvává i ve zralých efektorových buňkách periferní krve (Lexová, 2000).

Vývojová řada granulocytů

- Myeloblast
- Promyelocyt
- Myelocyt neutrofilní, eozinofilní, bazofilní
- Metamyelocyt neutrofilní, eozinofilní, bazofilní
- Tyč neutrofilní, eozinofilní, bazofilní
- Segment neutrofilní, eozinofilní, bazofilní

1. 2. 4. 2. Vývoj monocyto-makrofágové řady

Buňky monocytové řady vznikají v kostní dřeni z prekurzorové kmenové buňky - monoblastu (Kozák, 2001). Nezralé monocyty neboli promonocyty jsou méně pohyblivé než monocyty a méně schopné fagocytózy. V kostní dřeni se z promonocytu stává monocyty po dvou mitózách v průběhu 2 až 2,5 dne. Na rozdíl od jiných efektorových buněk periferní krve je monocyty považován za nezralý element. Z cirkulující krve, kde přebývá asi 12 hodin, se dostává dále do tkání, kde delší dobu přežívá a diferencuje se na specifické typy makrofágů v závislosti na místě vyzrávání. Nevyzrálost monocytů je dokumentována i tím, že 50 % monocytů periferní krve má přítomna jádérka prokazatelná pomocí elektronové mikroskopie (Lexová, 2000).

Vývojová řada monocytu

- Monoblast
- Promonocyty
- Monocyty

1. 2. 4. 3. Vývoj lymfocytů

Lymfocyty vznikají diferenciací pluripotentní kmenové buňky na bipotentní progenitorové lymfoidní buňky v kostní dřeni, od kterých se odvozují dvě funkčně odlišné hlavní řady lymfocytů, tj. lymfocyty B a T se svými prekurzory – nezralými lymfocyty, podle místa vzniku a zrání. Označení B-lymfocyty pochází od Fabriciovy burzy u ptáků, která ovšem u savců není vyvinuta, a B-lymfocyty se prvotně diferencují v kostní dřeni. Označení T-lymfocyty je odvozováno od thymu, kde se tato buněčná řada diferencuje. Primárními lymfopoetickými orgány jsou tedy kostní dřeň a thymus, odkud lymfoidní buňky migrují do sekundárních lymfatických tkání a orgánů, ke kterým se řadí slezina, lymfatické uzliny a lymfatické tkáně ve sliznicích trávicího a dýchacího ústrojí (Kozák, 2001).

Většina lymfocytů přežívá dlouho, obvykle 4 roky. Některé však mohou přežít i 10 let, asi 15 % lymfocytů jsou krátce přežívající, jen 3 - 4 dny. Lymfocyty, které nacházíme v periferní krvi, obvykle putují z jedné lymfatické tkáně do druhé nebo do místa zánětu (Lexová, 2000).

Antigenní stimulace přeměňuje krátce žijící, necirkulující lymfocyty na dlouho žijící, recirkulující buňky. V průběhu imunitní odpovědi se může zvýšit průtok lymfatickou uzlinou až čtyřnásobně. V průběhu transformace lymfocytů po jejich antigenní stimulaci dochází i k morfologickým změnám v těchto buňkách. Takto změněné lymfocyty mohou být nalezeny v nátěrech periferní krve u řady infekčních,

zvláště pak virových onemocnění. Jsou nazývány atypické lymfocyty (také virocyty, variantní lymfocyty, leukemoidní lymfocyty, reaktivní lymfocyty, retikulární lymfocyty, transformované lymfocyty). Pro přechodné formy vývoje B-lymfocytů do buněk plazmatických se používá popisných termínů plazmocytoidní lymfocyty nebo lymfocytoidní plazmatické buňky (Lexová, 2000).

Plazmatické buňky představují konečné stádium vývoje B-lymfocytů do efektorových buněk. Po antigenní stimulaci přechází nejprve B-lymfocyt do blastického stádia, pak se vyvíjí do buňky plazmatické. Tyto buňky obsahují dobře rozvinuté hrubé endoplazmatické retikulum, které produkuje imunoglobuliny. Velké množství ribozomů se odrazí v bazofilií cytoplazmy a za určitých patologických stavů může produkce imunoglobulinů změnit obvyklý vzhled plazmatických buněk (Lexová, 2000).

Vývojová řada lymfocytu

- Lymfoblast
- Prolymfocyt
- Lymfocyt

1. 2. 4. 4. Vývoj megakaryocytů a vznik krevních destiček – trombocytů

Destičkotvorná megakaryocytová řada hematopoetické kostní dřeně je odvozena od progenitorových buněk CFU-Meg, ze kterých se diferencuje prekurzorová buňka megakaryoblast. Tato buňka s velkým jádrem, jemnou chromatinovou strukturou a aktivními jadérky je největší z blastů v kostní dřeni. Tato se po endomitóze stane tetraploidní a následným dělením dá vznik promegakaryocytu, ve kterém opět může proběhnout endomitóza a ze kterého vzniká po dalším mitotickém dělení zralý megakaryocyt. Megakaryocyt se pak dále již nedělí, avšak další endomitózy vedou k vytvoření obrovského polyploidního jádra. Původní bazofilie cytoplazmy megakaryoblastu během vývoje mizí a v cytoplazmě megakaryocytů dojde k vytváření jemných azurofilních granul. V zóně mezi perinukleárním prostorem a periférií megakaryocytu se tvoří demarkační váčky a tubuly endoplazmatického retikula, které ohraničí úseky cytoplazmy, z nichž se oddělením stanou krevní destičky. Doba diferenciací a maturace megakaryocytů se pohybuje kolem 10 dnů (Kozák, 2001).

Megakaryocyty jsou v kostní dřeni lokalizovány v těsné blízkosti stěny dřeňových sinusů, do nichž jsou uvolňovány v průběhu několika hodin trombocyty z jednotlivých megakaryocytů (2000-4000 elementů z každé buňky). Trombocyty přežívají v periferní krvi 7-11 dní. Dvě třetiny vzniklých trombocytů cirkuluje v periferní krvi, zatímco zbylá jedna třetina tvoří slezinný destičkový pool (Lexová, 2000).

Vývojová řada trombocytu

- Megakaryoblast
- Promegakaryocyt
- Megakaryocyt
- Trombocyt

Krevní destička je bezjaderný útvar o průměru 3 μm se středním objemem přibližně 10 fl. Při běžném panoptickém barvení je cytoplazma krevních destiček lehce bazofilní (hyaloméra) a obsahuje několik jemných azurofilních granul (granuloméra) (Kozák, 2001).

2. CELLAVISION DM96

2. 1. Použití CellaVision DM96

CellaVision DM96 je automatický systém určený k diagnostickému použití *in vitro*.

- Snímá uživatelem definovanou část mikroskopického sklíčka.
- Automaticky vyhledá a prezentuje snímky buněk na nátěrech periferní krve, tělních tekutin, kostní dřeně a preparátů patologických laboratoří.
- Je určený pro kvalifikovanou obsluhu (Příručka uživatele CellaVision DM96).



Obr. 1: Automatický analyzátor CellaVision DM96 (Příručka uživatele CellaVision DM96)

2. 1. 1. Aplikace pro analýzu periferní krve

Aplikace pro analýzu periferní krve (PB) je určena pro diferenciální rozpočet bílých krvinek, stanovení morfologie červených krvinek a odhad počtu krevních destiček. Systém automaticky vyhledá a prezentuje snímky krevních buněk v nátěrech periferní krve na základě více než 300 charakteristických parametrů. Obsluha určí a ověří navrženou klasifikaci každé buňky dle typu (Příručka uživatele CellaVision DM96).

Technické parametry analyzátoru:

- Zásobník pro 96 nátěrů v 8 stojancích, z nichž každý je pro 12 nátěrů.
- Automatické vložení a uchycení preparátu, předběžné zhodnocení buněk (pre-klasifikace) na minimálně 100 leukocytů (počet hodnocených buněk definuje uživatel).
- Objektivy: 10x, 50x, 100x.
- Automatické dávkování imerzního oleje na nátěry.
- Rychlost analýzy: 40 nátěrů/hod.
- Pre-klasifikace buněk na základě více než 300 charakteristických parametrů.
- Pre-klasifikace leukocytů do 18 buněčných typů.
- Pre-klasifikace morfologického hodnocení erytrocytů (www.sysmex.cz).

2. 1. 2. Aplikace pro analýzu tělních tekutin

Aplikace pro analýzu tělních tekutin (BF) je určena ke stanovení diferenciálního rozpočtu bílých krvinek. Systém automaticky vyhledá (pre-klasifikuje) leukocyty do 5 buněčných typů a prezentuje snímky krevních buněk v nátěrech z odstředěných vzorků tělních tekutin zpracovaných metodou cytopsinu. Obsluha určí a ověří navrženou klasifikaci každé buňky dle typu při zobrazení vzorku ve zvětšení 10x, 50x (Příručka uživatele CellaVision DM96; www.sysmex.cz).

2. 1. 3. Aplikace skenování nátěrů

Aplikace pro skenování nátěrů je určena pro skenování nátěrů kostní dřeně, periferní krve a preparáty patologických laboratoří. Systém neprovádí předběžnou klasifikaci buněk. Pro analýzu je vhodné předem nadefinovat oblast skenování, protože nátěr na celém skle by přístroj skenoval velmi dlouho. Skenování vybrané oblasti trvá asi 15 až 20 minut (podle buněčnosti nátěru). Obsluha na obrazovce prohlíží jednotlivé

buňky skenu (zvětšení 10x, 50x), které může libovolně zvětšit či zmenšit. Zajímavá místa lze zaaretovat a přidat k nim komentář, snadno je pak lze najít a uložit do databáze. Tento mód je možné využít i pro hodnocení buněčnosti kostní dřene (Juránová, 2010).

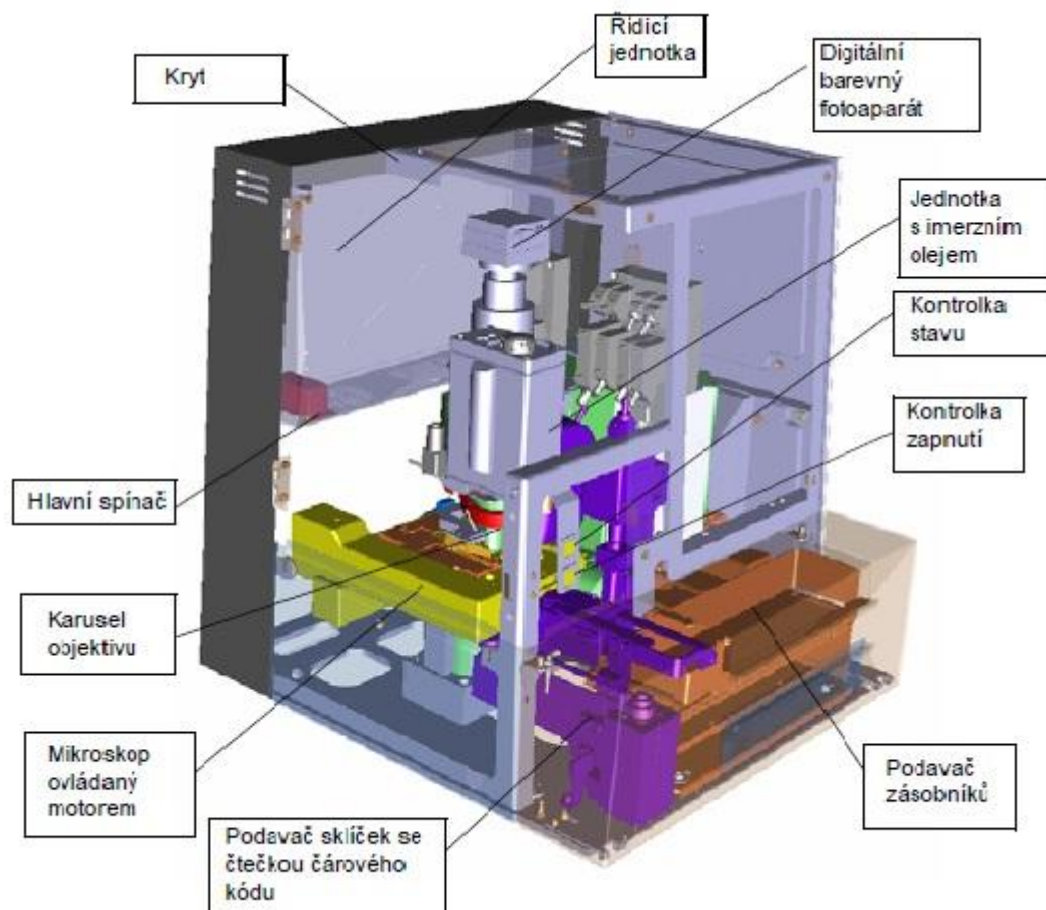
2. 1. 4. Další možnosti využití

- Možnost definice morfologických kategorií buněk uživatelem.
- Všechny snímky buněk a výsledky se ukládají do databáze.
- Možnost zpětného vyhledání výsledků a všech snímků buněk.
- Pomoc při edukaci pracovníků a studentů.
- Centrální databáze pro několik pracovních stanic, přístup z jakéhokoli místa prostřednictvím programu dálkové kontroly CellaVisionTM.
- Přístup k intranetu, internetu a e-mailovému serveru – možnost posílání obrázků buněk e-mailem, telehematologie (www.sysmex).

2. 2. Popis analyzátoru CellaVision DM96

System se skládá z těchto hlavních jednotek:

- počítačový systém - obsahuje akviziční a klasifikační software CellaVision^R DM
- jednotka snímání sklíček (SSU):
 - mikroskop ovládaný motorem
 - digitální barevný fotoaparát
 - jednotka s imerzním olejem
 - podavač sklíček se čtečkou čárového kódu
 - podavač zásobníků
 - řídicí jednotka
 - kryt (Příručka uživatele CellaVision DM96).



Obr. 2: Jednotka snímání sklíček (SSU) (Příručka uživatele CellaVision DM96)

3. MATERIÁL A METODY

3. 1. Biologický materiál

- Žilní, kapilární nebo venózní krev odebraná do K₃EDTA.
- Stabilita vzorku v protisrážlivém činidle je 5 hodin (při laboratorní teplotě) (Bourková, 2006, Pecka, 2010).

3. 2. Přístroje

- Hematologický analyzátor Sysmex XE-5000, Sysmex
- Nátěrový automat Sysmex SP-1000i, Sysmex
- Spojovací linka Sysmex SPSU, Sysmex
- Digitální morfologický analyzátor CellaVision DM96, Sysmex
- Mikroskop Olympus model BX41TF

3. 3. Reagencie

- May-Grünwald en solution, Reactifs RAL (kat.č. 320070)
- Colorant de Giemsa R en solution, Reactifs RAL (kat.č. 320310)
- Metanol
- Fosfátový pufr, pH 6,7-6,8
- Destilovaná voda
- Imerzní olej, Olympus
- Benzín

3. 4. Pappenheimova metoda

Princip metody: provádí se zhotovení, fixace, panoptické barvení a hodnocení nátěru periferní krve. Při diferencování se zjišťuje početní zastoupení jednotlivých morfologických typů buněk bílé krevní řady v obarveném nátěru obvodové krve a současně se posuzuje morfologie elementů všech krevních řad (Ecole Nationale de Chimie 1980, převzato z Pecka, 2010).

3. 4. 1. Zhotovení nátěru periferní krve

Zhotovení kvalitního nátěru periferní krve je velmi důležité pro jeho další analýzu. Pokud se hodnotí zejména morfologie volí se spíše tenké nátěry, u leukopenií se požadují spíše silnější nátěry. Sílu nátěru lze ovlivnit úhlem, který svírá roztěrové sklíčko s podložním sklíčkem. Přičemž platí, čím větší úhel, tím je nátěr kratší a hustší (Pecka, 2010). Nátěry lze zhotovit buď manuálně nebo se získávají na barvicích automatech.

3. 4. 1. 1. Manuální zhotovení nátěrů

Spotřební materiál:

- podložní sklo se zabroušenými okraji,
- roztěrové sklo,
- Pasteurova pipeta nebo speciální přípravky/aplikátory k nanášení krve z odběrové nádoby na podložní sklo,
- celulózová vata – přířezy, čtverečky,
- ochranné rukavice.

Postup: kapka krve se kápne do středu podložního sklíčka asi v $\frac{1}{4}$ od okraje sklíčka. Roztěrové sklo se přiloží pod úhlem 30 - 40° před kapku (krev se vlivem vztlakovosti rozprostře po celém okraji skla) a lehkým, rovnoměrným pohybem směrem ke kapce a pak k opačnému konci podložního sklíčka se zhotoví nátěr. Nátěr musí být rovnoměrný, stejnorodý a přiměřeně tenký, musí mít dlouhé rovné okraje a cca 2 cm před koncem sklíčka přecházet do ztracena. Hotový nátěr se nechá na vzduchu dobře zaschnout. Sklíčko se označí identifikačními údaji pacienta (minimálně datem odběru a jménem pacienta) (Pecka, 2010).

3. 4. 1. 2. Zhotovení nátěru na barvicím automatu

V současné době se nejhodnější nátěry se standardní a srovnatelnou úrovní získávají na barvicích a nátěrových automatech (Pecka, 2010).

Po změření krevního obrazu analyzátor automaticky vyhodnotí na základě textových hlášení ty krevní obrazy, u kterých bude proveden nátěr. Automatická hematologická nátěrová jednotka Sysmex SP-1000i při zhotovení nátěru přihlíží při nastavení sklonu roztěrového skla k hodnotě hematokritu (Příručka uživatele CellaVision DM96). Zhotovení nátěru lze zadat i dodatečně manuálně zadáním identifikačních údajů pacienta a zvolením hematokritové hodnoty.

3. 4. 2. Fixace a barvení nátěrů

Správné obarvení krevního nátěru je neméně důležité pro jeho další diagnostiku. Je proto nutné dodržovat standardní operační postupy pro dané pracoviště a obecná doporučení ČHS ČLS JEP.

Zhotovené a suché nátěry periferní krve fixujeme roztokem May-Grünwald a barvíme roztokem Giemsa-Romanowski. Tato barviva představují neutrální směsi s velmi charakteristickými vlastnostmi. Nemají barvicí schopnost v alkoholovém prostředí. Ta se projevuje selektivně až po přidání do vodného roztoku fosfátového pufru. Pufír vyvolá precipitaci neutrálních barviv. Zbytek barviva se vymývá vodou o neutrálním pH (Pecka, 2010).

Základem tohoto barvení jsou:

- a) kationtové (zásadité) barvivo azur B: váže se na aniontové části molekul a barví modrošedě nukleové kyseliny (DNA nebo RNA), nukleoproteiny, granule bazofilů a sekundární granula neutrofilů.
- b) aniontové (kyselé) barvivo eozin Y: váže se na kationtové části molekul proteinů a barví oranžovočerveně hemoglobin a eozinofilní granula.

Při barvení vznikají různé kombinace těchto dvou základních barviv (Bourková, 2006, Pecka, 2010).

3. 4. 2. 1. Barvení manuální

Postup:

1. Rovnoměrné nátěry krve na skle je nutné nechat minimálně 10 minut zaschnout při laboratorní teplotě.
2. Nátěry fixovat 5 minut fixačním roztokem May-Grünwald.
3. Nátěry fixovat 3 minuty fixačním roztokem May-Grünwald ředěným fosfátovým puftrem v poměru 1:1.
4. Nátěry barvit 30 minut barvicím roztokem Giemsa R ředěným fosfátovým puftrem v poměru 1:10
5. Nátěry řádně opláchnout pod tekoucí vodou a nechat zaschnout (SOP).

3. 4. 2. 2. Barvení pomocí barvicího automatu Sysmex SP-1000i

Sysmex SP-1000i je plně automatizovaná nátěrová a barvicí jednotka pro hematologické účely, která je určena k provedení nátěru z aspirované krve až po jeho obarvení. Tímto je nátěr připraven k mikroskopování (SOP; Manuál Sysmex SP-1000i).

Barvení pro automatickou digitální morfologii je stejné jako pro mikroskopii. Používá se Pappenheimova metoda panoptického barvení (May-Grünwald a Giemsa R). Barvení pro automaty musejí mít menší intenzitu než pro mikroskopování, aby byly na fotografiích dobře rozpoznatelné kontury buněčného jádra, cytoplazma a v ní obsažená granula (Juráňová, 2010), proto je proces barvení kratší.

Princip: Po změření krevního obrazu na analyzátoru XE-5000 firmy Sysmex analyzátor automaticky vyhodnotí ty krevní obrazy, u kterých bude proveden nátěr. Stojan se zkumavkou je posouván směrem k nátěrovému a barvicímu automatu. Provedení nátěru, panoptické barvení i sušení nátěru probíhá v SP-1000i automaticky. Výsledkem procesu je nabarvené podložní sklíčko opatřené kódem se jménem pacienta a číslem vzorku. Je možno provádět také barvení manuálně připraveného nátěru. Takto zhotovený nátěr se označí čárovým kódem pacienta a vloží se do barvicí kyvety barvicího automatu a manuálně se zadá mód barvení (SOP; Manuál Sysmex SP-1000i).

Postup barvení:

1. 3 minuty May-Grünwald koncentrovaný.
2. 3 minuty May-Grünwald ředěný.
3. 7 minut Giemsa R ředěný.

3. 4. 3. Hodnocení nátěru periferní krve

Hodnocení krevních nátěrů je nejrozšířenější morfologické vyšetření. Slouží k vyhledávání, diagnostice a monitorování řady onemocnění. Analýza nátěru periferní krve spočívá ve stanovení procentuálního zastoupení (rozpočtu) jednotlivých subpopulací leukocytů a ve zhodnocení morfologických vlastností krvinek bílé, červené i destičkové řady (Matýšková, 2006).

Postup: Hodnocení nátěru periferní krve se týká:

1. hodnocení kvantitativních
 - nejčastěji diferenciální rozpočet leukocytů
 - počet erytroblastů na 100 leukocytů
2. hodnocení relativního počtu – na 1000 erytrocytů
 - počet schistocytů
 - počet trombocytů
3. hodnocení morfologických změn (včetně jejich semikvantitativního případně i kvantitativního hodnocení)
 - erytrocytů (RBC)

- leukocytů (WBC)
- trombocytů (PLT) (Matýšková, 2006).

Obarvené krevní nátěry lze hodnotit opticky pomocí světelného mikroskopu a nebo pomocí digitálního morfologického analyzátoru CellaVision DM96.

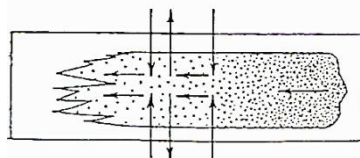
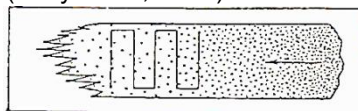
3. 4. 3. 1. Mikroskopické hodnocení krevního nátěru

Obarvené a osušené nátěry se hodnotí pod mikroskopem a to buď za použití imerzních objektivů nebo objektivů bez imerze (Pecka, 2010). Vlastní hodnocení začíná vždy přehledným zhodnocením nátěru při zvětšení 200 – 400x kdy hodnotíme:

- buněčnost, kvalitu a obarvení nátěru,
- rozložení buněk – hodnotí se přítomnost buněk v koncových a okrajových částech nátěru (zde mohou být nahromaděny velké a patologické buňky) a také v hustých místech nátěru (zde se mohou nacházet mikrosraženiny trombocytů, které v místě s nízkou buněčností nemusíme najít) (Matýšková, 2006).

Teprve pak následuje hodnocení krevních buněk při zvětšení 1000x. K hodnocení si vybíráme část nátěru, ve které jsou buňky rovnoměrně rozprostřeny. Nejčastěji se jedná o místo cca 1 cm od konce nátěru. Nátěr v mikroskopu hodnotíme meandrovitým či bajonetovým rovnoměrným pohybem objektivu na podložním skle přes vrstvu imerzního oleje – nejlépe na šířku skla od jednoho okraje k druhému (viz obr.3 a 4) k získání objektivního výsledku (Matýšková, 2006).

Obr.3: Meandrovitý pohyb (Matýšková, 2006)



Obr.4: Bajonetový pohyb (Matýšková, 2006)

3. 4. 3. 1. 1. Kvantitativní hodnocení

- Diferenciální počet leukocytů v periferní krvi počítáme na 100 leukocytů, u patologických nálezů či při hodnocení externí kontroly kvality je v rámci zpřesnění doporučováno hodnocení na 200 i více elementů.

- Ve fyziologickém nátěru nalézáme tyto elementy bílé řady: neutrofilní segmenty, neutrofilní tyče, eozinofilní segmenty, bazofilní segmenty, lymfocyty a monocyty.
 - Patologicky mohou být v nátěru periferní krve přítomna všechna vývojová stádia krevních elementů a vzácně při hematogenním rozsevu i ne-hematopoetické maligní buňky a krevní paraziti.
- V nátěru přítomné erytroblasty vyčíslíme početně na 100 leukocytů – (počet erytroblastů/100 WBC)
- Fyziologicky normoblasty nalézáme pouze u novorozenců.
 - Patologicky u hemolytických anémií, hematologických malignit apod. (Matýšková, 2006).

3. 4. 3. 1. 2. Hodnocení relativního počtu

- počty schistocytů – vztahuje se na 1000 erytrocytů
- počty trombocytů – orientační vyšetření, využívá se např. při podezření na pseudotrombocytopenii – spočítá se počet trombocytů na 1000 erytrocytů a dle vzorce se přepočítá počet trombocytů na litr:

$$\frac{\text{zjištěný počet trombocytů}}{1000} \cdot \text{RBC}$$

3. 4. 3. 1. 3. Hodnocení morfologických změn

Provádí se popisem z celého nátěru:

- **Leukocyty** – posuzuje se:
- celková charakteristika buňky - velikost buněk (malé, střední, velké); tvar buněk; N/C (= nukleo-cytoplazmatický poměr)
 - charakteristika jádra - velikost; tvar; uložení (centricky, excentricky); ohraničení; struktura chromatinu (jemná, hrubá); jadérka (přítomnost, počet)
 - charakteristika cytoplazmy – zbarvení vč. homogenity; granulace (přítomnost, počet, zbarvení, velikost, distribuce); inkluze; vakuolizace; ohraničení cytoplazmy (pravidelné, výběžky, neohraničené).
- Takto můžeme popsat např.:
- u granulocytů hypersegmentaci (posun doprava) či hyposegmentaci neutrofilů, Pelgerovu-Huětovu anomálii či její pseudoformu, megaloidní (obrovské) segmenty, tyče či metamyelocyty, různé poruchy granulací

(hypo-, hypergranularitu, toxickou granulaci), Döhleho inkluze, Auerovy tyče;

- u lymfocytů LGL (large granular lymphocytes), reaktivní, atypické (nebo variantní) formy lymfocytů, „vlasaté“ či „vilózní“ lymfocyty, prolymfocyty apod.
- také si všímáme holých jader a jaderných stínů (Matýšková, 2006).

➤ **Erytrocyty** – hodnotíme:

- velikost erytrocytů – normocyty, mikrocyty, makrocyty, anizocytóza,
- barvu cytoplazmy – normochromní, hypochromní, polychromazie a jiné
- změny tvaru – poikilocytóza, sférocyty, terčovité erytrocyty, dakrocyty, anulocyty, schistocyty, ovalocyty nebo eliptocyty, akantocyty, echinocyty, drepanocyty, stomatocyty, keratocyty a další,
- přítomnost inkluzí – bazofilní tečkování, Howell-Jollyho tělíčka, Cabotovy prstence, Pappenheimerova tělíčka,
- penízkovatění (rouleaux) (Matýšková, 2006).

➤ **Trombocyty** – hodnotíme:

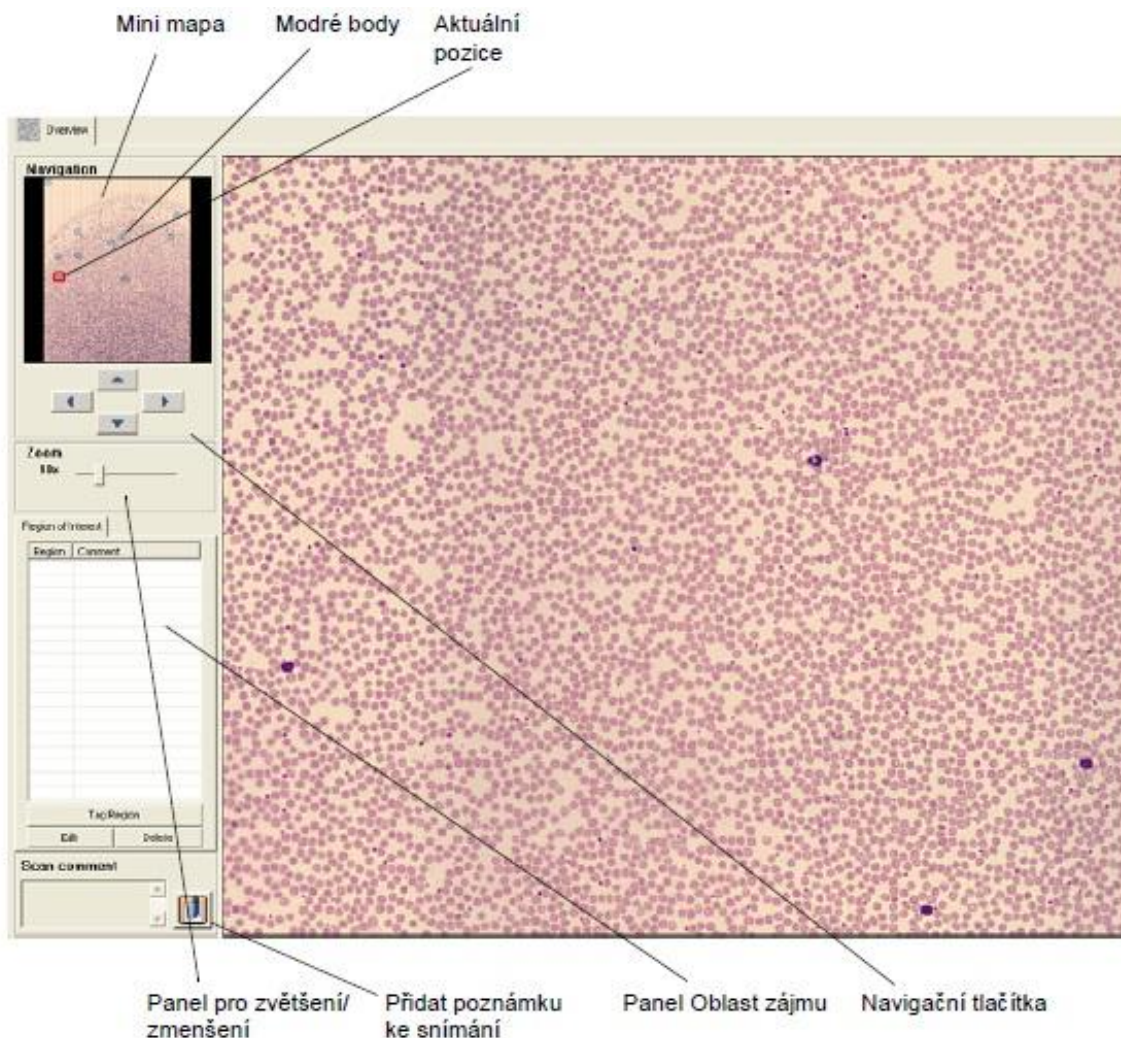
- orientačně počet,
- velikost – normální, mikrotrombocyty, makrotrombocyty, anizocytóza trombocytů,
- přítomnost granulací – hypogranulární trombocyty,
- uložení v nátěru – shlukování – trombocytární agregáty, destičkový satelitismus (Matýšková, 2006).

3. 4. 3. 2. Hodnocení krevního nátěru pomocí CellaVision DM96

Hodnocení krevního nátěru se provádí v módu – periferní krev.

Postup: Obarvená skla označená čárovými kódy se vloží do zásobníku čárovým kódem směřujícím nahoru a k obsluze. Do zásobníku lze vložit 12 skel. Pozice skel v zásobníku jsou očíslovány 1-12 zdola nahoru. Po otevření vstupních dvířek se zásobník vloží do podavače. Čárový kód zásobníků musí směřovat nahoru a otevřený konec zásobníků dovnitř. Přístroj po vložení zásobníku a zavření vstupních dvířek sám spustí analýzu, ručně se musí spustit zpracování pokud byl systém zastaven, restartován nebo pokud došlo k chybě (Příručka uživatele CellaVision DM96). Přístroj přijímá požadavky vyšetření z laboratorního informačního systému (LIS). Při předběžné klasifikaci přístroj skenuje a ukládá do databáze fotografie nalezených buněk, provádí klasifikaci diferenciálního rozpočtu leukocytů (WBC), charakterizaci morfologie

erytrocytů (RBC) a odhad počtu trombocytů (PLT). Uživatel před začátkem analýzy navolí počet hodnocených buněk. Přístroj si vybere optimální místo (monovrstvu), kde analýzu provede. Automat poté malým zvětšením (10x) pořídí záznam souřadnic jaderných buněk a přepne na objektiv s větším zvětšením (50x), kterým vyhodnotí morfologii červené řady a odhadne počet krevních destiček (Juráňová, 2010).



Obr. 5: Přehledový snímek snímání (Příručka uživatele CellaVision DM96)

Nakonec automat zvolí velké zvětšení (100x), kdy jednotka s imerzním olejem automaticky aplikuje kapky imerzního oleje na sklíčko. Automat s využitím záznamu souřadnic pořizuje snímky jednotlivých jaderných buněk a provádí jejich pre-klasifikaci. Získané parametry buněk jsou automaticky srovnávány se standardními parametry referenčních buněk, které jsou uloženy v databázi přístroje. Prostřednictvím speciálního softwaru jsou pak nalezené buňky přiřazovány k jednotlivým buněčným podtypům. Analýza jednoho sklíčka trvá asi 90 sekund (Juráňová, 2010, Příručka uživatele CellaVision DM96).

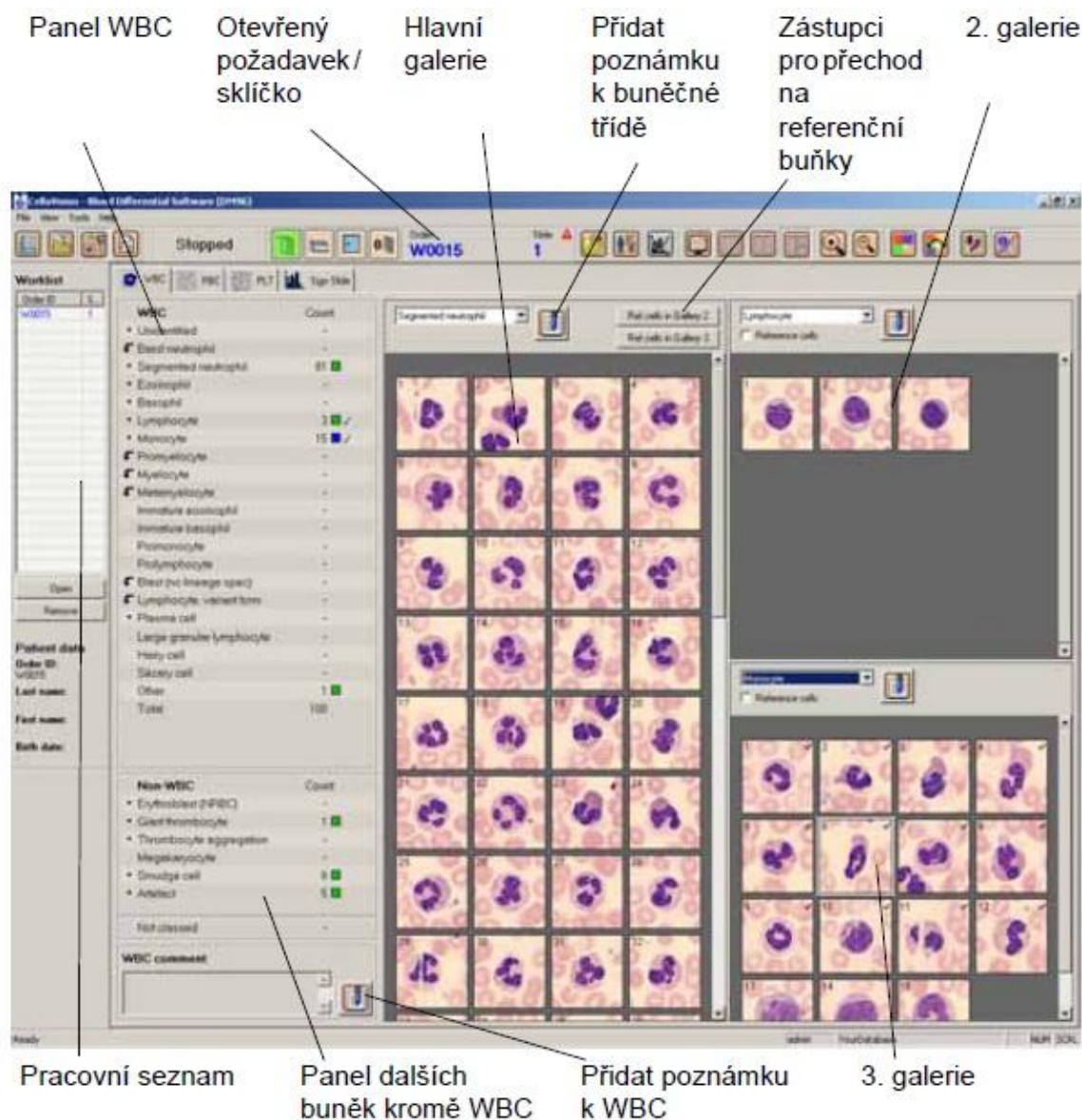
System dokáže předběžně vyhodnotit tyto třídy WBC: tyčky, segmenty, eozinofily, bazofily, lymfocyty, monocyty, promyelocyty, myelocyty, metamyelocyty, blasty, variantní formy lymfocytů a plazmatické buňky (Příručka uživatele CellaVision DM96).

System dokáže předběžně vyhodnotit tyto třídy mimo WBC (non-WBC): erythroblasty (NRBC), velké trombocyty, shluky trombocytů, rozpadlé buňky a artefakty. Objekty non-WBC se uvádějí v počtu buněk nebo objektů na 100 WBC (Příručka uživatele CellaVision DM96).

Neidentifikovaná zůstává třída buněk a objektů, které systém vyhodnotil s nízkou hladinou spolehlivosti (Příručka uživatele CellaVision DM96).

System na obrazovce prezentuje snímek každé nalezené buňky nebo objektu a uživatel poté provede reklasifikaci zařazených buněk, při které je možno jednotlivé buňky rozkliknutím zvětšit a v případě potřeby provést změnu přetažením buňky z jedné galerie do druhé. System umožňuje identifikovat, potvrdit nebo upravit navrhované hodnocení bílých krvinek. Tímto způsobem uživatel validuje jednotlivé snímky leukocytů (Příručka uživatele CellaVision DM96).

Kromě buněčných tříd uvedených výše může obsluha buňky reklasifikovat do těchto tříd: nezralé erytrocyty, nezralé bazofily, promonocyty, prolymfocyty, velké granulární lymfocyty, vlasaté buňky, Sézaryho buňky, jiné, megakaryocyty, neklasifikováno a 15 buněčných tříd vytvořených uživatelem (Příručka uživatele CellaVision DM96).



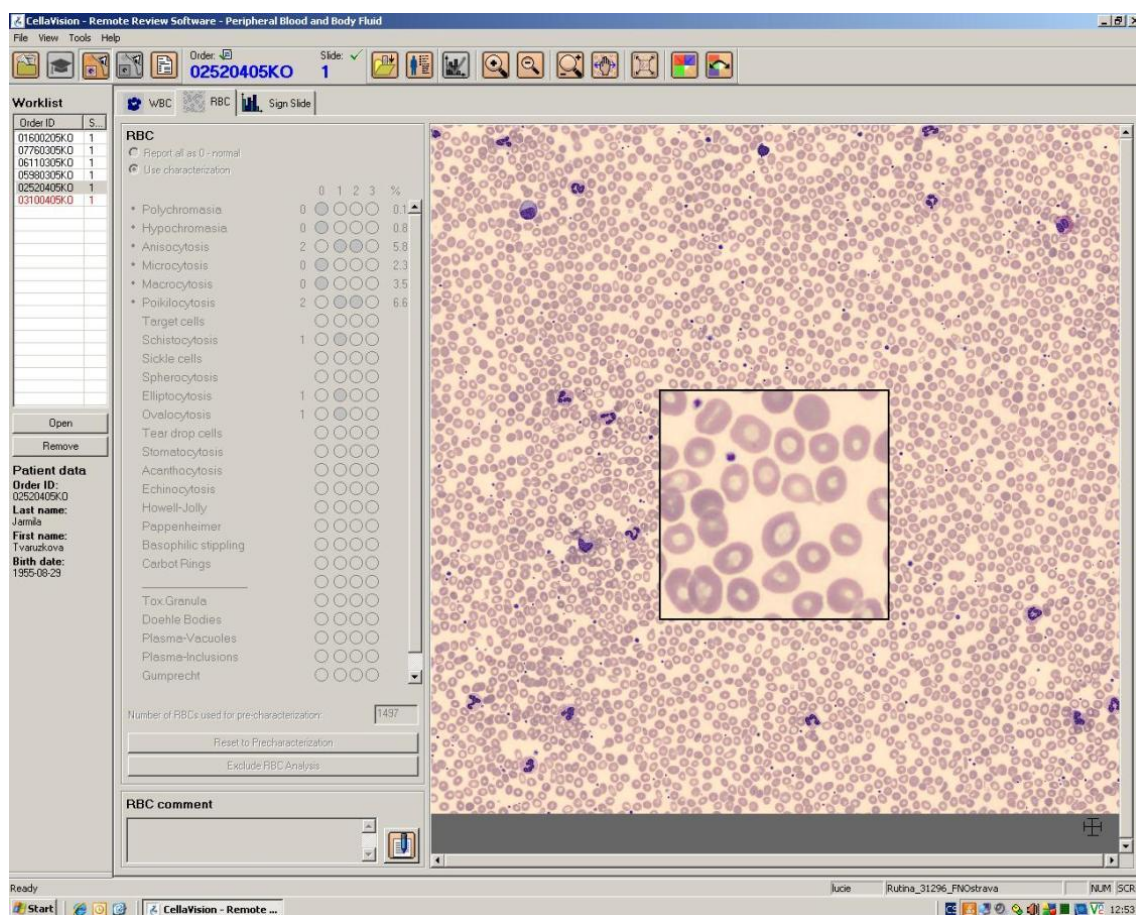
Obr. 6: Klasifikace WBC (Příručka uživatele CellaVision DM96)

Pro charakterizaci morfologie RBC a PLT se používá panel RBC. Jsou zde uvedeny veškeré morfologie zpracované systémem. Morfologie předem zpracované systémem jsou označeny malou tečkou. Přehledový snímek RBC odpovídá oblasti 8 mikroskopických polí s velkým zvětšením (100x objektiv a 22 mm okulár) (Příručka uživatele CellaVision DM96). Erythrocyty se hodnotí semikvantitativně podle intenzity poruchy v rozmezí 0 až 3+ nebo jako pozitivní/negativní nález (viz. příloha č. 3)

Na přehledovém snímku systém předběžně stanoví morfologii RBC: polychromasie, hypochromie, anizocytóza, mikrocytóza, makrocytóza a poikilocytóza.

Obsluha při reklasifikaci může také stanovit leptocyty, schistocyty, drepanocyty, sférocyty, eliptocyty, ovalocyty, kapkovité buňky, stomatocyty, akantocyty, echinocyty.

Howel-Jollyho tělíska, Pappenheimerova tělíska, bazofilní tečkování, parazity a 10 uživatelem definovaných charakteristik (Příručka uživatele CellaVision DM96).



Obr. 7: Přehledový snímek RBC – patologie RBC

System umožňuje také provádět odhad počtu krevních destiček na přehledovém snímku PLT (jedná se o stejný snímek jako pro RBC) (Příručka uživatele CellaVision DM96).

K jednotlivým buněčným třídám a buňkám může obsluha přidávat poznámky v textovém okně *Comment*. Po skončení analýzy uživatel podepíše sklo a odešle výsledky vyšetření elektronickou cestou do LIS. Údaje skla nelze po podepsání měnit. Poznámky mohou být nadále přidávány. System ukládá snímky a výsledky do databáze.

Po zpracování všech sklíčků v zásobníku je zásobník automaticky vysunut do výstupního podavače, kde jej obsluha vyjme a sklíčka očistí od imerzního oleje (Příručka uživatele CellaVision DM96).

3. 5. Metoda regresní a korelační analýzy

Princip: Pomocí Passing/Bablok regrese se zjišťuje směrnice regresní přímky. V případě, že 95% interval spolehlivosti jejího určení pokrývá hodnotu 1,0, pak lze usuzovat na shodu metod. Korelační koeficient (r) vyjadřuje míru rozptylu bodů kolem regresní přímky. Maximální hodnota korelačního koeficientu je 1,0; v tom případě všechny body leží na přímce dané rovnicí regresní přímky. Při zvyšujícím se rozptylu bodů hodnota korelačního koeficientu klesá. Korelace je měřítkem těsnosti asociace mezi oběma metodami (Racek, 2006). Čím menší úhel regresní přímky svírají, tím je těsnost dat větší.

III. PRAKTICKÁ ČÁST

1. CHARAKTERISTIKA VYŠETŘOVANÉHO SOUBORU

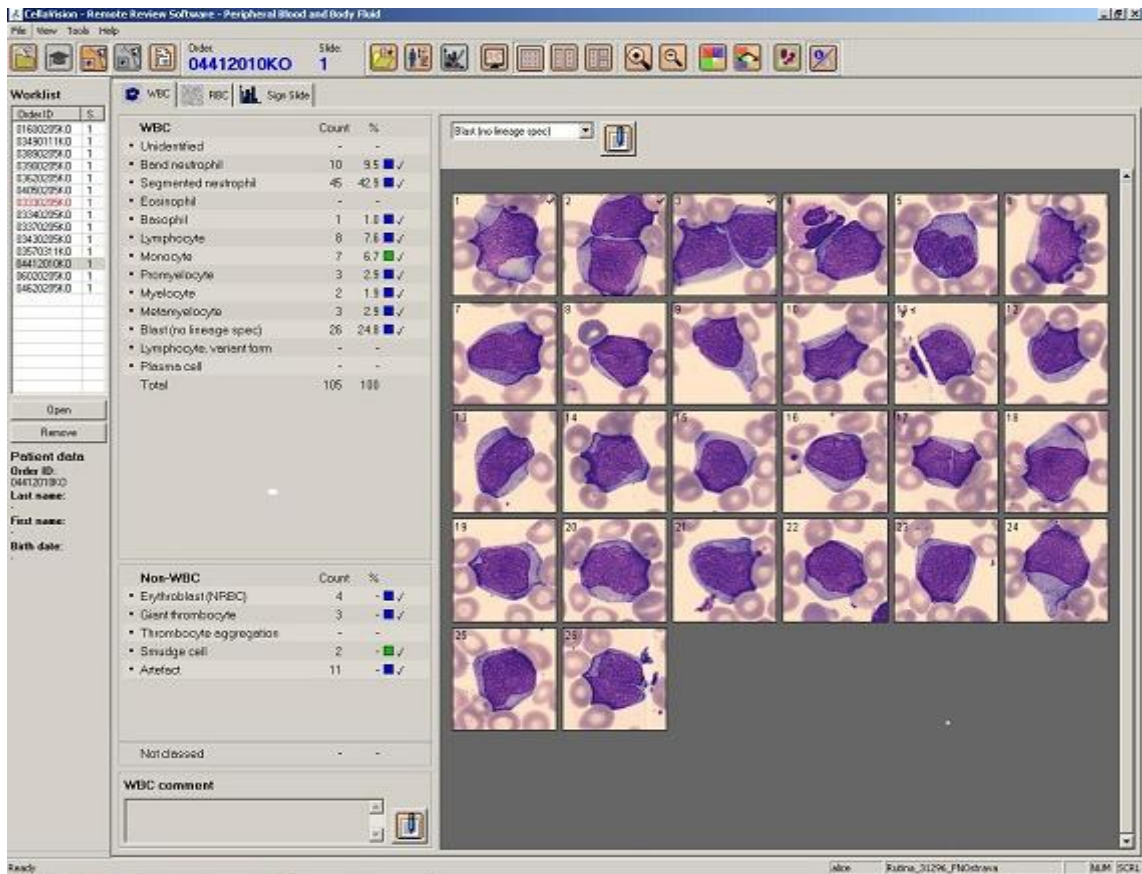
Pro tuto bakalářskou práci jsem použila výsledky pacientů, kteří byli vyšetřeni v laboratoři Ústavu klinické hematologie (ÚKH) Fakultní nemocnice Ostrava. Pro tyto pacienty jsou společné patologické výsledky ve vyšetření KO a poté také patologické nálezy v diferenciálním rozpočtu leukocytů. Ve většině případů se jedná o posun doleva v neutrofilní řadě někdy až k blastickým elementům (BE) a nález reaktivních lymfocytů či lymfocytóz.

Posuzovaný soubor se skládá z patologických výsledků diferenciálního rozpočtu leukocytů u 62 pacientů. Věková struktura pacientů je 2 až 85 let a jedná se o 29 žen a 33 mužů. Výběr diagnóz je náhodný a hlavním kritériem pro zařazení do souboru byly patologické výsledky diferenciálního rozpočtu leukocytů při analýze KO. Převážnou většinu tvoří pacienti ambulance ÚKH FN Ostrava.

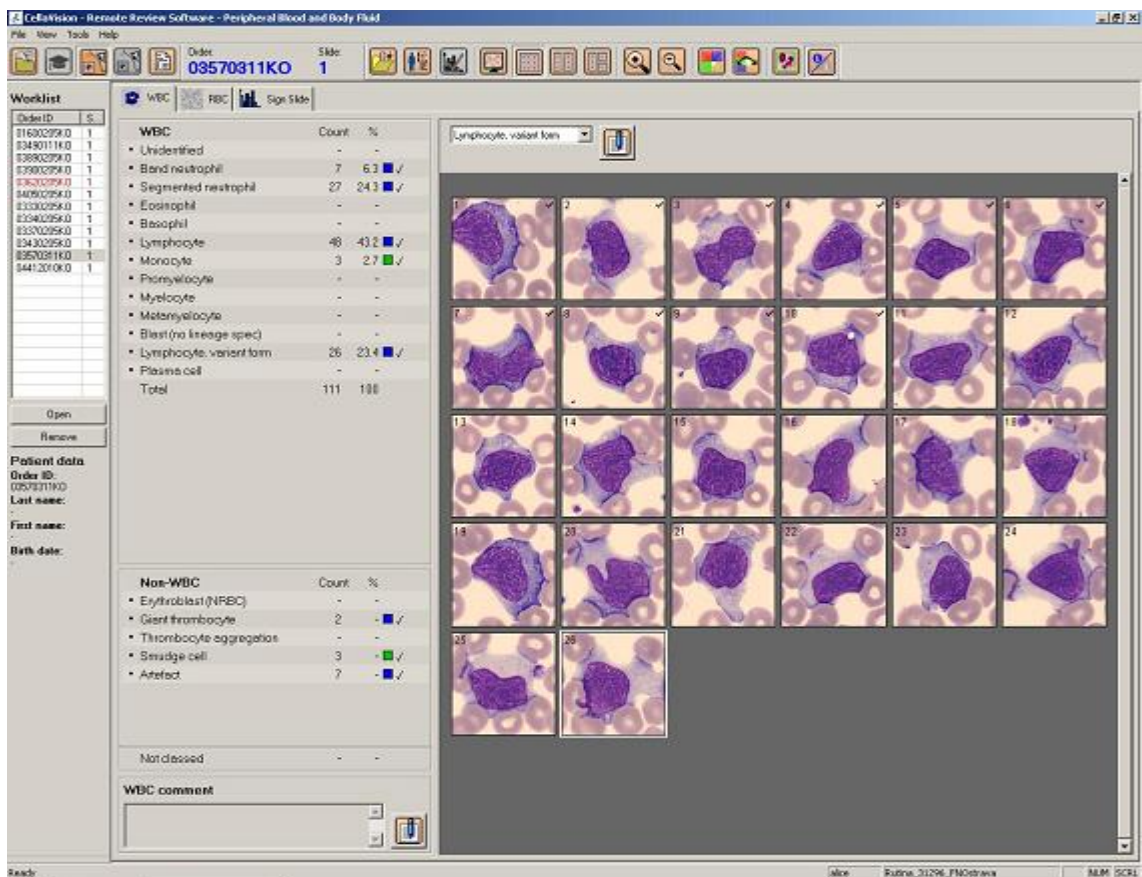
2. METODIKA VÝZKUMU

Soubor patologických výsledků jsem vytvořila v období od září do prosince 2010. Do souboru byli zařazováni pacienti vyšetřovaní v laboratoři ÚKH FN Ostrava, u nichž byl požadavek vyšetření KO s pětipopulačním diferenciálním rozpočtem leukocytů. KO s pětipopulačním diferenciálním rozpočtem leukocytů všech pacientů souboru byl vyšetřen na analyzátoru XE-5000 firmy Sysmex. Analyzátozem byly výsledky vyhodnoceny jako patologické a byl indikován krevní nátěr. Požadavky byly odeslány do nátěrového a barvicího automatu SP-1000i, kde byly zhotoveny a nabarveny nátěry. Výsledné nátěry byly opatřeny speciálním čárovým kódem s číslem a identifikací pacienta.

Poté následovala analýza krevních nátěrů na automatickém analyzátoru CellaVision DM96 firmy Sysmex (**metoda A**), kdy přístroj při pre-klasifikaci v módu – periferní krev zařadil WBC do jednotlivých buněčných tříd (systém jsem nastavila na vyhodnocení 110 WBC, následuje přepočtení na 100 WBC), zhodnotil morfologii RBC a PLT.



Obr. 8: Reklasifikace WBC – blastické elementy



Obr. 9 :Reklasifikace WBC – reaktivní lymfocyty

Analýza potvrdila patologické nálezy. Následně jsem na monitoru analyzátoru překontrolovala všechny pre-klasifikované buňky, zda jsou správně zařazeny do jednotlivých buněčných tříd, na přehledovém snímku vyhodnotila morfologii RBC a PLT a špatně zařazené buňky reklasifikovala přetažením z jedné galerie do druhé. Po skončení analýzy metodou A jsem výsledky zapsala do průvodního listu.

Tytéž krevní nátěry jsem zhodnotila mikroskopicky pomocí světelného mikroskopu firmy Olympus model BX41TF (**metoda B**). Nátěry jsem prohlížela nejdříve malým zvětšením 400x pro přehled o buněčnosti a rozložení buněk a poté jsem použila imerzní objektiv, zvětšení 1000x, pro kvantitativní i kvalitativní zhodnocení WBC, RBC a PLT. Krevní nátěry jsem prohlížela meandrovitým pohybem od jednoho okraje k druhému v oblasti, kde jsou erytrocyty rovnoměrně rozprostřeny a nepřekrývají se. Nátěry jsem hodnotila na 100 WBC. Po skončení analýzy metodou B jsem výsledky zapsala do průvodního listu.

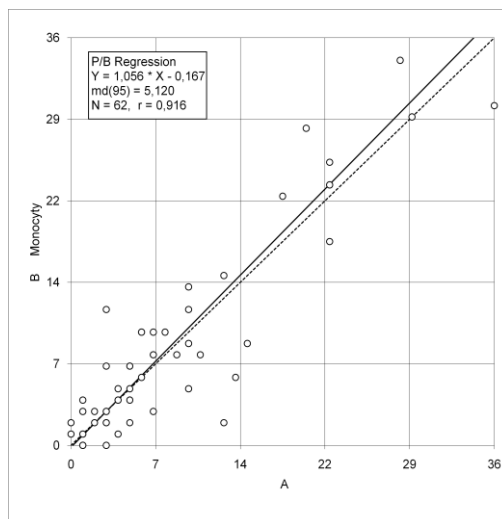
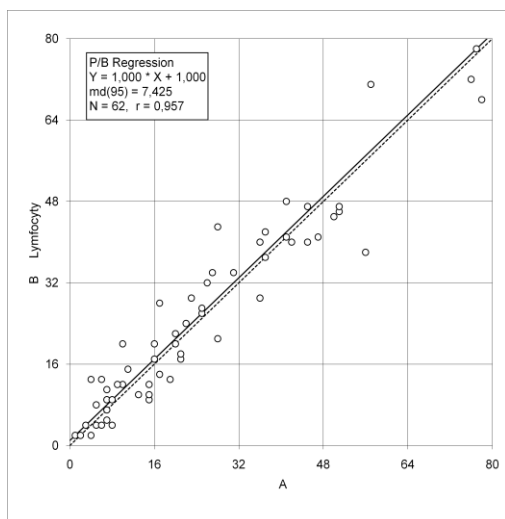
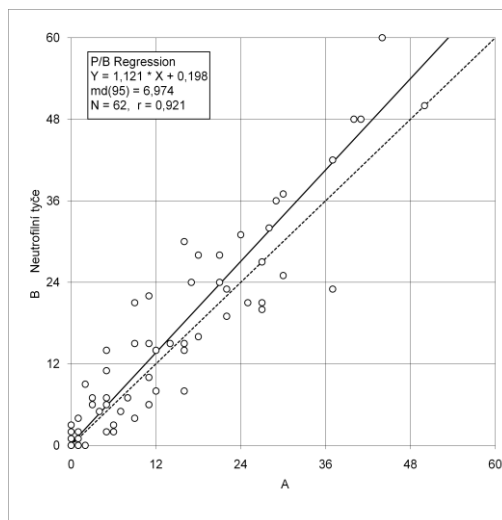
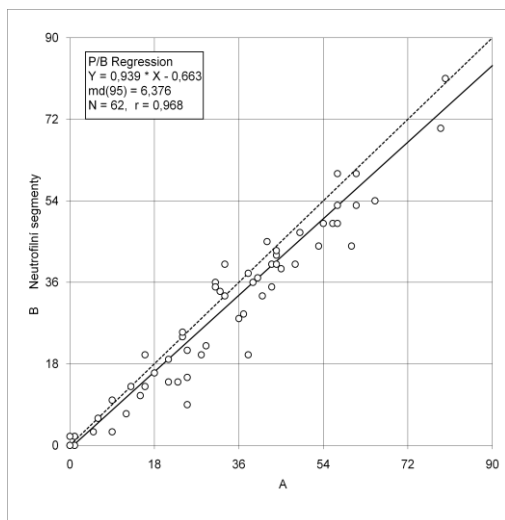
Po zhodnocení všech nátěrů jsem srovnala výsledky analýz, provedených oběma metodami, metodou regresní a korelační analýzy. Výsledky klasifikace jaderných elementů jsem zapsala do tabulky a vytvořila grafy, kde nová metoda A je na ose x a původní metoda B je na ose y, za použití programů EVAPAK for Windows firmy Roche Diagnostics 1999, Excel Microsoft.

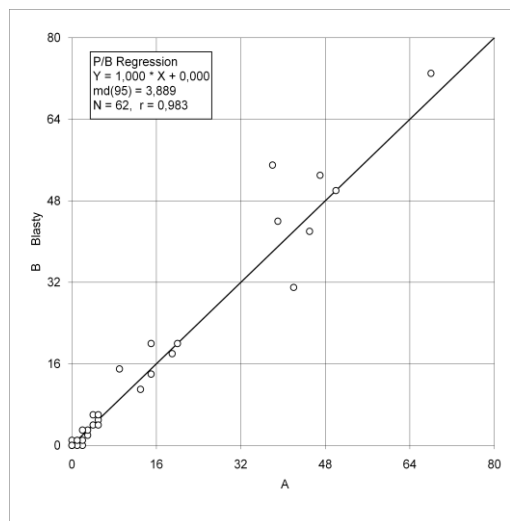
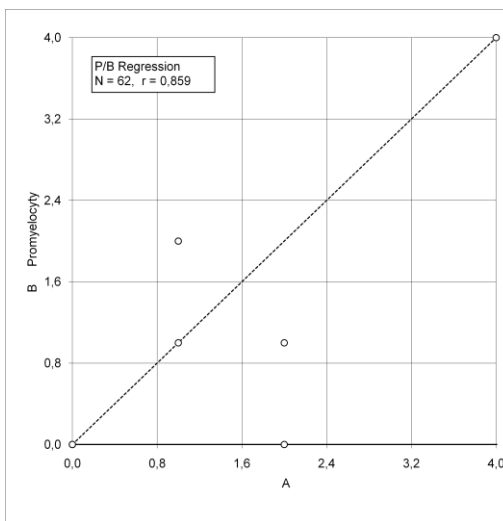
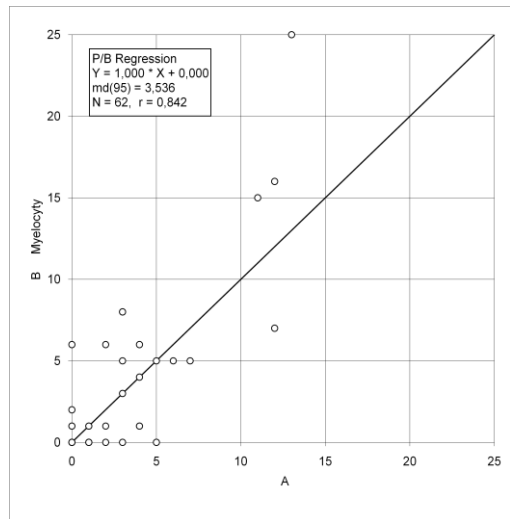
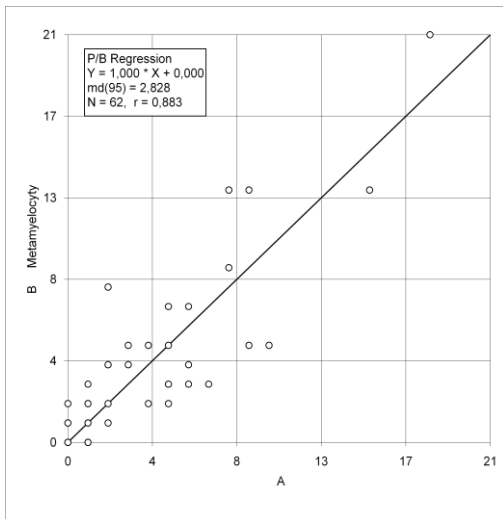
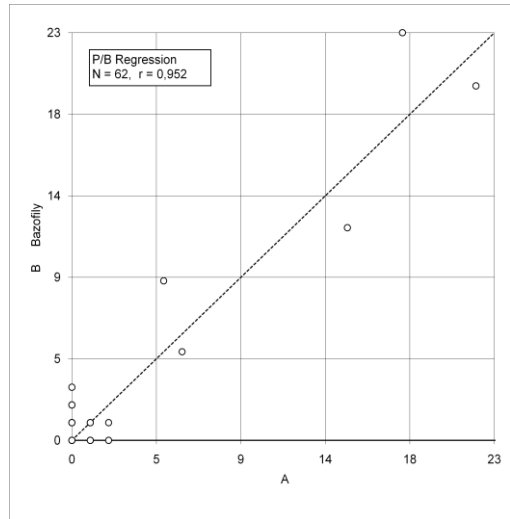
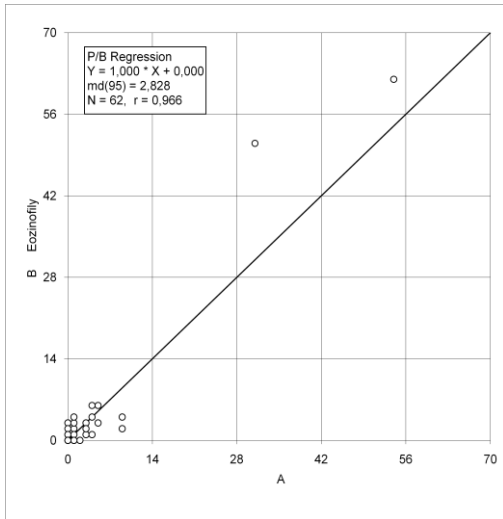
Graficky jsem vyhodnotila také morfologii RBC a WBC za použití programu Excel Microsoft.

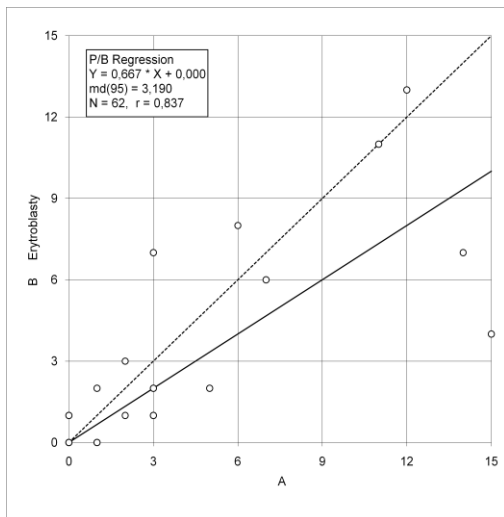
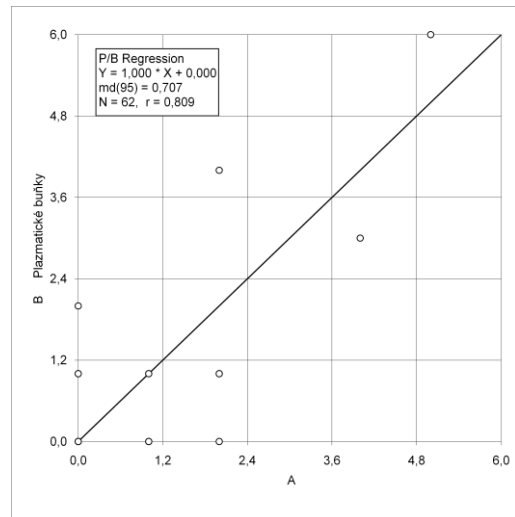
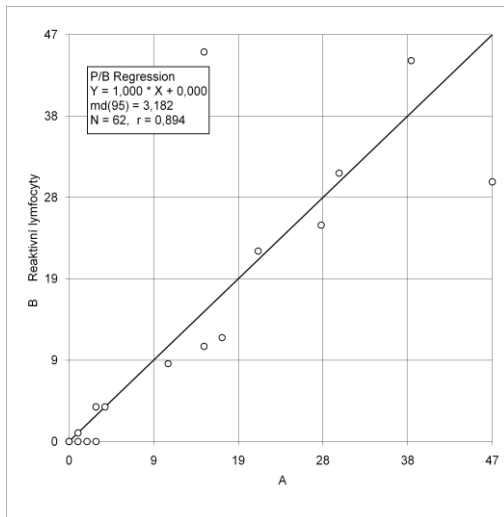
3. VÝSLEDKY

3.1. Metoda regresní a korelační analýzy

Na základě zjištěných výsledků klasifikace jaderných elementů obou metod (viz. příloha č. 1), byly vytvořeny následující grafy. Nová metoda A je na ose x a původní metoda B na ose y.







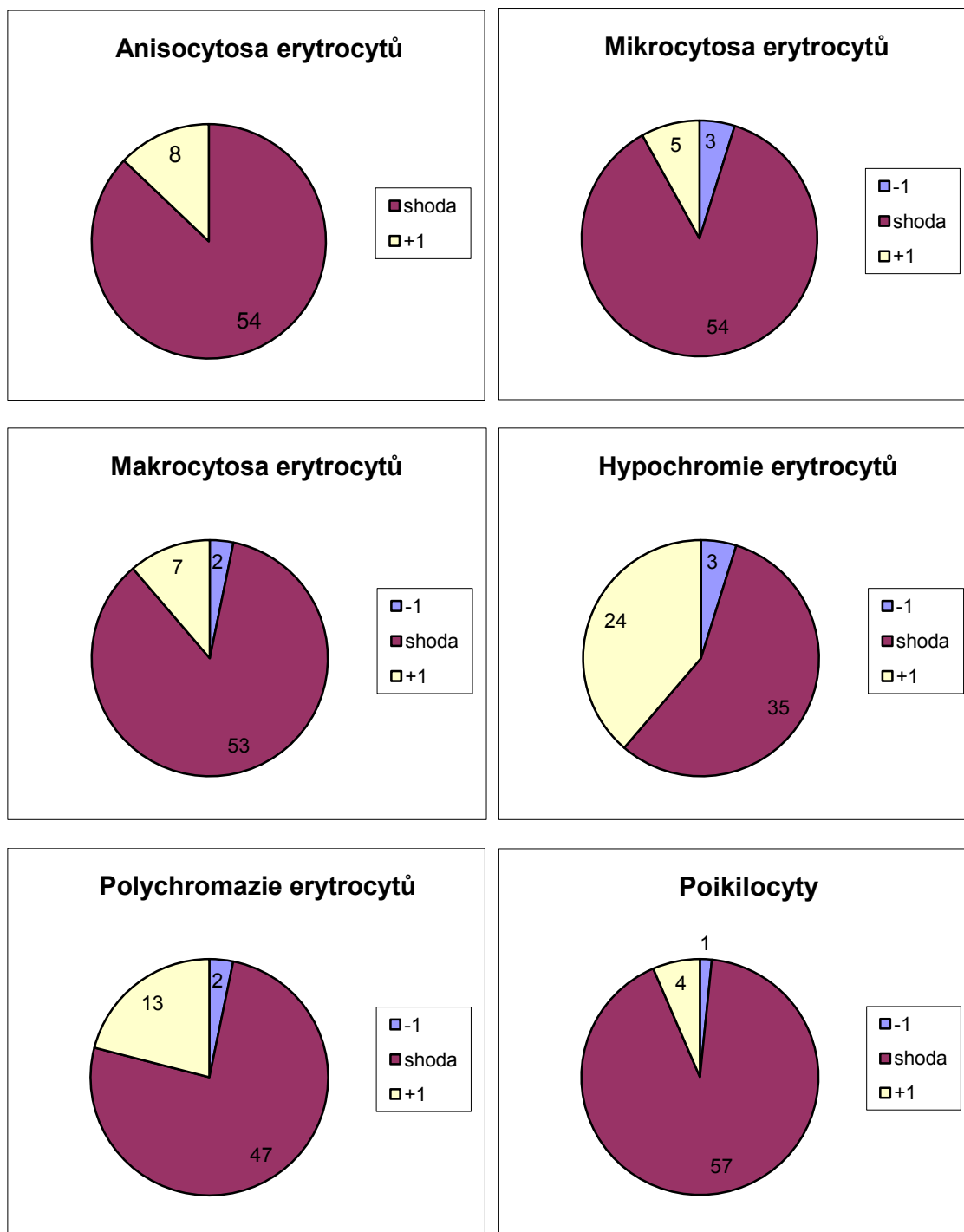
Grafy 1 - 13: Korelace klasifikace jaderných elementů stanovených na CellaVision DM96 a přímou mikroskopií

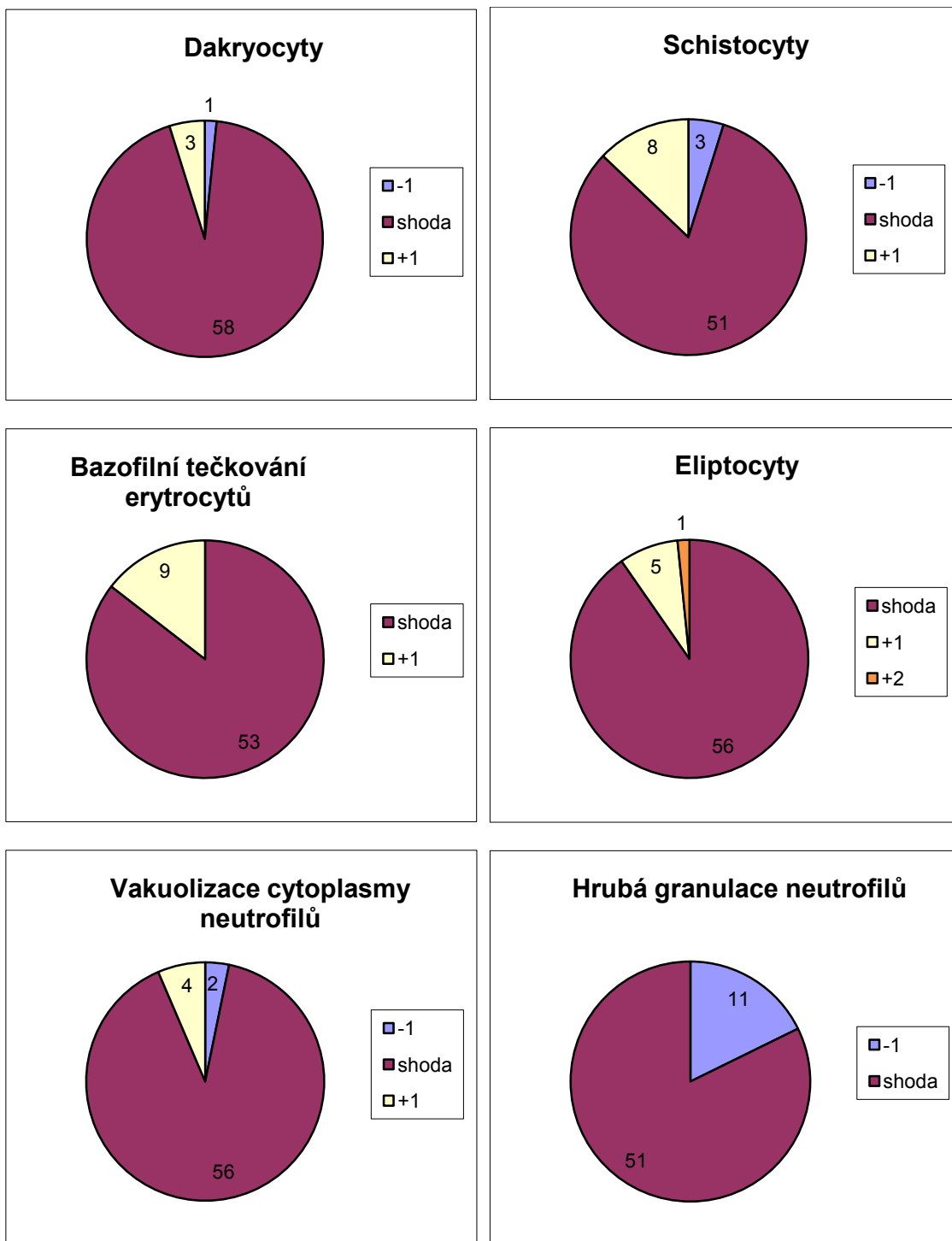
3. 2. Hodnocení morfologie erytrocytů a leukocytů

Porovnání výsledků morfologie RBC a WBC zjištěných metodou B (přímá mikroskopie) s výsledky metody A (CellaVision DM96).

3. 2. 1. Hodnocení celého souboru

Do srovnání byly zahrnuty výsledky všech analyzovaných vzorků souboru:

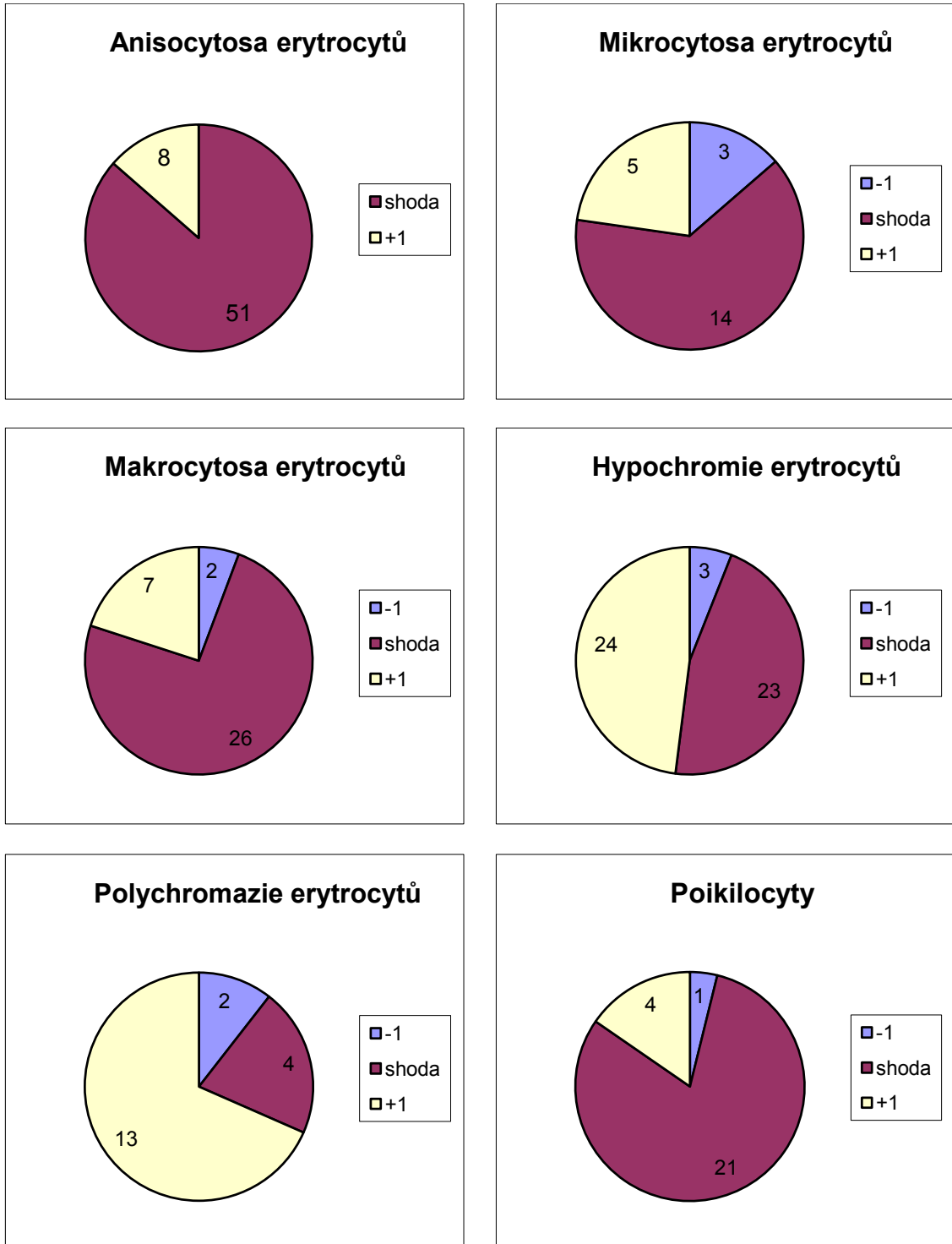


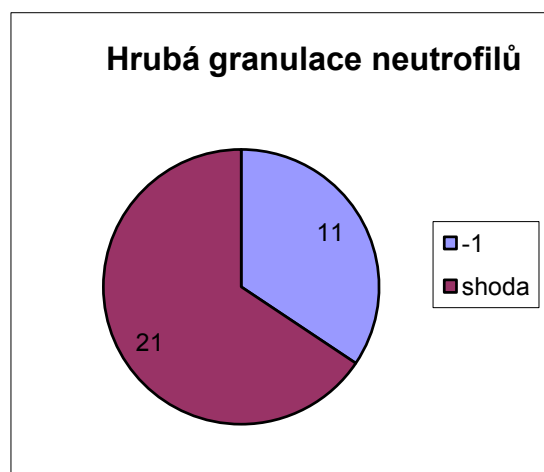
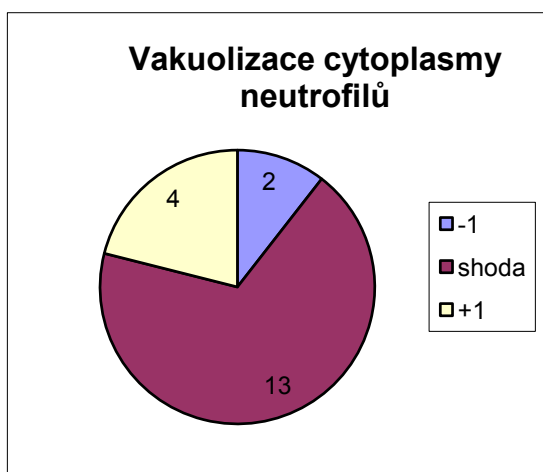
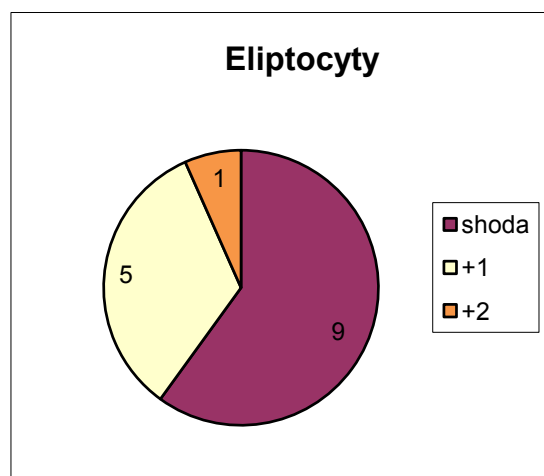
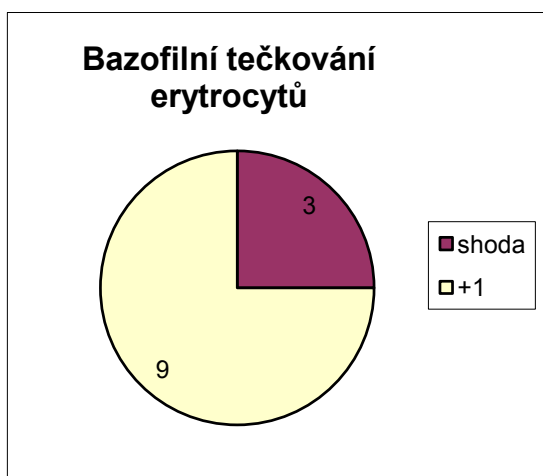
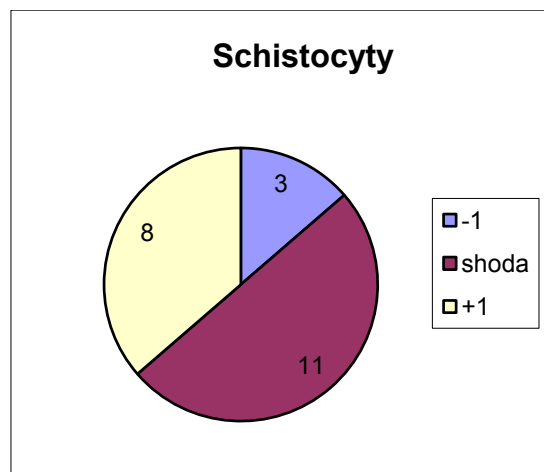
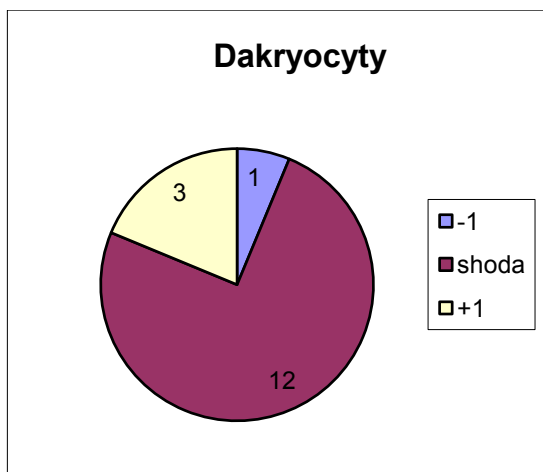


Grafy 14 - 25: Srovnání výsledků morfologie RBC a WBC vyhodnocené pomocí automatického analyzátoru CellaVision DM96 a světelné mikroskopie – všechny vzorky souboru

3. 2. 2. Hodnocení patologických nálezů

Do srovnání byly zahrnuty pouze výsledky analyzovaných vzorků souboru s patologickými nálezy morfologie RBC a WBC. Graficky jsou znázorněny pouze nálezy, které byly vyhodnoceny jednou či druhou metodou jako patologické, tudíž se počet udaných vzorků u grafů jednotlivých odchylek liší.





Grafy 26 - 37: Srovnání výsledků morfologie RBC a WBC vyhodnocené pomocí automatického analyzátoru CellaVision DM96 a světelné mikroskopie – jen s patologickými nálezy vzorků

4. DISKUSE

Cílem této práce bylo srovnání dvou metod (CellaVision DM96, přímá mikroskopie) použitých při analýze patologických nálezů v diferenciálního rozpočtu leukocytů.

V posuzovaném souboru byly metodou regresní a korelační analýzy zjištěny mezi finálními výsledky vydanými CellaVision DM96 a výsledky získanými přímou mikroskopií tyto korelační koeficienty:

0,968 (neutrofilní segmenty),

0,921 (neutrofilní tyče)

0,957 (lymfocyty)

0,916 (monocyty)

0,966 (eozinofily)

0,952 (bazofily)

0,809 (plazmatické buňky)

0,883 (metamyelocyty)

0,842 (myelocyty)

0,859 (promyelocyty)

0,983 (blastické elementy)

0,894 (reaktivní lymfocyty)

0,837 (erytroblasty).

Při analýze souboru nebyl prokázán významný rozdíl mezi výsledky obou metod. U většiny parametrů nacházíme nevýznamnou odchylku od linearity, lze tedy usuzovat na shodu metod. Zralé a kvalitativně normální elementy vykazují větší těsnost dat, regresní přímky svírají malý úhel.

Významná je shoda při hodnocení blastických elementů, jejichž nález je diagnosticky i klinicky velmi závažný.

Mladší vývojová stádia neutrofilů (tyče, metamyelocyty a myelocyty) - v některých případech byly zaznamenány odlišnosti výsledných početních hodnot. Příčinou početní difference by jednak mohla být skutečnost, že CellaVision hodnotí předem definovanou část skla a to především uprostřed nátěru, mikroskopicky se nátěr prohlíží obvykle v konci nátěru meandrovitým pohybem od kraje ke kraji nátěru. K rozložení buněk při zhotovení nátěru dochází podle jejich velikosti. Neutrofilie se nacházejí při okraji nátěru, lymfocyty blíže ke středu, velké buňky jako monocyty, nádorové buňky a shluky trombocytů na okrajích nátěru. Další možnou příčinou by

mohla být přítomnost morfologických abnormalit, jako je hypogranularita až agranularita či přetrvávající bazofilie cytoplazmy, kdy je možná záměna např. s monocyty.

Buněčné populace vyskytující se v posuzovaném souboru u nízkého počtu vzorků (plazmocyty, reaktivní lymfocyty, bazofily, promyelocyty, NRBC) nejsou pro hodnocení regresní metodou vhodné, soubor je malý a pro statistické srovnání může sloužit pouze jako orientační. Mezi jednotlivými hodnotami posuzovaného souboru není významná diskrepance.

Při hodnocení morfologie RBC z celého souboru, tzn. zahrnující i fyziologické výsledky, je shoda u: dakryocytů (94%), poikilocytů (92%), eliptocytů (90%), anizocytózy (87%), mikrocytózy (87%), makrocytózy (85%), bazofilního tečkování erytrocytů (BTE) (85%), schistocytů (82%), polychromazie (76%) a hypochromie (56%). V případě neshody se jedná o odchylky jen o 1+ (-1, +1), pouze u eliptocytů se v jednom případě jednalo o odchylku o 2+.

Pokud vezmeme v úvahu pouze patologické výsledky zjištěné jednou či druhou metodou, výsledky se výrazně změnil a zaznamenáváme shodu u: anizocytózy (86%), poikilocytů (81%), dakryocytů (75%), makrocytózy (74%), mikrocytózy (64%), eliptocytů (60%), schistocytů (50%), hypochromie (46%), BTE (25%) a polychromazie (21%).

Při hodnocení morfologie RBC z celého souboru nacházíme výraznější neshody v hodnocení polychromazie, hypochromie a BTE. U polychromazie byla u 15 vzorků neshoda, z toho 13x byl výsledek mikroskopu +1. U hypochromie byla u 27 vzorků neshoda, z toho 24x mikroskopicky neshoda +1. BTE vykazuje mikroskopicky neshodu 9x (+1).

Při hodnocení pouze patologických nálezů se rovněž jeví nejzávažněji výsledky hodnocení v případě polychromazie (21%), hypochromie (46%) a BTE (25%). Shoda u polychromazie byla prokázána pouze ve 4 případech z 19. U 13 vzorků byl výsledek analyzátoru 0 a mikroskopu 1+, ve 2 případech byl výsledek analyzátoru 1+ a mikroskopu 2+. U hypochromie byla prokázána shoda ve 23 případech z 50. U BTE analyzátor vykazuje pozitivitu pouze ve 3 vzorcích z 12 mikroskopicky pozitivních.

Příčinou těchto neshod je zřejmě nemožnost prohlédnutí větší části nátěru, než pouze definovaného úseku. Přehledový snímek RBC odpovídá oblasti 8 mikroskopických polí s velkým zvětšením. Dále také občasná nedostatečná ostrost snímků a současně nemožnost dostatečného proostření buněčných elementů.

Z dalších morfologických abnormalit erytrocytů byly u malého počtu vzorků nalezeny knizocyty (1x), ovalocyty (2x), sférocyty (3x) a jejich výsledky vykazovaly shodu.

Při hodnocení morfologických odchylek neutrofilů z celého souboru byla nalezena vakuolizace cytoplazmy neutrofilů (shoda 90%) a hrubá granulace neutrofilů (shoda 82%).

Pokud vezmeme v úvahu pouze patologické výsledky, byla nalezena vakuolizace cytoplazmy neutrofilů (shoda 68%) a hrubá granulace neutrofilů (shoda 66%).

U hrubé granulace neutrofilů byla 11x neshoda z 32 patologických nálezů (mikroskopicky negativní oproti analyzátoru). Barvení pro analyzátory musejí mít menší intenzitu než pro mikroskopy. Při mikroskopickém hodnocení je granulace méně intenzivní než na fotografiích pořízených automaticky, na monitoru analyzátoru se může jevit jako hrubá.

V souboru byly v nízkém počtu nalezeny také jaderné stíny (2x) a hypersegmentace jader neutrofilů (2x), jejichž výsledky vykazovaly shodu.

5. ZÁVĚR

Diferenciální rozpočet leukocytů poprvé představil před více než 100 lety Paul Ehrlich. Do dnešních dob zůstal klinicky důležitým a často požadovaným laboratorním vyšetřením. Pokrok ve vývoji laboratorních přístrojů má snahu nahradit mikroskop automatizovaným počítačem buněk jako nástrojem volby pro většinu diferenciálních rozpočtů většiny laboratoří.

V praktické části jsem se zaměřila na srovnání dvou metod z hlediska jejich shody při záchytu patologických nálezů v diferenciálním rozpočtu leukocytů.

Výhody a nevýhody obou metod:

Mikroskop

- Výhody - možnost dostatečného proostření abnormálních a nezralých buněk,
- možnost prohlédnutí celého nátěru.
- Nevýhody - vyšetření je časově náročné,
- výsledek je ovlivněn statistickou chybou z důvodu příliš malého počtu hodnocených buněk i zkušeností hodnotícího pracovníka.

Analyzátor

- Výhody - větší počet analyzovaných buněk,
- vyšší citlivost přístroje (analyzátor hodnotí i rozpadlé nebo poškozené buňky na základě jejich obarveného jaderného obalu),
- metoda je rychlá a validovaná (analýza jednoho nátěru trvá přibližně 90 sekund),
- automatizace, která zvyšuje kvalitu a usnadňuje organizaci práce.
- Nevýhody - prohlédnutí jen omezené definované části nátěru (některé patologie zejména v červené řadě často nezachytí např. Howell – Jollyho tělíška, BTE),
- nemožnost proostření jednotlivých buněk a v případě patologického nálezu je nutné prohlédnout nátěr mikroskopicky.

Automatický analyzátor CellaVision DM96 je nesporně velkým přínosem pro rutinní diagnostiku nátěrů periferní krve. Zejména ve velkých laboratořích, kde je analyzováno velké množství krevních nátěrů denně se jedná o velkou úsporu času, malé nároky na obsluhu a specialista – cytolog dokáže díky speciálnímu softwaru prohlížet a hodnotit cytologický nález ze vzdáleného počítače zapojeného v síti a konzultovat nález nejen s lékařem indikujícím vyšetření, ale i s odborníky z jiných vzdálených pracovišť či s experty ze zahraničí.

Ze závěrů sledování vyplynulo, že v případě zralých a kvalitativně normálních elementů, anebo vykazují-li vzorky jen kvantitativní abnormality, analyzátor umí poskytovat spolehlivé WBC diferenciální počty, které vykazují velkou shodu s výsledky optické mikroskopie. Kvalitativně abnormální vzorky je nutné prohlédnout i mikroskopicky, nezbytně v případě prvního záchytu. Přestože tyto patologické diferenciály, tzn. obsahující nezralé či abnormální buňky, mohou být relativně vzácným jevem v mnoha klinických laboratořích, nicméně podstatný klinický dopad špatné diagnózy vyžaduje, aby klasický mikroskop byl v současné hematologické laboratoři i nadále nepostradatelný při analýze patologických nálezů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BOURKOVÁ L., MATÝŠKOVÁ M. Doporučení České hematologické společnosti ČLS JEP – „Příprava a barvení nátěrů periferní krve“. Schváleno: 22. 11. 2006.
Dostupnost na: <http://www.hematology.cz/doporuceni-chs-kcinnostem.php>.
(cit. 30. 4. 2011)
2. CORNET E., PEROL J.-P., TROSSARD X. Performance evaluation and relevance of the CellaVision DM96 systém in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases. *Jnl. Lab. Hem.* 2008, 30, 536-542.
3. JURÁŇOVÁ J., FABER E., INDRÁK K. Automatická digitální morfologie – analýza krevního nátěru a tělních tekutin. *Lékařské listy* 04/2010. 3-6.
4. JURÁŇOVÁ J. et al. Analýza tělních tekutin v hematologické laboratoři. *Transfúze a hematologie dnes*. 06/2011, 17, 86.
5. KLENER P. et al. *Vnitřní lékařství, svazek VIII: Hematologie*. Praha: Galén, Karolinum, 2003. 1. vydání. 115 s. ISBN 80-7262-210-2 (Galén), ISBN 80-246-0672-0 (Karolinum).
6. KO B. et al. Image resizing using saliency strength map and seam carving for White blood cell analysis. *BioMedical Engineering OnLine* 2010. 9:54.
Dostupnost na: <http://www.biomedical-engineering-online.com/content/9/1/54>.
(cit. 22.2. 2011)
7. KOZÁK T. et al. *Vnitřní lékařství, díl IIIb: Hematologie*. Praha: Galén, Karolinum, 2001. 1. vydání. 230 s. ISBN 80-7262-085-1 (Galén), ISBN 80-246-0215-6 (Karolinum).
8. KRATZ A. et al. Performance Evaluation of the CellaVision DM96 System: WBC Differentials by Automated Digital Image Analysis Supported by an Artificial Neural Network. *American J of Clinical Pathology* 2005;124:770-781.
9. LEXOVÁ S. a kolektiv autorů. *Hematologie pro zdravotní laboranty*. 1. díl. Brno: IDVPZ, 2000. ISBN 80-7013-304-X.
10. MATÝŠKOVÁ M., BULIKOVÁ A., KAČÍRKOVÁ P., BOURKOVÁ L. Doporučení České hematologické společnosti ČLS JEP – „Postup při hodnocení nátěru periferní krve“. 2006.
Dostupnost na: <http://www.hematology.cz/doporuceni-chs-kcinnostem.php>.
(cit. 30. 4. 2011)

11. PECKA M. Laboratorní hematologie v přehledu (2. díl). Fyziologie a patofyziologie krevní buňky. Český Těšín: Infiniti art, s. r. o. , 2006. 1. vydání. 304 s. ISBN 80-86682-02-1.
12. PECKA M. et al. Praktická hematologie. Laboratorní metody. Český Těšín: Infiniti Art, s. r. o. , 2010. 1. vydání. 343 s. ISBN 978-80-903871-9-5.
13. RACEK J. et al. Klinická biochemie. Praha: Galén, 2006. 2. přepracované vydání. 329 s., 37-38. ISBN 80-7262-324-9.
14. SOP-ÚKH-LAB-012. Manuální příprava nátěru periferní krve a panoptické barvení nátěru periferní krve a kostní dřeně. Účinnost od 1. 12. 2009.
15. SOP-ÚKH-LAB-013. Příprava nátěru periferní krve a panoptické barvení nátěru periferní krve a kostní dřeně na Sysmex SP-1000i. Účinnost od 1. 12. 2009.
16. SOPT-ÚKH-LAB-009. CellaVision DM96. Účinnost od 1. 12. 2009.
17. ZIMA T. et al. Laboratorní diagnostika. Praha: Galén, Karolinum, 2007. 2. doplněné a přepracované vydání. 906 s. ISBN 978-80-7262-372-3 (Galén), ISBN 978-80-246-1423-6 (Karolinum).
18. Digitální morfologie: CellaVision DM96.
Dostupnost na: <http://www.sysmex.cz/index.asp?id=9564>. (cit. 20. 12. 2010)
19. Doporučení pro hematologickou laboratoř – referenční meze krevního obrazu a diferenciálního počtu leukocytů dospělých. Schváleno: 2008.
Dostupnost na: <http://www.hematology.cz/doporučení-chs-meze.php>.
(cit. 1. 12. 2010)
20. Manuál Sysmex SP-1000i.
21. Příručka uživatele Sysmex CellaVision DM96. Verze 2.1.
22. <http://www.ral-diagnostics.fr/diagnostic/fr/M-HEM/coloration.php>
(cit. 30. 6. 2011)

PŘÍLOHY:

1. Tab.1: Zjištěné hodnoty obou metod
2. Tab.2: Doporučená referenční rozmezí krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů dospělých
3. Tab.3: Morfologie erytrocytů - určení stupně poruchy

1. Tab.1: Zjištěné hodnoty obou metod

Pacient	Neutrofilní segmenty		Neutrofilní tyče		Lymfocyty		Monocyty		Eozinofily	
	metoda A	metoda B	metoda A	metoda B	metoda A	metoda B	metoda A	metoda B	metoda A	metoda B
1	37	29	21	24	10	12	1	3	5	3
2	1	2	2	9	41	41	5	4	0	0
3	65	54	16	30	4	2	5	4	1	2
4	28	20	16	8	28	21	10	5	0	0
5	5	3	9	15	42	40	36	30	5	6
6	1	0	0	0	56	38	5	7	0	0
7	25	15	0	3	15	9	1	1	54	62
8	38	20	6	2	20	20	3	7	31	51
9	16	20	1	4	78	68	1	4	0	0
10	43	35	6	3	37	42	10	14	0	1
11	43	40	29	36	7	5	1	3	0	0
12	9	3	44	60	15	10	14	6	0	3
13	15	11	27	20	36	40	18	22	0	0
14	53	44	5	14	31	34	11	8	0	0
15	31	36	30	25	5	4	5	4	0	0
16	29	22	50	50	4	13	4	4	0	0
17	44	42	41	48	6	4	4	4	3	1
18	56	49	21	28	7	7	4	4	0	0
19	33	33	3	6	21	17	1	1	0	0
20	80	81	4	5	7	7	3	3	3	3
21	32	34	12	8	27	34	10	12	1	0
22	24	24	2	0	57	71	13	2	3	2
23	0	0	1	0	51	46	3	12	0	0
24	42	45	8	7	8	4	13	15	0	0
25	13	13	1	1	77	78	2	3	0	0
26	61	53	3	7	3	4	22	23	1	1
27	6	6	11	6	37	37	5	7	1	0
28	57	53	11	15	22	24	2	2	0	1
29	43	40	25	21	16	20	3	2	1	0
30	44	40	16	15	5	8	29	29	0	0
31	40	37	9	21	17	14	4	4	9	4
32	38	38	5	2	36	40	1	0	0	0
33	79	70	5	7	7	9	8	10	0	3
34	61	60	24	31	1	2	1	1	0	0
35	0	0	0	0	47	41	4	5	1	0
36	25	21	11	6	23	29	7	10	0	2
37	45	39	11	22	15	12	22	18	0	0
38	39	36	5	6	20	22	3	0	0	1
39	44	42	5	11	45	40	0	1	0	1
40	44	43	7	5	11	15	20	28	9	2
41	21	19	28	32	36	29	6	10	1	2
42	1	2	0	1	51	47	7	3	0	1
43	24	25	27	21	26	32	0	2	4	1
44	48	40	37	42	7	9	7	8	0	0
45	57	49	16	14	10	20	5	7	0	0
46	60	44	30	37	6	13	3	3	0	0
47	21	14	27	27	25	26	22	25	2	0
48	1	2	1	2	21	18	4	1	0	1
49	25	9	22	23	8	9	28	34	1	2
50	18	16	9	4	28	43	15	9	1	1
51	16	13	17	24	17	28	3	2	0	0
52	41	33	40	48	2	2	6	6	0	0
53	33	40	11	10	50	45	1	1	0	0
54	0	2	1	0	45	47	1	0	1	1
55	57	60	18	16	16	17	5	2	1	1
56	12	7	22	19	19	13	7	8	1	0
57	9	10	0	2	76	72	10	9	0	0
58	54	49	12	14	7	11	1	0	1	3
59	31	35	37	23	25	27	6	10	1	4
60	36	28	14	15	13	10	5	5	4	6
61	49	47	18	28	9	12	9	8	0	0
62	23	14	8	7	41	48	22	23	4	4

Pacient	Bazofily		Plazmatické buňky		Metamyelocyty		Myelocyty		Promyelocyty	
	metoda A	metoda B	metoda A	metoda B	metoda A	metoda B	metoda A	metoda B	metoda A	metoda B
1	6	5	0	0	9	13	7	5	0	0
2	0	0	1	0	8	13	0	0	0	0
3	0	2	0	0	5	2	4	4	0	0
4	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0
5	0	0	1	0	0	0	2	6	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	5	9	0	0	0	1	0	0	0	0
8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
10	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
11	0	0	0	0	8	9	12	7	0	0
12	1	1	0	0	10	5	3	8	4	4
13	0	2	0	0	3	4	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	1	0	0	0	15	13	12	16	1	2
16	1	0	0	0	5	3	3	8	2	0
17	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
18	1	0	0	0	6	7	5	5	0	0
19	22	20	0	0	1	2	4	1	0	0
20	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
21	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	1	1	0	0	5	5	3	3	1	2
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	1	0	0	6	4	4	6	0	0
27	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
28	1	0	0	0	4	5	3	0	0	0
29	1	0	0	0	1	2	1	0	0	0
30	0	1	0	0	2	2	0	1	0	0
31	2	1	2	4	1	3	1	1	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	9	5	4	1	0	0
35	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
36	0	0	1	0	2	1	1	0	0	0
37	0	0	0	0	6	3	0	6	0	0
38	18	23	0	0	1	1	1	0	0	0
39	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
40	0	1	0	0	4	2	1	0	0	0
41	0	1	4	3	0	0	0	0	0	0
42	0	0	2	1	0	1	0	0	0	0
43	0	1	0	0	2	4	2	0	0	0
44	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
45	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
46	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	2	8	1	0	0	0
48	0	0	1	1	1	2	0	0	0	0
49	0	1	0	0	5	7	11	15	0	0
50	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0
51	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	3	5	6	5	1	1
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	1	0	0	0	18	21	13	25	2	1
57	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
58	15	12	0	0	5	3	3	5	0	0
59	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	2	5	6	2	4	0	2	0	0
61	1	1	1	0	7	3	5	0	0	0
62	0	1	0	0	0	2	2	1	0	0

Pacient	Blasty		Reaktivní lymfocyty		Erytroblasty	
	metoda A	metoda B	metoda A	metoda B	metoda A	metoda B
1	4	6	0	0	3	7
2	42	31	0	0	3	2
3	0	0	0	0	1	2
4	0	0	15	45	0	0
5	0	0	0	0	11	11
6	38	55	0	0	0	0
7	0	0	0	0	1	0
8	0	0	0	0	0	0
9	3	2	0	0	0	0
10	3	3	0	0	12	13
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	5	2
13	1	1	0	0	1	0
14	0	0	0	0	15	4
15	0	0	0	0	0	0
16	2	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	15	20	0	0	14	7
20	0	0	0	0	0	0
21	0	0	17	12	0	0
22	0	0	0	0	0	0
23	45	42	0	0	0	0
24	19	18	0	0	6	8
25	5	5	2	0	0	1
26	0	1	0	0	0	1
27	0	0	38	44	0	0
28	0	0	0	0	0	0
29	9	15	0	0	0	0
30	4	4	0	0	0	0
31	0	0	15	11	0	1
32	20	20	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	47	53	0	0	0	0
36	0	0	30	31	0	0
37	1	0	0	0	0	0
38	13	11	0	0	7	6
39	4	4	0	0	0	0
40	0	0	4	4	0	0
41	0	0	4	4	0	0
42	39	44	0	0	0	0
43	15	14	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0
45	0	0	11	9	0	0
46	0	0	1	1	0	0
47	0	0	0	0	0	0
48	68	73	3	0	0	1
49	0	0	0	0	1	0
50	0	0	28	25	0	0
51	0	0	47	30	0	0
52	0	0	1	0	2	1
53	5	4	0	0	0	0
54	50	50	0	0	0	0
55	0	0	3	4	0	0
56	5	6	0	0	3	1
57	2	1	3	4	0	0
58	2	3	0	0	2	3
59	0	0	0	0	0	0
60	0	0	21	22	0	0
61	1	1	0	0	3	2
62	0	0	0	0	3	1

2. Tab. 2: Doporučená referenční rozmezí krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů dospělých (www.hematology.cz)

Věk 15 - 100 let			
Parametry KO - analyzátor	Jednotky	Ženy	Muži
Leukocyty - počet (WBC)	10 ⁹ /l	4,0 - 10,0	4,0 - 10,0
Erytrocyty - počet (RBC)	10 ¹² /l	3,80 - 5,20	4,00 - 5,80
Hemoglobin - koncentrace (HGB)	g/l	120 - 160	135-175
Hematokrit (HCT)	l/l	0,350 - 0,470	0,400 - 0,500
Střední objem erytrocytů (MCV)	fl	82,0 - 98,0	82,0 - 98,0
Střední množství hemoglobinu v erytrocytu (MCH)	pg	28 - 34	28 - 34
Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC)	kg/l	0,320 - 0,360	0,320 - 0,360
Šíře distribuce erytrocytů – směrodatná odchylka(RDW-SD)	fl	37,0 - 54,0	37,0 - 54,0
Šíře distribuce erytrocytů - variační koeficient (RDW-CV)	%	10,0 - 15,2	10,0 - 15,2
Trombocyty - počet (PLT)	10 ⁹ /l	150 - 400	150 - 400
Střední objem trombocytů (MPV)	fl	7,8 - 11,0	7,8 - 11,0
Šíře distribuce trombocytů – směrodatná odchylka (PDW-SD)	fl	9,0 - 17,0	9,0 - 17,0
Šíře distribuce trombocytů - variační koeficient (PDW-CV)	%	12,0-18,0	12,0-18,0
Šíře distribuce trombocytů – variač. koef.- ADVIA (PDW-CV)	%	25,0 - 65,0	25,0 - 65,0
Destičkový hematokrit (PCT)	ml/l	1,2 - 3,5	1,2 - 3,5
Retikulocyty - relativní počet (RET)	%	0,5 - 2,5	0,5 - 2,5
Retikulocyty - absolutní počet (RET#)	10 ⁹ /l	25 - 100	25 - 100

Věk 15 - 100 let			
Parametry DIF - analyzátor	Jednotky	Ženy	Muži
Neutrofily	%	45,0 - 70,0	45,0 - 70,0
Lymfocyty	%	20,0 - 45,0	20,0 - 45,0
Monocyty	%	2,0 - 12,0	2,0 - 12,0
Eozinofily	%	0,0 - 5,0	0,0 - 5,0
Bazofily	%	0,0 - 2,0	0,0 - 2,0
Neutrofily	10 ⁹ /l	2,00 - 7,00	2,00 - 7,00
Lymfocyty	10 ⁹ /l	0,80 - 4,00	0,80 - 4,00
Monocyty	10 ⁹ /l	0,08 - 1,20	0,08 - 1,20
Eozinofily	10 ⁹ /l	0,00 - 0,50	0,00 - 0,50
Bazofily	10 ⁹ /l	0,00 - 0,20	0,00 - 0,20

Věk 15 - 100 let			
Parametry DIF - mikroskop	Jednotky	Ženy	Muži
Neutrofilní segmenty	%	47 - 70	47 - 70
Neutrofilní tyče	%	0 - 4	0 - 4
Lymfocyty	%	20 - 45	20 - 45
Monocyty	%	2 - 10	2 - 10
Eozinofily	%	0 - 5	0 - 5
Bazofily	%	0 - 1	0 - 1

3. Tab. 3: Morfologie erytrocytů - určení stupně poruchy (Matýšková, 2006)

Morfologie	Semikvantitativní hodnocení
Polychromazie	1+ = 1 až 5 / zorné pole 2+ = 6 až 10 / zorné pole 3+ = > 10 / zorné pole
Hypochromie	
Slzičkovité erytrocyty (dakryocyty)	
Akantocyty	
Sférocyty	
Ovalocyty/eliptocyty	1+ = 3 až 10 / zorné pole 2+ = 11 až 20 / zorné pole 3+ = > 20 / zorné pole
Erytrocyty bizarních tvarů	
Terčovitě erytrocyty	
Stomatocyty	
Penízkovatění – rouleaux	1+ = agregáty 3 – 4 erytrocytů 2+ = agregáty 5 – 10 erytrocytů 3+ = četné agregáty s oj. volnými erytrocyty
Schizocyty (schistocyty)	> 1 na 1000 erytrocytů
Drepanocyty	Semikvantitativní hodnocení se neužívá (hodnotí se jako pozitivní nebo negativní nález).
Bazofilní tečkování	
Pappenheimerova tělíska	
Howell - Jollyho tělíska	