

Několik poznámek k laboratorní hematologii

s ohledem na odběr materiálu a stabilitu vzorku

Krevní obraz: měřené a vypočítané ukazatele

Moderní automatické analyzátoři (v našem případě DANAM Excell 22) měří a počítají níže uvedené ukazatele:

- Hemoglobin
- Počet bílých krvinek
- Počet erytrocytů
- Hematokrit
- Střední objem erytrocytů (MCV)
- Barvivo erytrocytu (MCH)
- Střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytu (MCHC)
- RDW (šíře distribuce erytrocytů)
- Počet destiček (v případě, že je jich méně než 100 je provedeno měření z nátěru)
- MPW (střední objem destiček)
- Pct (destičkový hematokrit)
- PDW (šíře distribuce destiček)
- Diferenciální rozpočet leukocytů (v případě jakékoliv abnormality detekované programem je proveden odečet po nátěru a barvení).

Jednotlivé ukazatele – s důrazem na odběr a preanalytické podmínky:

Erytrocyty:

Metoda měření: kombinace laser+bioimpedance, Analyzátor EXCELL 22, DANAM. event. po nátěru. Analyzátoři poskytující distribuční křivky správně vyhodnotí vzorky analyzované 1 hodinu po náběru. U pětipopulační analýzy bílých krvinek je nutné 30 minut před analýzou krev dokonale promíchat. Dřívější zpracování než za 30 minut nemusí poskytnout správný výsledek diferenciálu.

Normální hodnoty: viz tab č. 1

Klinický význam: samostatný parametr má minimální klinický význam

Odběr: EDTA, **v sedě, po 15 minutovém zklidnění** (ve stoje jsou hodnoty 5-10 % nižší).

Stažení končetiny na dobu > 2 min vede ke zvýšení počtu ery o 10%.

Odběr bezprostředně **po fyzické námaze** zvyšuje koncentrace o 10% (hemokoncentrace).

Interference: v přítomnosti **aglutininů** může být počet ery falešně snížen a jejich střední objem falešně zvýšen. Ve vyjimečných případech může dojít k záměně leukocytů nebo trombocytů a erytrocytů.

Intraindividuální variabilita: 4% ve dni, 5,8% mezi dny, 5% mezi měsíci. Přesnost 0,16 $10^{12}/l$

Stabilita vzorku: v chladničce (4-8^o C) 3 dny, při 37^o C 36 hod (poté vzestup).

MCV, MCH, MCHC, RDW

Metoda měření a výpočtu:

kombinace laser+bioimpedance, event. výpočet po nátěru a měření. Analyzátor EXCELL 22, DANAM. Analyzátoři poskytující distribuční křivky správně vyhodnotí vzorky analyzované 1 hodinu po náběru. U pětipopulační analýzy bílých krvinek je nutné 30 minut před analýzou krev dokonale promíchat. Dřívější zpracování než za 30 minut nemusí poskytnout správný výsledek diferenciálu.

MCV (l): = (Htk/počet ery)

MCH (pg): = (Hb/počet ery)

MCHC (g/l): = ((Hb:10)/Htk)

* (poznámky: Hb je vyjádřen v g/l, ery v 1 l, Htk jako frakce)

Normální hodnoty: viz tab č. 1

Klinický význam: klasifikace anemií, časný odhad patologických procesů vedoucích k anemii, odhad příčin anemie

MCV:

pokles – mikrocytóza např. při deficitu železa, B6, mědi,
vzestup – makrocytóza např. při regenerativních anemiích, při jaterní CI, u kuřáků,
alkoholiků, u osob s deficitem folátu i B12

MCH:

pokles – např. deficit Fe, Cu, B6
vzestup – např. deficit folátu a B12, regenerativní anemie

MCHC:

pokles – např. deficit Fe, Cu, B6
vzestup – např. přítomnost chladových aglutininů, hereditární sférocytóza

RDW:

pokles – např. deficit Fe, Cu, B6
vzestup – např. akutní hemolytická anemie, deficit Fe, k. listové či B12, makro či mikrocytóza obecně

Odběr: EDTA, v sedě, po 15 minutovém zklidnění (ve stoje jsou hodnoty jiné – viz ery).

Stažení končetiny na dobu delší než 2 min vede ke změnám (viz ery). 10%.

Interference:

U **leukocytózy** (>50000/ul) a **hypertriacylglycerolemie - hyperlipémie** může selhat výpočet MCH. U pacientů s **hyperglykemií** (>30 mmol/l) dochází k vzestupu MCV a MCHC.

Intraindividuální variabilita: 1,7% ve dni, 5,7% mezi dny, 5,3% mezi měsíci. Přesnost Hb 3g/l.

Stabilita vzorku: v chladničce (4-8⁰ C) 3 dny, při pokojové teplotě 7-12 hod, při 37⁰ C 7 hod

Hemoglobin

Metoda měření:

Hemiglobinkyanidová metoda. Analyzátor EXCELL 22, DANAM

Normální hodnoty: viz tab č. 1

Klinický význam: společně s hodnotou Htk klasifikace anemií, časný odhad patologických procesů vedoucích k anemii, odhad příčin anemie

Odběr: EDTA,

Interference:

Lipémie (falešně zvyšuje hodnoty Hb – až o 30g/l), **leukocytóza** (>20000/ul) falešně zvyšuje Hb – až o 30g/l), **trombocytóza** (>700000) falešně zvyšuje Hb – až o 30g/l).

Intraindividuální variabilita: 1,7% ve dni, 5,7% mezi dny, 5,3% mezi měsíci

Stabilita vzorku: v chladničce (4-8⁰ C) 3 dny, při pokojové teplotě 7-12 hod, při 37⁰ C 7 hod

Hematokrit

Metoda měření:

Laserová technologie, kombinace s výpočtem v hematologickém analyzátoru = MCVxEry/10¹⁵ Analyzátor EXCELL 22, DANAM

Normální hodnoty: viz tab č. 1

Klinický význam: společně s hodnotou Hb klasifikace anemií, časný odhad patologických procesů vedoucích k anemii, odhad příčin anemie

Odběr: EDTA, v sedě, po 15 minutovém zklidnění (ve stoje jsou hodnoty o 5-10% nižší).

Stažení končetiny na dobu delší než 2 min vede ke zvýšení o 10%.

Odběr bezprostředně **po fyzické námaze** zvyšuje koncentrace o 10% (hemokoncentrace).

Interference:

Leukocytóza nebo zvýšení počtu **retikulocytů** může falešně zvyšovat Htk.

Intraindividuální variabilita: 4,6% ve dni, 4,1% mezi dny, 3,4% mezi měsíci

Stabilita vzorku: v chladničce (4-8⁰ C) 1 den, při pokojové teplotě 1 den

Retikulocyty

Metoda měření:

Nátěr, mikroskopicky

Normální hodnoty: viz tab č. 1

Klinický význam:

Využíváme korekci na Htk = (počet retikulocytů (%) * Htk (%))/45

Využívá se k diferenciaci anemií (neregenerativní a hyperregenerativní typy), k odhadu aktivity funkce kostní dřeně, k monitorování účinnosti terapie „deficitních“ anemií (Fe, Cu, B6, B12, folát), odhad erytropoézy u pacientů po transplantaci kostní dřeně, u osob s aplastickou anemií, po léčbě cytotoxickými léky či po terapii erythropoetinem

Odběr: EDTA.

Interference:

Mikroskopický odhad vyžaduje precizní odběr. Výsledky jsou běžně zatíženy asi **25% chybou** (mezilaboratorní srovnatelnost vykazuje až 50% chyby).

Intraindividuální variabilita: 25%

Stabilita vzorku: v chladničce (4-8⁰ C) 3 dny, při pokojové teplotě 1 den

Trombocyty

Metoda měření: kombinace laser+bioimpedance. Analyzátor EXCELL 22, DANAM

Při hodnotách < 100000/ul se provádí nátěr - mikroskopicky

Analyzátory poskytující distribuční křivky správně vyhodnotí vzorky analyzované 1 hodinu po náběru. U pětipopulační analýzy bílých krvinek je nutné 30 minut před analýzou krev dokonale promíchat. Dřívější zpracování než za 30 minut nemusí poskytnout správný výsledek diferenciálu.

Normální hodnoty: viz tab č. 1

Klinický význam:

Pomocný ukazatel hemostatického systému. Trombocytopenie (<10000/ul) je spojena s rizikem krvácení (za trombocytopenii se ale považují hodnoty již < 150000/ul), trombocytóza (>1000000/ul) je spojena s rizikem vzniku trombózy. opoetinem

Odběr: EDTA.

Interference:

V případě trombocytopenií (byla určena hodnota <100000/ul) se provádí mikroskopické měření z nátěru.

Intraindividuální variabilita: 6,7% ve dni, 11,5% mezi dny, 10,6% mezi měsíci
25%

Stabilita vzorku: při pokojové teplotě 1 den

MPV (střední objem trombocytů)

Metoda měření: kombinace laser+bioimpedance.

Normální hodnoty: viz tab č. 1

Klinický význam:

Při **akutním krvácení** je hodnota MPV inverzní k počtu trombocytů. U pacientů s **aplastickou anemií, megaloblastickou anemií, SLE** nebo při **chemoterapii malignit** je počet destiček i MPV snížen

Odběr: EDTA.

Interference: není známo

Intraindividuální variabilita: není známo. Přesnost: PLT 24 10⁹ /l

Stabilita vzorku: při pokojové teplotě 1 den.

Trombocyty – agregabilita in vitro (stimulace kolagenem, ADP, adrenalinem, CPG a ristocetinem)

Metoda měření: Bornova turbidimetrická metoda, agregometr APACT II laser+bioimpedance.

Normální hodnoty: viz tab č. 1

Klinický význam:

Trombocytopenie. Monitorování účinnosti terapie antiagregačními léky.

Odběr: Na citricum. Zvláštní zkumavka, stabilní CO₂, konstantní pH.

Interference:

V případě snížení počtu trombocytů pod 100000/ul je vyšetření zatíženo chybou.

Intraindividuální variabilita: není známo. V případě ADP, kolagenu i adrenalinu je CV vysoká. CPG má CV významně nižší. Přesnost: PLT 24 10⁹ /l

Stabilita vzorku: nutno zpracovat do 2 hodin po odběru. Po separaci (centrifugaci) je nutno počkat 30 min před testováním – omezení aktivace trombocytů.

Leukocyty - absolutní počet, diferenciální rozpočet

Metoda měření: kombinace laser+bioimpedance. Analyzátor EXCELL 22, DANAM

Analyzátory poskytující distribuční křivky správně vyhodnotí vzorky analyzované 1 hodinu po náběru. U pětipopulační analýzy bílých krvinek je nutné 30 minut před analýzou krev dokonale promíchat. Dřívější zpracování než za 30 minut nemusí poskytnout správný výsledek diferenciálu.

Normální hodnoty: viz tab č. 1

Klinický význam:

Infekce, choroby kostní dřeně. V případě výskytu atypických buněk (kombinace laser+bioimpedance) je proveden nátěr

Odběr: EDTA. Pokud se provádí odběr z prstu je potřeba **první 2 kapky otřít.**

Interference:

V případě přítomnosti **kryoglobulinů** se může při měření na analyzátoru (při pokojové teplotě) vyskytnout pseudoleukocytóza.

Intraindividuální variabilita: 20% ve dni, 16,3% mezi dny, 17,3% mezi měsíci
25%. Přesnost $0,3 \cdot 10^9/l$

Stabilita vzorku: v chladničce (4-8⁰ C) 2 dny, při pokojové teplotě 1 den. Do 3-4 hodin v případě diferenciálního rozpočtu.

Kdy se odečítají diferenciální rozpočty leukocytů z nátěru:

1. Nevydá-li přístroj absolutní hodnoty počtu bílých krvinek
2. Objeví-li se hlášky
 - a. „BLAST“ - ve vzorku mohou být blasty nebo shluky monocytů
 - b. „N“ - přítomnost abnormálních ery, mikrobublin, shluků lymfocytů
 - c. „L“ - deformace lymfocytů, atypické lymfocyty - celkový počet není ovlivněn, ale zařazení buněk může být chybné
 - d. „DIFF“ - nízký počet bílých krvinek, nelze oddělit 2 populace
3. Jsou-li leukocyty $< 1,5$ nebo $> 20 \cdot 10^9/l$
4. Je-li RDW > 24 .
5. Je-li počet kr. destiček < 100 nebo > 700 .
6. Jsou-li hodnoty diferenciálu v procentech:
 - a. Neutrofilů $< 20\%$ $> 95\%$
 - b. Lymfocyty $< 65\%$
 - c. Monocyty $> 25\%$
 - d. Eosinofily $> 25\%$ u dospělých
 - e. Bazofily $> 3\%$, u novorozenců $> 5\%$

Protrombinový čas (QUICK)

Metoda měření: Srážení test podle Quicka. Analyzátor STAGO Comp.

Normální hodnoty: viz tab č. 2

Klinický význam:

Screeningový test, který zahrnuje faktory protrombinového komplexu (II, VII, X), faktor V, a faktor I. Sleduje vnější cestu aktivace protrombinu. Využívá se ke screeningu hemostatických onemocnění a k monitorování účinnosti antagonistů vitamínu K. Výsledky se vydávají po konverzi jako INR (International Normalized Ratio), kdy jsou výsledky vztaženy k tromboplastinu kalibrovanému na WHO tromboplastin – IRP67/40 - podle doporučení ICSH a ISTH. Při prodloužení indexu INR u osob neléčených kumariny je vhodné provedení screeningového testu na přítomnost LA a směsného testu k odhadu deficitu faktorů nebo jejich inhibitoru.

Odběr: Sterilní, Na citricum.

- 1) **Jsou nutné plastové zkumavky** (ve skle dochází k aktivaci koagulačních faktorů).

- 2) **Nežádoucí je delší zatažení paže**, které vede k lokální aktivaci fibrinolýzy.
- 3) **Technicky chybný odběr (paravenozní), manipulace s jehlou v ráně nebo rychlý náběh krve** vede k aktivaci koagulace a tím zkrácení výsledků.
- 4) Nedodržení **poměru antikoagulans (Na citricum) a vzorku** (tedy málo nebo hodně vzorku ve zkumavce) vede k prodloužení (nebo zkrácení) INR. U pacientů s vyšším hemotokritem (a tedy nižším objemem plasmy) se doporučuje použít menšího objemu citrátu. V případě velmi nízkého hematokritu lze korigovat množství citrátu následovně: $\text{Objem krve (ml)} = \text{Objem Na citrátu (ml)} * ((1-0,45)/(1-\text{Htk}))$
- 5) **Vzorek nesmí být ihned po odběru míchán** (vede k prodloužení koagulačních časů).
- 6) **Vzorek musí být správně centrifugován** (pokud obsahuje supernatant destičky mohou být časy změněny)
- 7) Pokud vznikne po odběru nebo transportu **hemolýza** dojde ke zkrácení koagulačních časů (prokoagulační efekt)
- 8) Pokud je pacient léčen **heparinem** může dojít k prodloužení INR snížením aktivity protrombinového komplexu
- 9) Pokud má pacient **trombembolii** (přítomnost degradačních produktů fibrinu) může dojít k prodloužení INR
- 10) **Terapie PNC** může vést k prodloužení INR (zvláště důležité u dětí)
- 11) Terapie koncentrovanými roztoky **NaCl** vede k prodloužení aPTT i INR
- 12) Při odběru **u dětí „kapací metodou“ je vhodné několik kapek odlít mimo** odběrovou nádobku (prokoagulační aktivita)
- 13) U osob s **lipemickými** vzorky mohou být vyšetření zkreslena

Interference:

Viz výše

Intraindividuální variabilita: není známo.

Stabilita vzorku: **4 hodiny v pokojové teplotě**. 3 týdny při teplotě -20°C . Při delším trvání dochází k inaktivaci f V a f VIII.

aPTT

Metoda měření: Srážení test s mozkovými fosfolipidy a aktivátorem kaolinem. Analyzátor STAGO Comp. Test je citlivý na deficit koagulačních faktorů i přítomnost inhibitorů koagulační kaskády.

Normální hodnoty: viz tab č. 2

Klinický význam:

Screeningový test, který zahrnuje faktory vnitřní cesty (VIII, IX, XI, XII), prekalikrein a HMWK. Sleduje vnitřní cestu aktivace protrombinu. Využívá se ke screeningu hemostatických onemocnění a k monitorování účinnosti léčby heparinem. Výsledky se vydávají jako APTT-Ratio (poměr naměřené hodnoty k hodnotě kontroly).

Celosvětově závažným problémem je neexistence standardu aPTT, tedy referenčních intervalů (hodnoty závisí na použitém metodice analýzy, reagentii i typu analyzátoru).

Při prodloužení indexu APTT-R u osob neléčených heparinem nebo dikumariny je vhodné provedení screeningového testu na přítomnost LA a směšného testu k odhadu deficitu faktorů nebo jejich inhibitoru.

Odběr: Na citricum.

- 1) **Jsou nutné plastové zkumavky** (ve skle dochází k aktivaci koagulačních faktorů).
- 2) Nežádoucí je **delší zatažení paže**, které vede k lokální aktivaci fibrinolýzy.
- 3) **Technicky chybný odběr (paravenozní) nebo rychlý náběh krve či manipulace jehlou v ráně vede k aktivaci koagulace** a tím zkrácení výsledků.

- 4) **Nedodržení poměru antikoagulans** (Na citricum) a vzorku (tedy málo nebo hodně vzorku ve zkumavce) vede k prodloužení (nebo zkrácení) aPTT.
- 5) **Vzorek nesmí být ihned po odběru míchán** (vede k prodloužení koagulačních časů).
- 6) Vzorek musí být správně centrifugován (pokud obsahuje supernatant destičky mohou být časy změněny)
- 7) Pokud vznikne po odběru nebo transportu **hemolýza** dojde je zkrácení koagulačních časů (prokoagulační efekt)
- 8) Pokud má pacient **trombembolii** (přítomnost degradačních produktů fibrinu) může dojít k prodloužení aPTT
- 9) **Terapie PNC** může vést často k prodloužení aPTT (zvláště důležité u dětí)
- 10) Terapie koncentrovanými **roztoky NaCl** vede k prodloužení aPTT
- 11) Při odběru u dětí „kapací metodou“ je vhodné několik kapek odlít mimo odběrovou nádobku (prokoagulační aktivita)
- 12) U osob s **lipemickými** vzorky mohou být vyšetření zkreslena

Interference:

Viz výše

Intraindividuální variabilita: není známo.

Stabilita vzorku: **4 hodiny v pokojové teplotě**. 3 týdny při teplotě -20° C. Při delším trvání dochází k inaktivaci f V a f VIII.

Trombinový čas

Metoda měření: Srážení test. Sleduje přeměnu fibrinogenu na fibrin. Analyzátor STAGO Comp.

Normální hodnoty: viz tab č. 2

Klinický význam:

Screeningový test, který při normálních hodnotách aPTT i INR ukazuje buď na terapii heparinem nebo na přítomnost vystupňované fibrinolýzy (nebo dys či hypofibrinogenemie). U pacientů s sepsi, při jaterních chorobách či rozsáhlém AIM je trombinový čas lepším indikátorem účinnosti terapie heparinem než aPTT. Zkrácení TT může ukazovat na zvýšenou koncentraci fibrinogenu. Účinnost trombolýzy lze monitorovat také pomocí TT (2-4x zvýšení).

Odběr: Na citricum.

Interference:

Viz výše

Intraindividuální variabilita: není známo.

Stabilita vzorku: 4 hodiny v pokojové teplotě. 3 týdny při teplotě -20° C.

Koagulační faktory

Metoda měření: Srážení testy s faktory deficitní plasmou.

Normální hodnoty: viz tab č. 2

Klinický význam:

Měření deficitu nebo nadměrné koncentrace(aktivity) faktorů pro odhad rizika krvácení, resp. trombofilních stavů. Monitorování účinnosti terapie koagulačními faktory.

Odběr: Na citricum.

- 1) **Jsou nutné plastové zkumavky** (ve skle dochází k aktivaci koagulačních faktorů).
- 2) Nežádoucí je **delší zatažení paže**, které vede k lokální aktivaci fibrinolýzy.

- 3) Technicky **chybný odběr (paravenozní) nebo rychlý náběr krve či manipulace jehlou v ráně vede k aktivaci koagulace** a tím zkreslení výsledků.
- 4) **Nedodržení poměru antikoagulans (Na citricum) a vzorku** (tedy málo nebo hodně vzorku ve zkumavce) vede k prodloužení (nebo zkrácení) aPTT.
- 5) **Vzorek nesmí být ihned po odběru míchán** (vede k prodloužení koagulačních časů).
- 6) Vzorek musí být správně centrifugován (pokud obsahuje supernatant destičky mohou být časy změněny)
- 7) Pokud vznikne po odběru nebo transportu **hemolýza** dojde je zkrácení koagulačních časů (prokoagulační efekt)
- 8) Pokud má pacient **trombembolii** (přítomnost degradačních produktů fibrinu) může dojít k prodloužení aPTT
- 9) **Terapie PNC** může vést často k prodloužení aPTT (zvláště důležité u dětí)
- 10) Terapie koncentrovanými **roztoky NaCl** vede k prodloužení aPTT
- 11) Při odběru u dětí „kapací metodou“ je vhodné několik kapek odlít mimo odběrovou nádobku (prokoagulační aktivita)
- 12) U osob s **lipemickými** vzorky mohou být vyšetření zkreslena

Interference:

Viz výše

Intraindividuální variabilita: není známo.

Stabilita vzorku: 4 hodiny v pokojové teplotě. 3 týdny při teplotě -20° C. Při delším trvání dochází k inaktivaci f V a f VIII.

Fibrinogen

Metoda měření: Srážení Clausova metoda

Normální hodnoty: viz tab č. 2

Klinický význam:

Protein akutní fáze, ukazatel poškození jaterní proteosyntézy, marker konzumce fibrinogenu při DIC.

Odběr: Na citricum.

Interference:

Přítomnost degradačních produktů fibrinu falešně snižuje hodnoty fbg.

Intraindividuální variabilita: není známo.

Stabilita vzorku: 4 hodiny v pokojové teplotě. 3 týdny při teplotě -20° C. Při delším trvání dochází k inaktivaci f V a f VIII.

Literatura:

- 1) Rodak BF: Diagnostic Hematology. WB Saunders Company, 1995:720
- 2) Thomas L: Clinical Laboratory Diagnostic. TH-Books, 1998:1527
- 3) Matýšková M: Hematologie. IDPVZ, 1999:201
- 4) Pecka M, Malý J.: Laboratorní hematologie. HK Kredit, 2000:103
- 5) Seghatchian MJ, Samama MM: Hypercoagulable States CRC Press, 1996:462
- 6) Pecka M, Malý J, Dejmková J.: Přehled Laboratorní hematologie III. Galén, 1998:151