

Dnes:

Hematologie 2

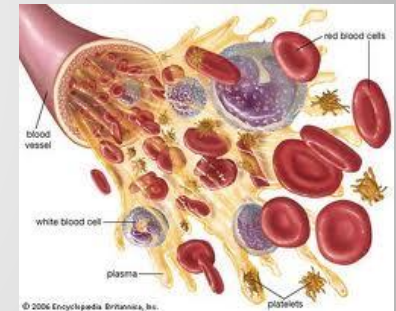
- **Základní a speciální vyšetřovací metody v hematologii**



minule:

Hematologie 1

- **Klinická hematologie a transfuzní služba**
- charakteristika oboru
- **Složení krve a krvetvorných orgánů**



Závěrečné shrnutí – 1:

Co to je hematologie?

Závěrečné shrnutí – 1:

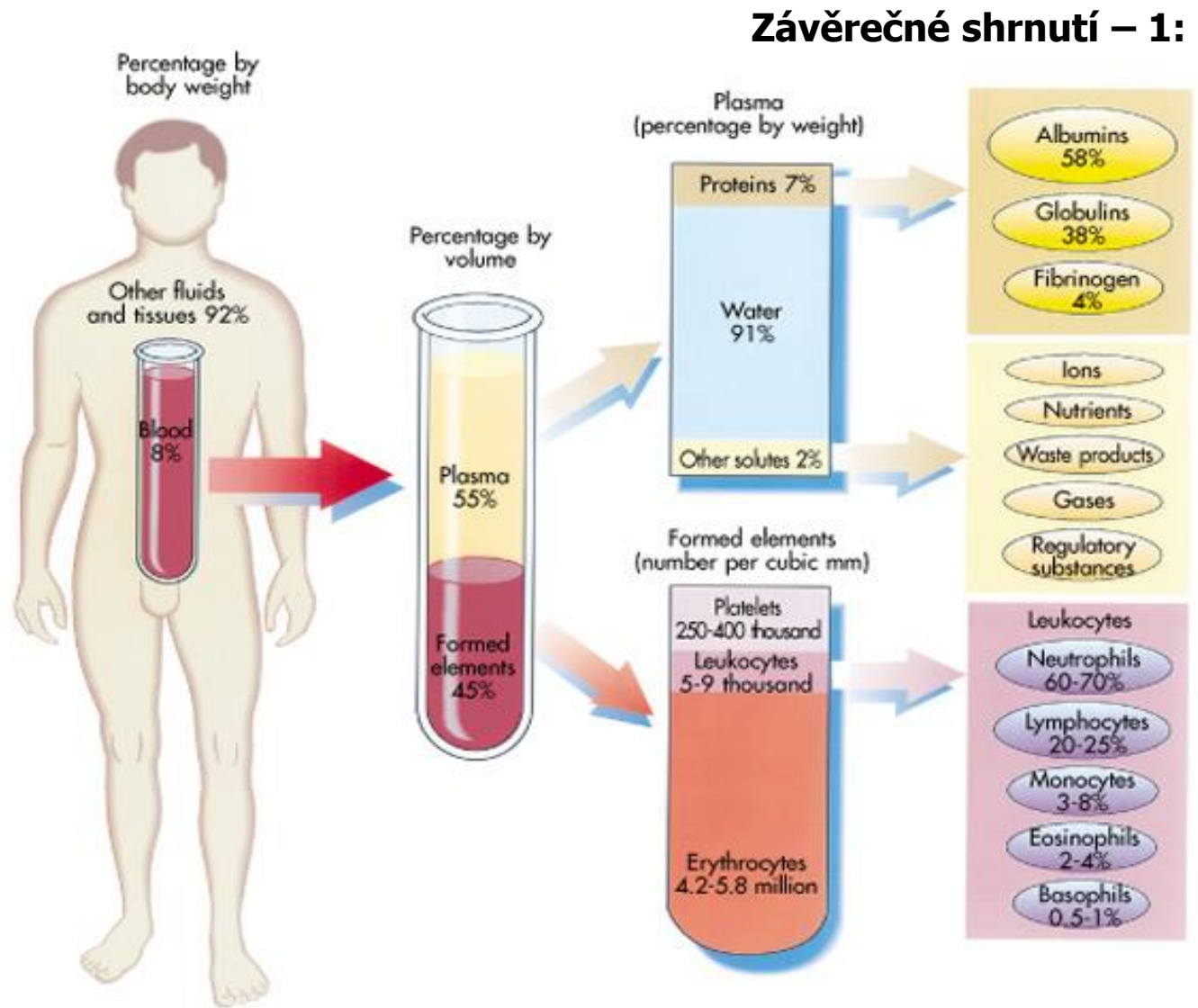
- **Hematologie je nauka o krvi**, její název je odvozen z řeckých slov haima (krev) a logos (slovo). **Zabývá se krví, krvetvornými orgány a krvetvorbou** a to za
 - normálních (fyziologických) a
 - chorobných (patologických) stavů organismu.
- Hematologie je **multidisciplinární obor** a významně zasahuje i do ostatních oblastí medicíny

Co to je hematologie?

Závěrečné shrnutí – 1:

- Hematologie
- - **primárně studuje krevní elementy**
- - **změny krvinek**
 - - jsou nejčastěji druhotným projevem nemoci a nikoli prvotní krevní chorobou
 - - často jsou první známkou choroby (infekce..)
 - - proto laboratorní vyšetření krve patří mezi základní

Složení krve



Složení a funkce krve

Závěrečné shrnutí – 1:

- plná krev se skládá z:

- Plazmy (~55%); cca 3 l, 5 % těles. hmotnosti

- Krevních elementů:

- **Erytrocytů** (Ery; RBC) (~45%)

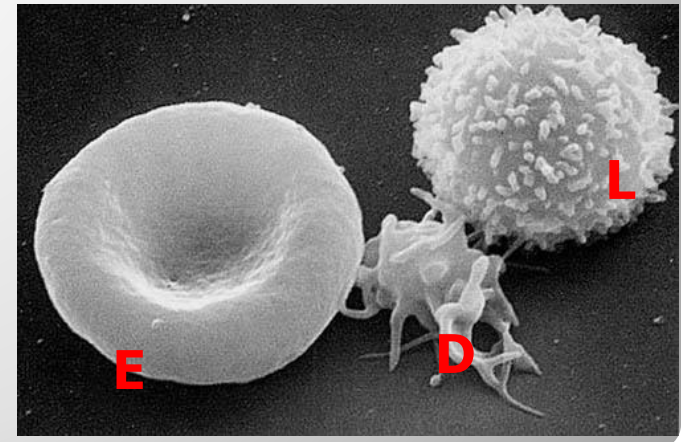
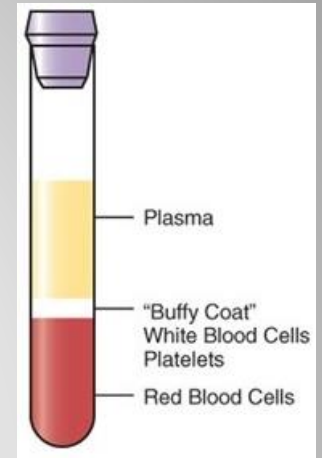
- funkce: transport a výměna O_2 and CO_2

- **Leukocytů** (Leu; WBC) (~1%)

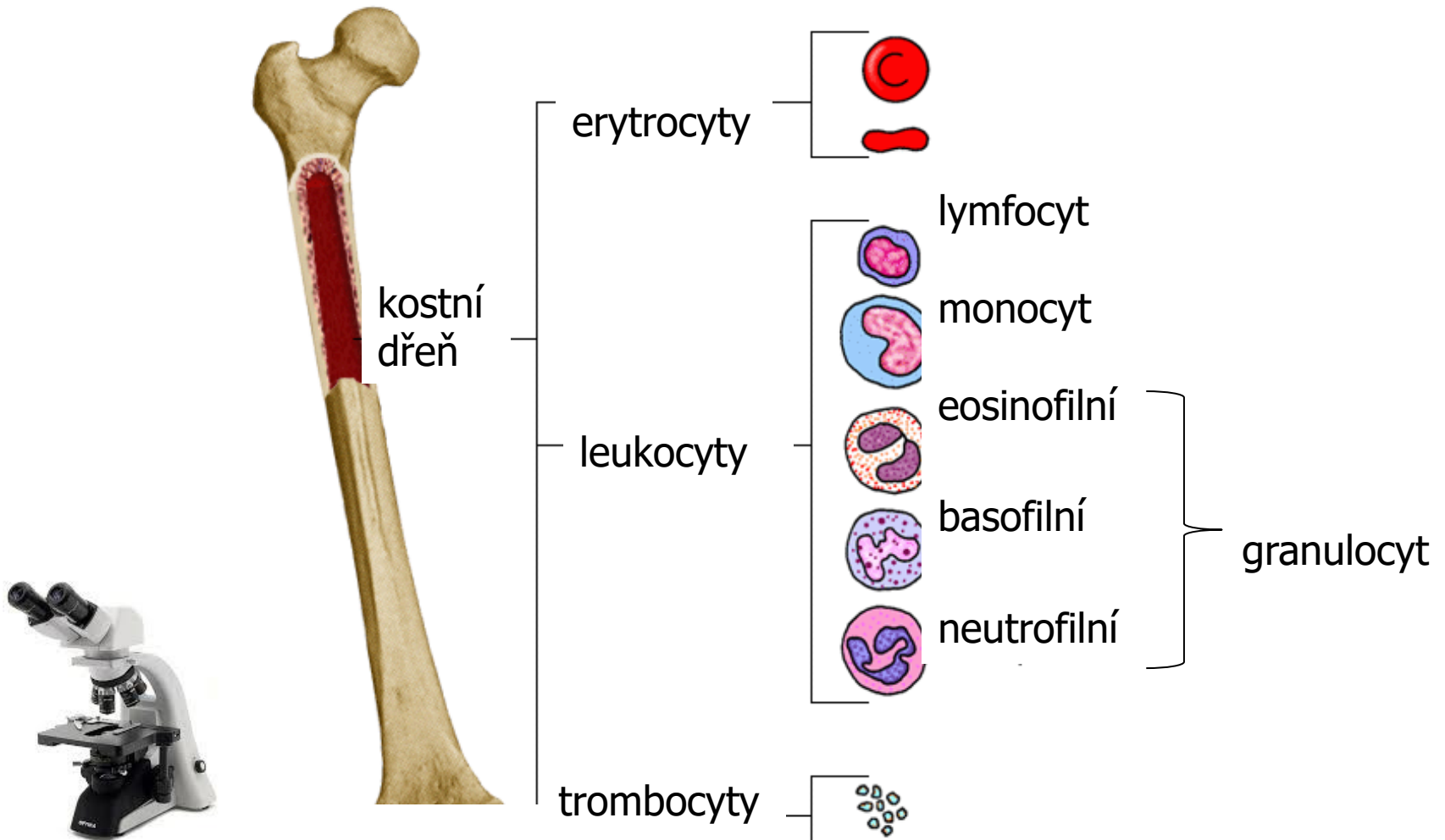
- funkce: obrana proti infekci

- **Destiček** (Dest; Tr, PLt)

- funkce: zástava krvácení



Vznik a vývoj krvinek v kostí dřeni



Složení a funkce krve: erytrocyty

- Funkce erytrocytů

- Transport O_2 z plic do tkání
- Transport CO_2 z tkání do plic
- Spoluúčast na regulaci acido-basické rovnováhy (ABR)
- **Hemoglobin:** výměna plynů, ABR

Funkce krve

- Transport výživných látek z trávicího traktu
- Transport odpadových látek metabolismu
- Transport hormonů
- Distribuce tepla v organismu

Složení a funkce krve: **leukocyty**

Druhy bílých krvinek, leukocytů (WBC- White Blood Cells):

Granulocyty

Neutrofilní

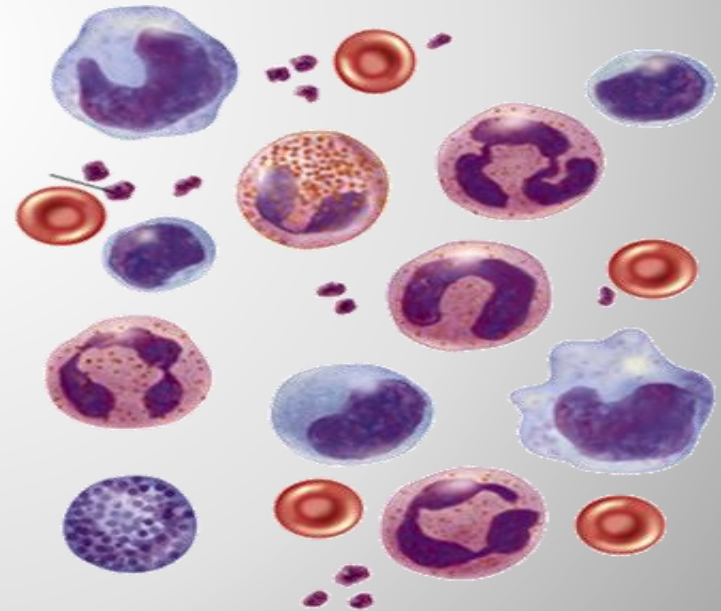
Eosinofilní

Basofilní

Agranulocyty

Lymfocyty

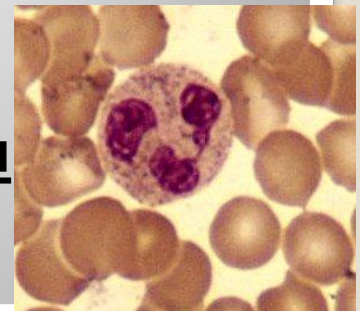
Monocyty



Složení a funkce krve: leukocyty

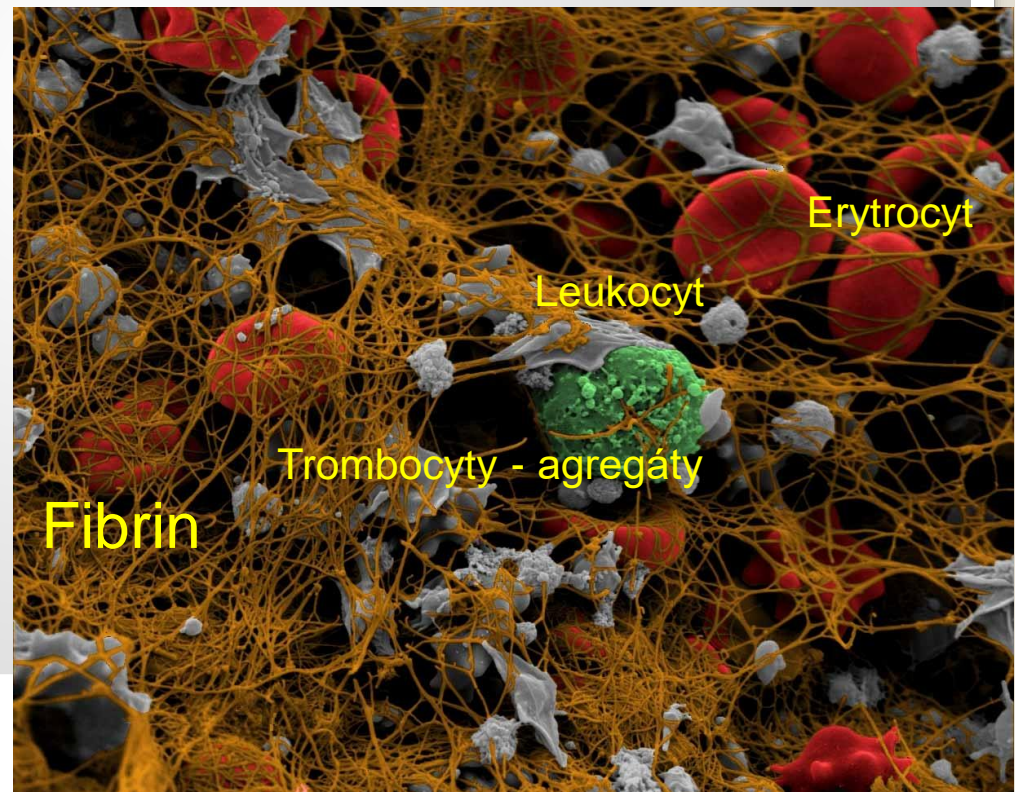
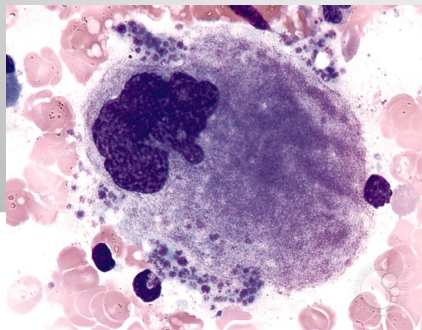
Zásadní význam v protiinfekční obraně

- Fagocytóza – pohlcování škodlivých mikroorganismů a odpadových částic z krve a tkání
- azurofilní granula obsahují lytické enzymy, které zabíjí mikroby
- Produkci cytokinů (leukotrieny, tromboxany a prostaglandiny) se účastní zánětlivého procesu
- Odumřelé neutrofily vytvářejí hnis



Složení a funkce krve: **trombocyty** destičky

- nejmenší z pevných součástí krve
- **zásadní postavení ve srážení krve**
- účastní se na vzniku trombóz a embolií
- nejsou buňkami, pouze fragmenty cytoplasmy obrovských buněk, megakaryocytů (mgc).
- mgc jsou v kostní dřeni



Dnes : 2

Obsahové zaměření přednášek:

1. Obsah oboru klinické hematologie
2. **Základní a speciální vyšetřovací metody v hematologii**
3. Krevní transfúze, indikace pro podání transfúze. Dárcovství krve. Problematika dárcovství krve
4. Posttransfúzní reakce a komplikace - hemolytická transfúzní reakce, pyretická reakce, alergická reakce, infekční agens, viry, bakterie, další možná rizika
5. Autologní transfúze (autotransfúze) - indikace k autotransfúzi, druhy autotransfúzi, kontraindikace autotransfúzi

Dnes:

Hematologie 2

- **Základní a speciální vyšetřovací metody v hematologii**



Základní a speciální vyšetřovací metody v hematologii

Abychom věděli co vyšetřovat, musíme znát:

a/ fyziologické procesy v křvetvorbě:

Vznik a vývoj křvinek v kostí dřeni

vznik a stadia vývoje (vyzřávání) **erythrocytu**

vznik a vyzřávání (stadia) bílých křvinek

– **leukocytů**

lymfocytů

vznik a vyzřávání křevních destiček – **trombocytů**

Základní a speciální vyšetřovací metody v hematologii

Abychom věděli co vyšetřovat, musíme znát:

b/ patologické procesy v krvetvorbě:

nedostatečná tvorba /předčasný zánik erytrocytu- **anémie**

Nadměrná tvorba erytrocytů - **polycytémie**

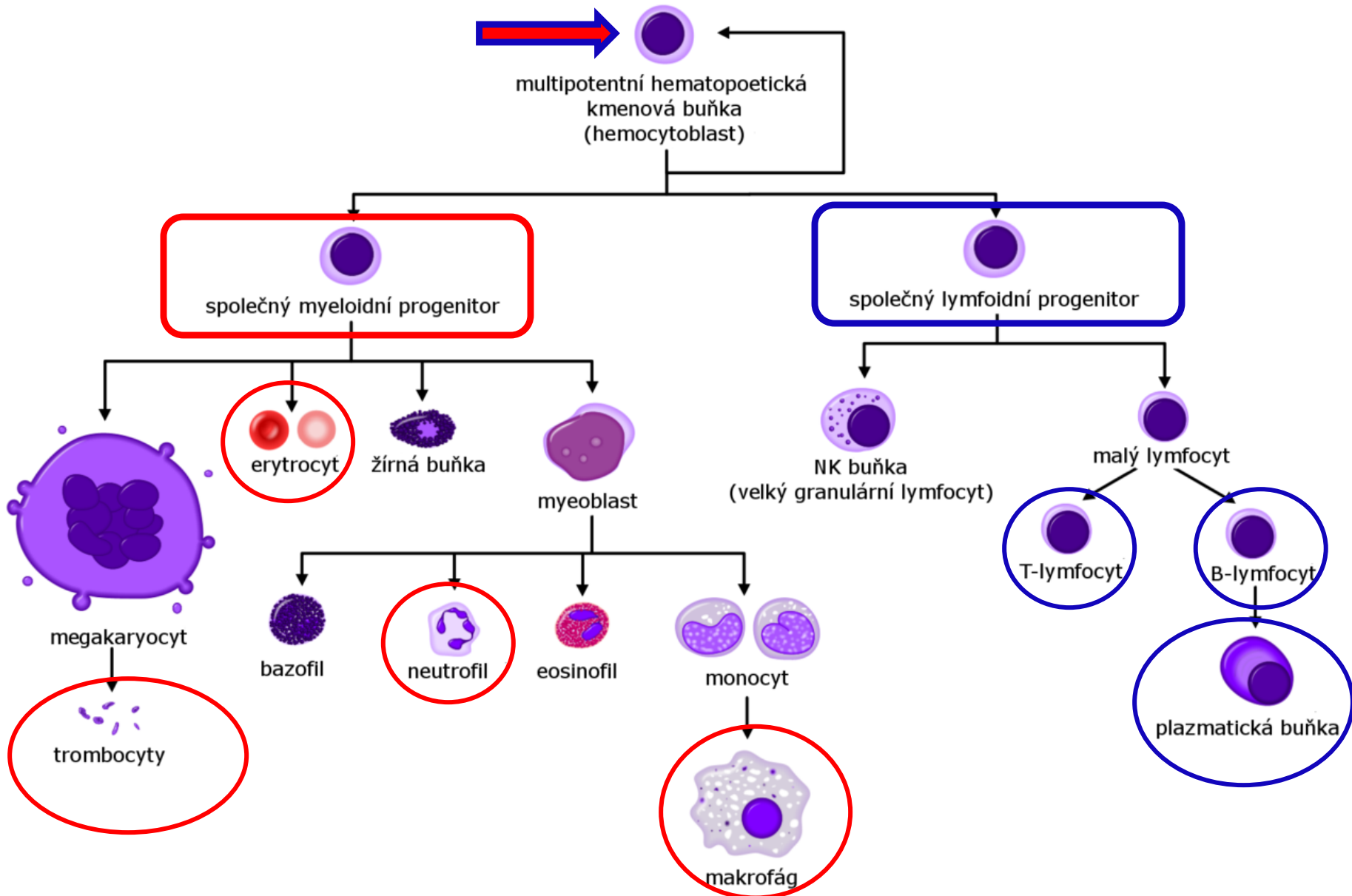
patologická zvýšená tvorba leukocytů - **leukémie**

Nedostatečný počet leukocytů - **leukopenie**

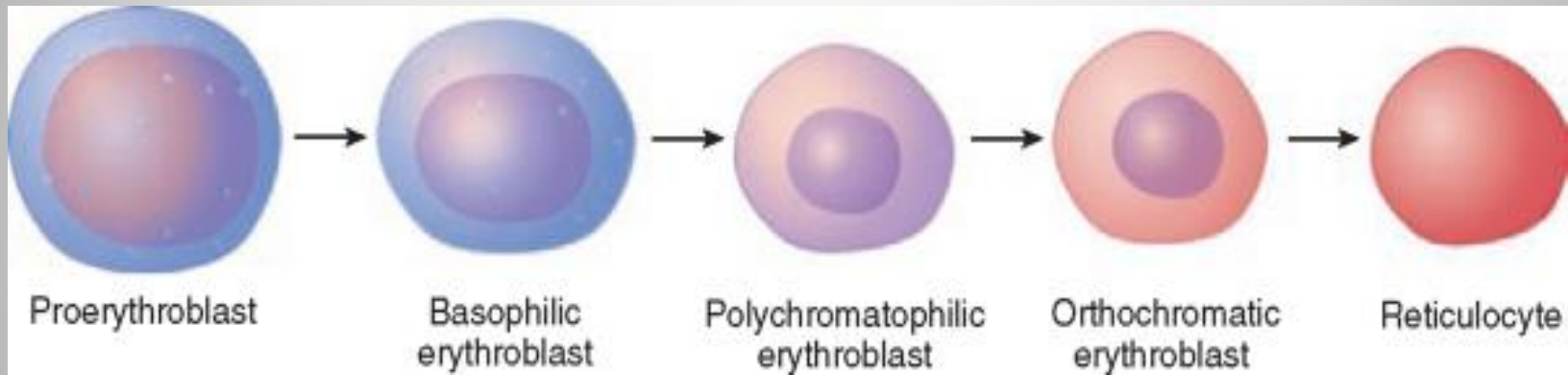
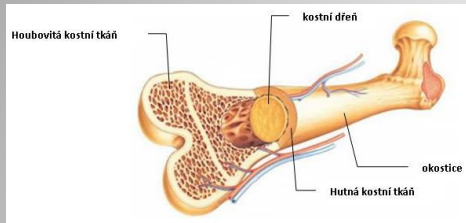
nedostatečná tvorba / předčasný zánik trombocytů - **trombocytopenie**

Nadměrná tvorby trombocytů – **trombocytémie**

Vznik a vývoj krvinek v kostí dření



Vývoj a zrání erythrocytu - erythropoéza

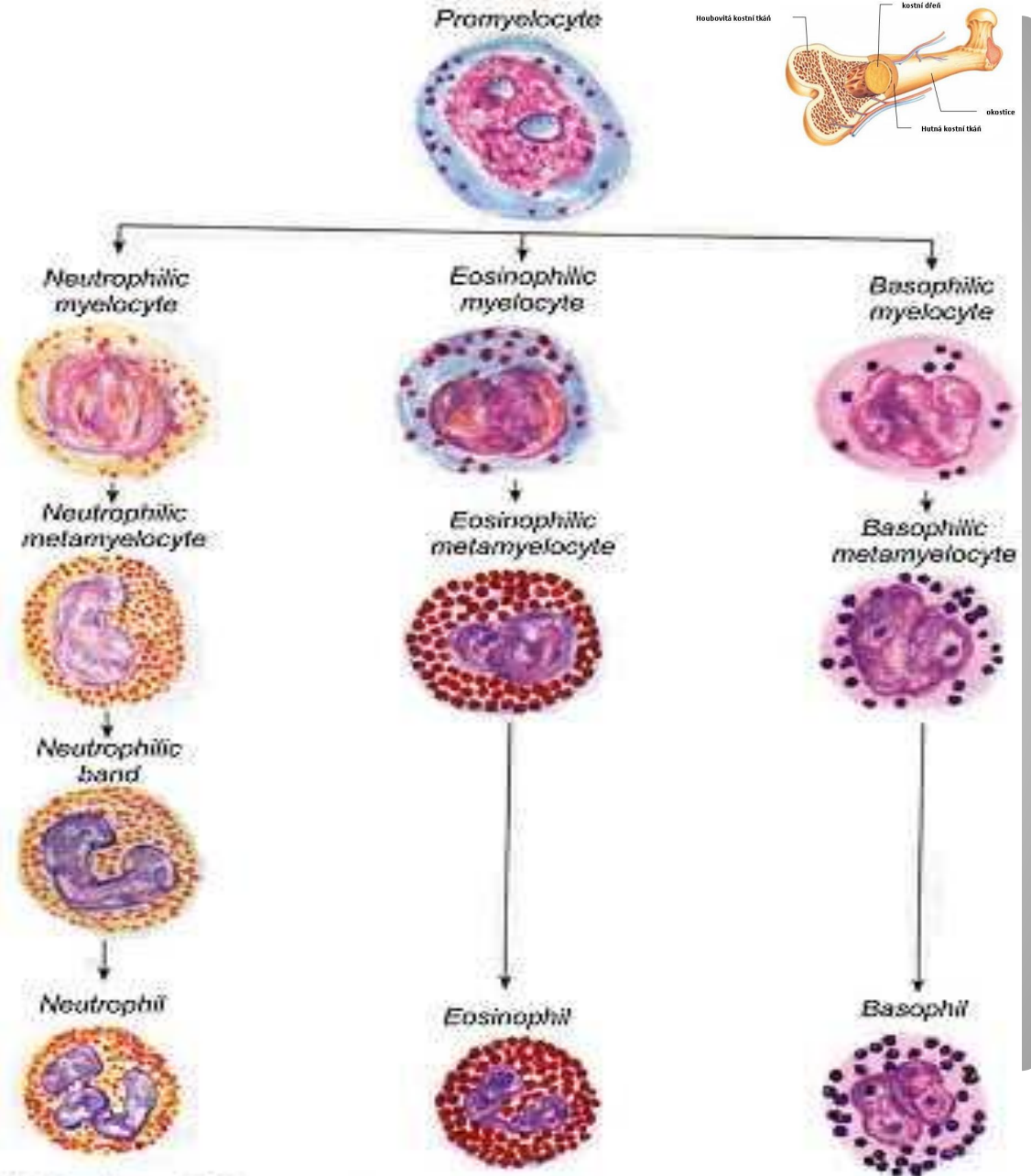


Proerythroblast	Bazofilní erythroblast	Polychromatofilní erythroblast	Ortochromní erythroblast	Retikulocyt
-----------------	------------------------	--------------------------------	--------------------------	-------------

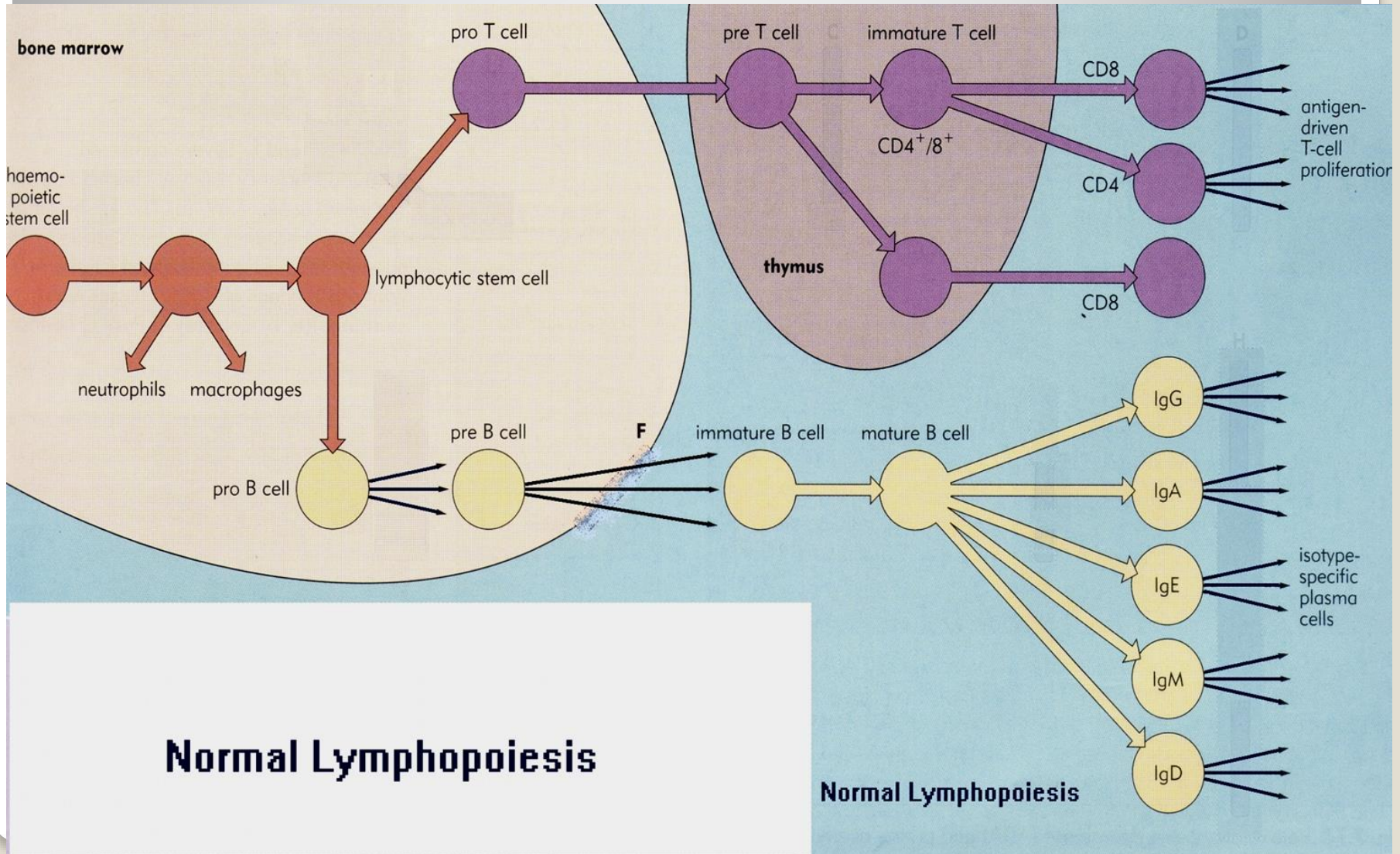


Erythrocyt

Vývoj a zrání granulocytu - granulopoéza

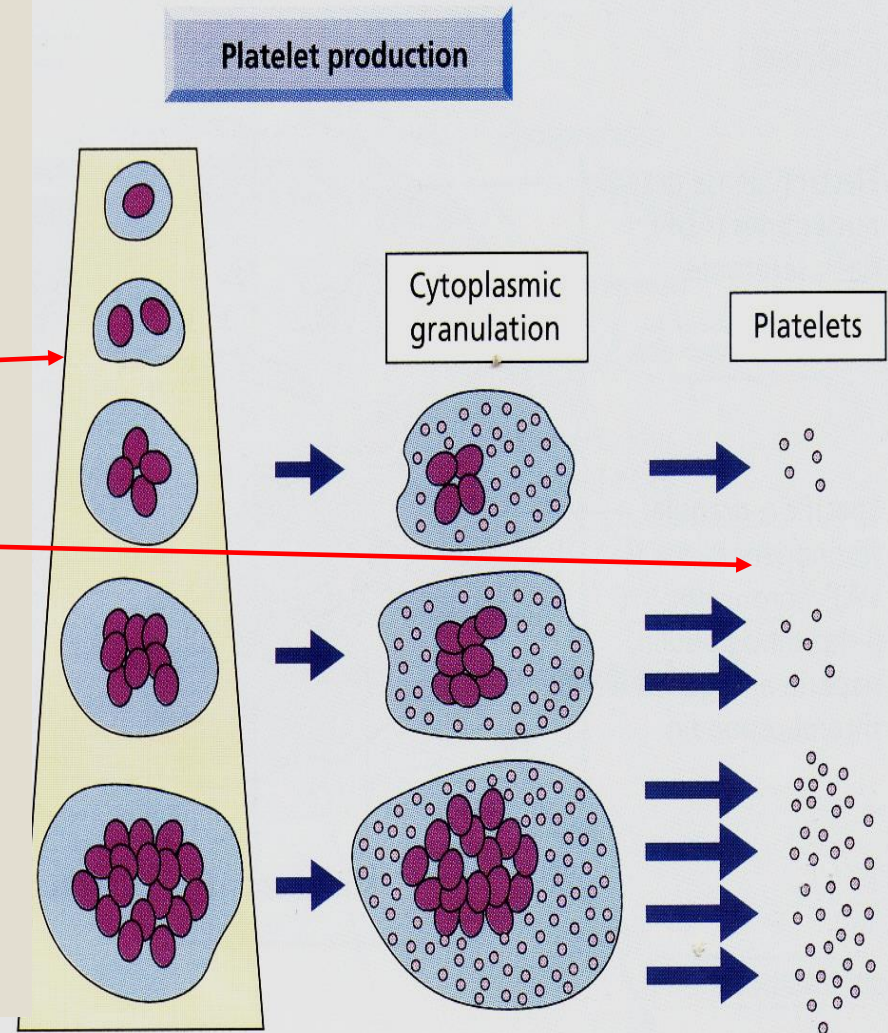


Vývoj a zrání lymfocytu - lymfopoéza



Trombopoéza - vývoj krevních destiček

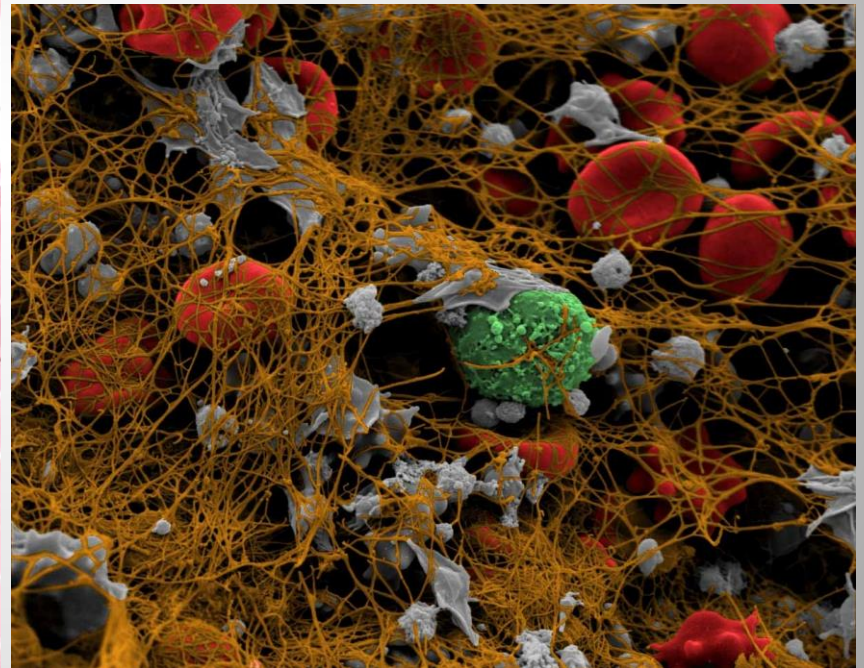
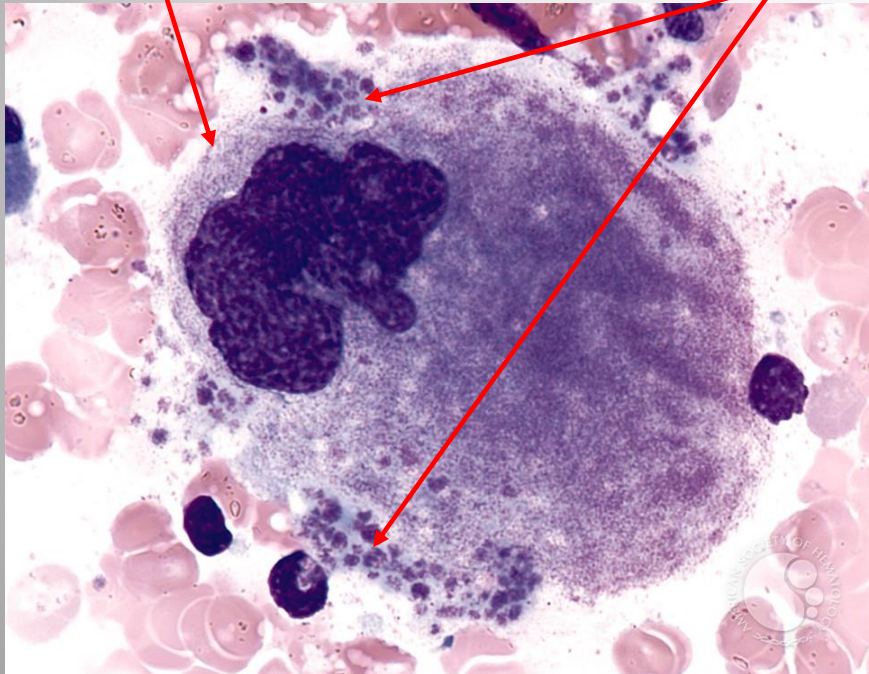
- hlavní role v primární hemostáze (srážení krve)
- délka života 7-10 dní
- megakaryocyty procházejí endomitotickým dělením
- Následuje odštěpování destiček
- 1/3 je ve slezině



Trombopoéza - vývoj krevních destiček

megakaryoblast -

- megakaryocyt (mgc) mnohojaderná gigantická buňka
- trombocyty (odštěpují se z mgc)



Imunokompetentní buňky

Imunokompetentní buňky = krevní buňky, které zprostředkovávají **imunitní odpověď**

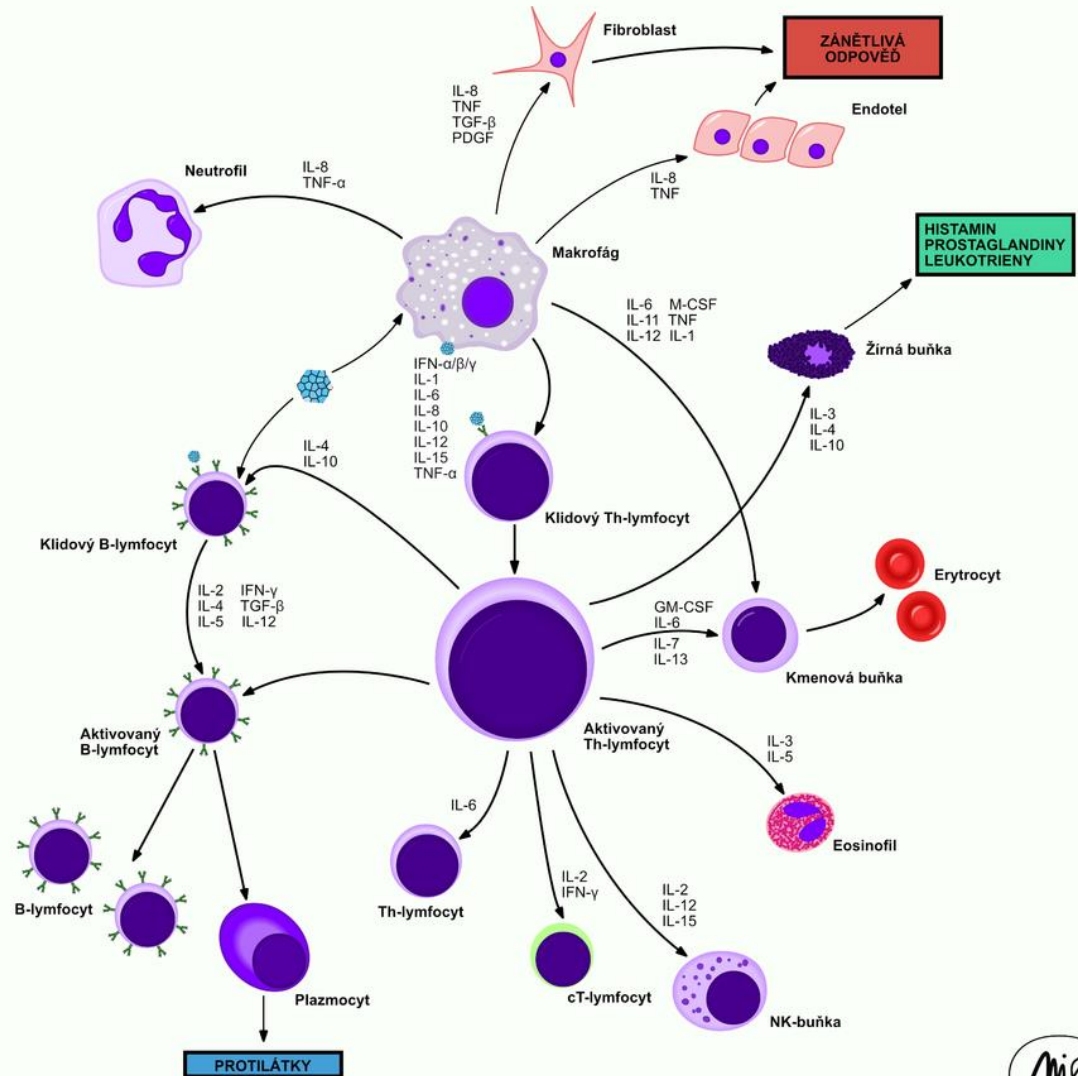
Rozlišujeme dvě skupiny:

buňky **nespecifické imunity** – **granulocyty a makrofágy**

buňky **specifické imunity** – **T- a B-lymfocyty**

Vznikají z **pluripotentní kmenové buňky** kostní dřeně

Cytokinové interakce mezi buňkami imunitního systému





Základní a speciální vyšetřovací metody v hematologii

Po vyšetření krevního obrazu z periferní krve je zásadním úkolem zhodnotit, zda jde o prvotní krevní chorobu, nebo reaktivní změny v krevním obraze při jiném základním onemocnění

K tomu využíváme dalších speciální vyšetření

Vyšetřovací metody v hematologii /₁

1/ Rutinní vyšetření krevního obrazu

- na automatických analyzátorech - průtokovou cytometrií
- mikroskopicky

2/ Vyšetření kostní dřeně – metody odběru vzorku

a/ trepanobiopsie - histologické vyšetření kostní dřeně

b/ aspirační punkce kostní dřeně - cytologické vyšetření

3/ Speciální vyšetření

- cytogenetické vyšetření buněk kostní dřeně
- molekulárně biologické vyšetření buněk kostní dřeně a nádorové tkáně
- imunofenotypizace na průtokovém cytometru (FACS)
- cytochemické vyšetření krevních buněk
- kultivace hematopoetických buněk *in vitro*

4/ Koagulační vyšetření – základní, speciální

Rutinní vyšetření krevního obrazu

- **odběr periferní žilní krve**, tzv. plné krve do zkumavky s **EDTA** (kyselina ethylendiamintetraoctová, vyvázáním vápníku pomocí této kyseliny se krev stává nesrážlivou) ... ***citrát - pseudotrombocytopenie***
- k vyhodnocení krevního obrazu běžně používáno tzv. **strojového krevního obrazu**, t.j. vyhodnocení automatickým analyzátozem

Rutinní vyšetření krevního obrazu (na automatických analyzátořech) /1

- Počty a relativní zastoupení jednotlivých buněčných řad jsou **na automatických analyzátořech** analyzovány za pomocí **průtokové cytometrie**

Automatický analyzátor krvinek Sysmex 2000



Hematologický analyzátor Sysmex XN



ad 1/ Krevní obraz + diff – analyzátor

„strojový“ krevní obraz

Menu QC File Rule Explorer Browser Data Browser 00-18 (Build 4) Logon Name: xn 30/09/2016 (Fri) 15:35

Modify Validate Output Upper Lower Last 20 File Delete Close

Positive (Diff, Morph, Count) Validated Rule Result Query To Host 1609303009 30/09/2016 14:56:44

Main Graph Cumulative Q-Flag Service User Lab. Only Manual (Open) XN-3000-1-R

CBC

Item	Data	Unit
WBC	5.64	10 ⁹ /L
RBC	3.11	10 ¹² /L
HGB	80	g/L
HCT	0.230	- Ratio
MCV	74.0	- fL
MCH	25.7	- pg
MCHC	348	g/L
PLT	241	10 ⁹ /L
RDW-SD	41.9	fL
RDW-CV	15.5	%
PDW	9.1	fL
MPV	9.0	fL
P-LCR	15.9	%
PCT	0.22	%
NRBC#	0.00	10 ⁹ /L
NRBC%	0.0	%

DIFF

Item	Data	Unit
NEUT#	1.56	* 10 ⁹ /L
LYMPH#	3.13	10 ⁹ /L
MONO#	0.65	10 ⁹ /L
EO#	0.28	* 10 ⁹ /L
BASO#	0.02	10 ⁹ /L
NEUT%	27.6	%
LYMPH%	55.5	+ %
MONO%	11.5	%
EO%	5.0	%
BASO%	0.4	%
IG#	0.01	* 10 ⁹ /L
IG%	0.2	%

WBC Flag(s)
WBC Abn Scattergram
Lymphocytosis
Left Shift?

RBC Flag(s)
Anemia

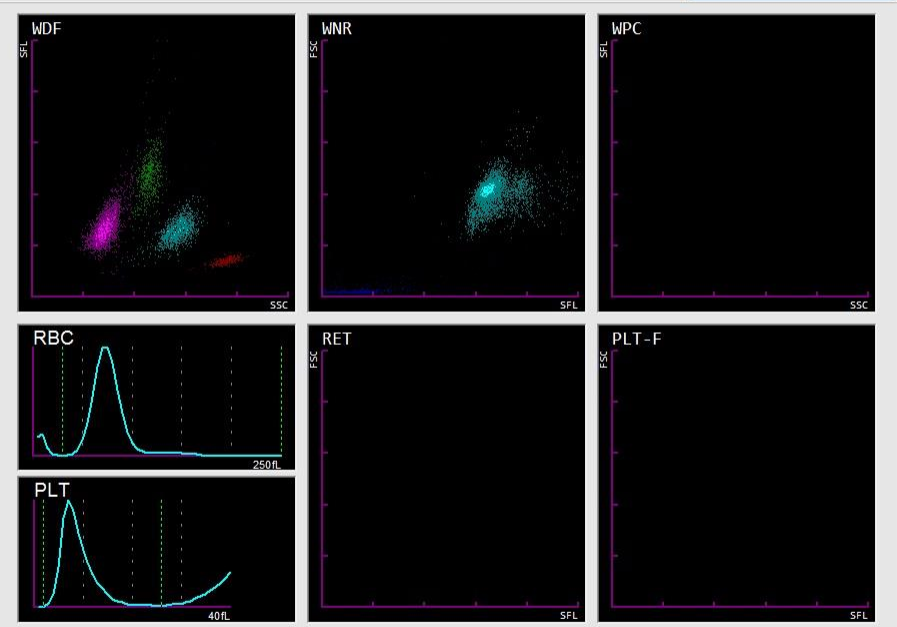
RET

Item	Data	Unit
RET%		%
RET#		10 ¹² /L
IRF		%
LFR		%
MFR		%
HFR		%
RET-He		pg

PLT-F

Item	Data	Unit
IPF		%

PLT Flag(s)



XN-3000-1-L XN-3000-1-R

WB CBC DIFF RET PLT-F WPC WB CBC DIFF

Printer GP/LP 0 HOST HOST1

Průtokový cytometr



Princip průtokové cytometrie

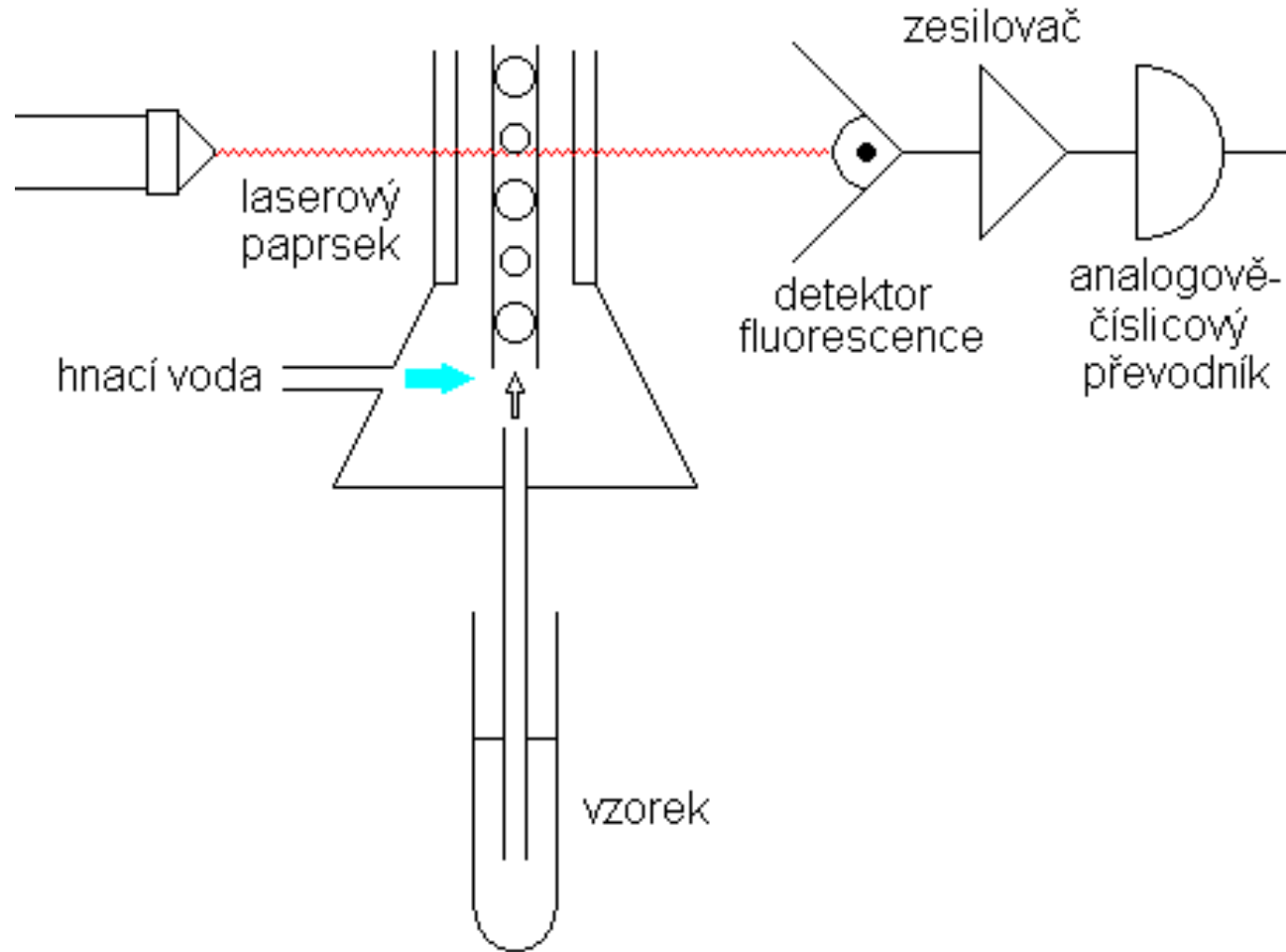
Průtoková cytometrie je technika pro rychlé měření jednotlivých buněk, které procházejí snímacím místem – laserovým paprskem.

Argonový laser umožňuje analýzu mnoha **buněčných parametrů** na základě odklonu laserového paprsku

Úroveň tohoto odklonu odpovídá velikosti a granularitě (denzitě) procházejících buněk, a tak je **od sebe odliší**

Např. lymfocyty jsou malé a denzní buňky, naopak granulocyty jsou buňky větší s vyšší denzitou

Princip průtokové cytometrie



Imunofenotypizace na průtokovém cytometru

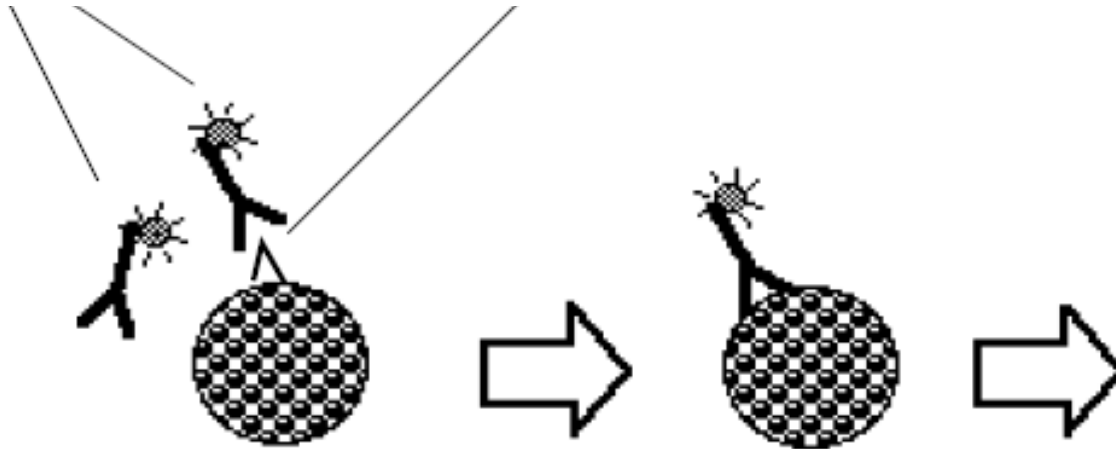
vybrané krevní buňky, které chceme vyšetřit a odlišit od ostatních (leukocyty, lymfocyty, monocyty...) jsou nejprve označeny **fluorescenční látkou**, navázanou na typický **diferenciační znak** na povrchu té buňky. Diferenciační znak (CD) je pro každou z krevních buněk typický, podobně **jako otisk prstu**, a tak lze krevní buňky identifikovat a **odlišit od jiného typu krevní buňky** (např. lymfocyty od granulocytů). Zároveň zjistíme množství jednotlivých buněčných podtypů

Fluorescence

- **Protilátky značené fluorochromy**

Fluorochromem
značené protilátky

Povrchový antigen =
diferenciační znak (CD)



Inkubace

Analýza

Imunofenotypizace na průtokovém cytometru

Při průtoku jednotlivých krevních buněk úzkou kapilárou přístroje je každá z označených buněk fluorescenční látkou zaznamenána v počítači a **součet nám dá přehled o celkovém množství určitých buněk a umožní upřesnit diagnózu** (např. u lymfatické leukemie je převaha (90 %) lymfocytů, u myeloidní leukemie je převaha granulocytů, resp. jejich nezralých forem.

Imunofenotypizace

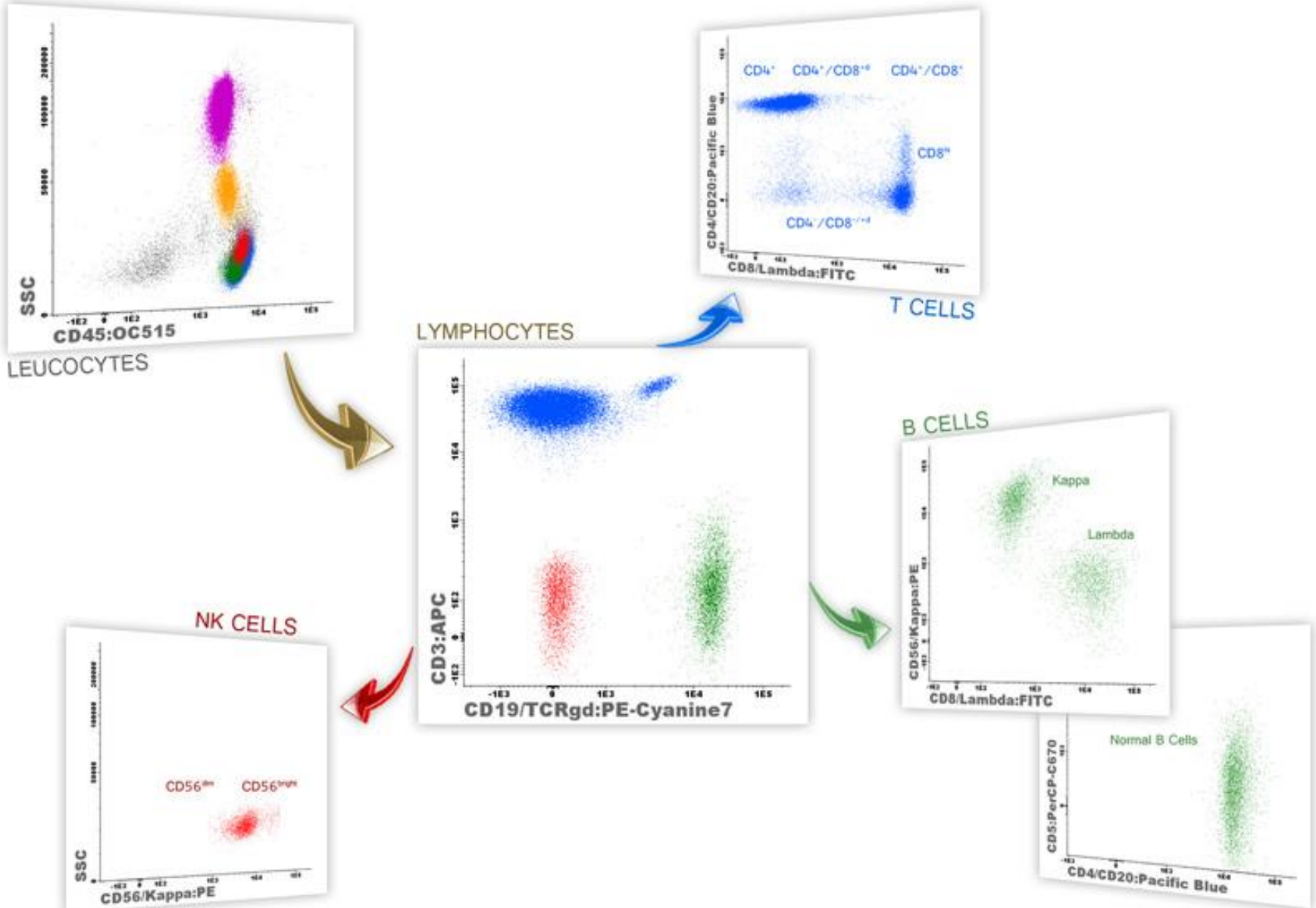
- Identifikace buněk pomocí panelu různých protilátek značených fluorochromy
- CD – „cluster of differentiation“
- Vyšetřované vzorky
 - PK, KD, lymfatické uzliny, likvor, punktáty...
- Diagnostika
- Prognostické faktory
- Sledování po léčbě

Screening lymfoproliferace

- CD20+CD4
- CD45
- CD8+IgL
- CD56+IgK
- CD5
- CD19
- CD3
- CD38

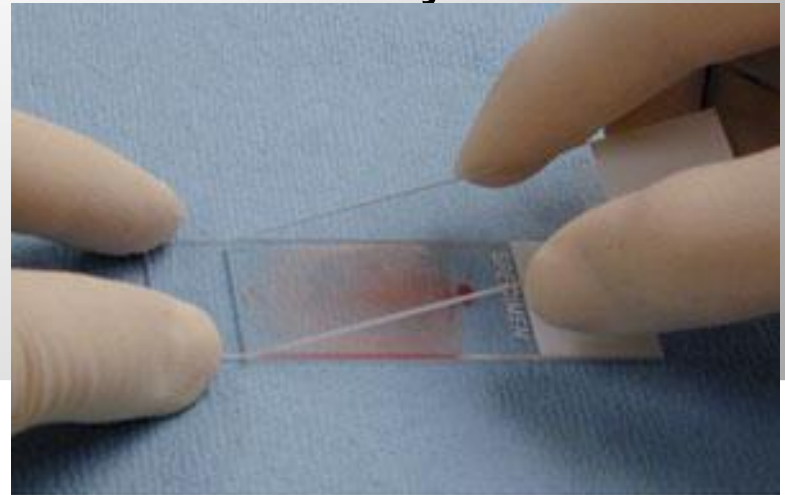
- B-lymfo
 - klonalita
 - vývoj (CD20 vs. CD38)
 - CD5+
- T-lymfo
 - CD4, CD8
 - CD5, CD38
- NK buňky

Screening lymphoproliferace



ad 1/ **Rutinní vyšetření krevního obrazu**
(mikroskopicky)

- V případě **podezření na přítomnost abnormálních buněčných typů** je však nutné vyhodnocení krevního nátěru **pod mikroskopem**, tzv. **ruční diferenciál**.
- **Krevní nátěr** je **mikroskopický preparát** získaný rozetřením kapky krve na sklíčku s následným obarvením



Diferenciální počet leukocytů (KO + diff)

- Diferenciální rozpočet leukocytů = stanovení procentového zastoupení jednotlivých podtypů bílých krvinek
- Krevní analyzátor
- **Mikroskopický diferenciál leukocytů**
- **(= nátěr)**
 - Manuální
 - Automatický (digitální morfologie)

ad 1/ **Mikroskopické vyšetření krevního obrazu**

- k vyloučení tzv. falešné trombocytopenie neboli **pseudotrombocytopenie**, kdy dojde ke shlukování (agregaci) trombocytů v odebrané krvi v EDTA a nález je analyzátozem vyhodnocen jako trombocytopenie.
- pomůže - mikroskopické vyšetření krevního nátěru
 - nový odběr periferní krve s **obsahem citrátu** (v citrátu nedochází ke shlukování trombocytů)
- **morfologické změny** červených krvinek

Kdy se vyšetřuje krevní obraz?

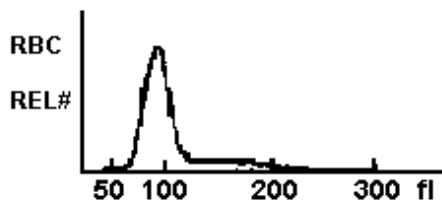
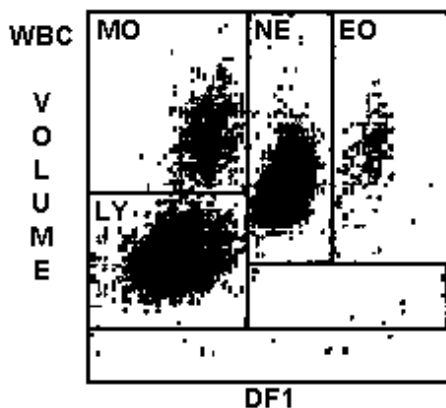
součástí celkového vyšetření, které se provádí:

- **v rámci preventivní prohlídky**
- **v případě onemocnění**
- **ke sledování jeho průběhu a reakce na léčbu**
- **jako součást předoperační přípravy**
- **při příznacích chudokrevnosti** (snížená výkonnost, slabost, bledost, dušnost, zrychlená srdeční frekvence),

Kdy se vyšetřuje krevní obraz?

- rozhodování o nutnosti podání krevní transfúze a sledování jejího efektu
- při podezření na infekci
- při krvácivých stavech
- ke zjištění rizika trombotických stavů (tvorba krevních sraženin v cévách)
- při podezření na nádorová onemocnění, sledování krevních nemocí a jejich reakci na léčbu
- při užívání některých léků

Jak hodnotit krevní obraz ? - čtyři parametry: leukocyty, hemoglobin, trombocyty, diferenciál



WBC	6.8	
	%	#
NE	52.6	3.6
LY	36.7	2.5
MO	7.8	0.5
EO	2.5	0.2
BA	0.4	0.0
RBC	5.29	
HGB	16.2	
HCT	47.0	
MCV	88.8	
MCH	30.7	
MCHC	34.5	
RDW	12.5	
PLT	179	
MPV	8.4	

Jeden parametr abnormalní:

-většinou benigní onemocnění
(agranulocytóza, leukemoidní
reakce, různé anémie, ITP)

> 1 parametr abnormální:

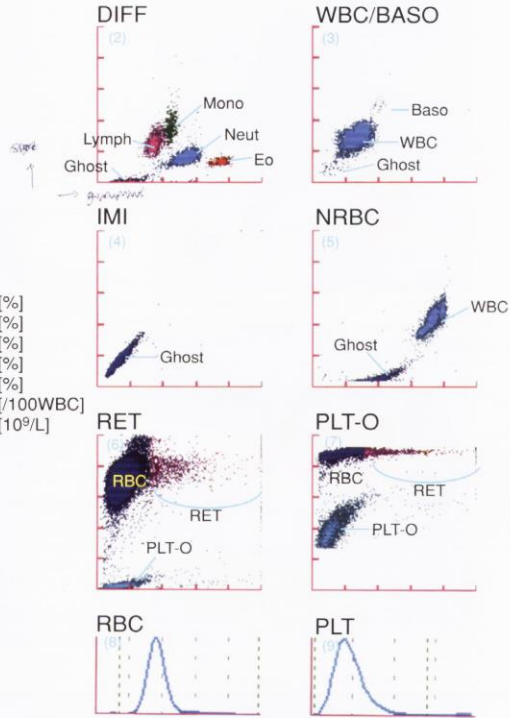
Vysoká pravděpodobnost
závažného onemocnění

**!! Každý pacient s infekcí, která nereaguje na antibiotika
první linie, by měl mít vyšetřen minimálně krevní obraz
a sedimentaci !!**

Stavy, které mohou falešně ovlivnit počet krevních elementů při automatickém zpracování krevního obrazu:

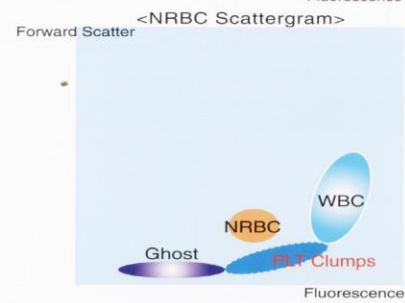
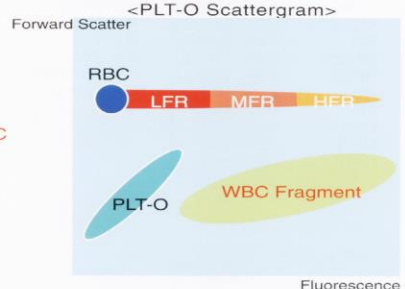
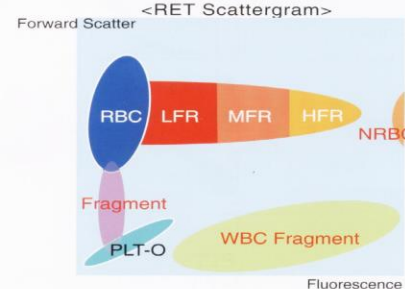
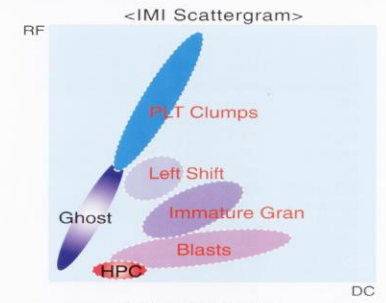
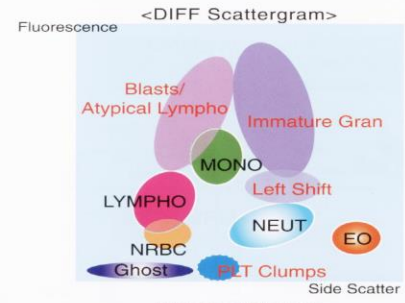
Buňky	Patologický stav, nemoc	<u>Falešné ovlivnění výsledku počtu krvinek</u>	Příčina, mechanismus
Erytrocyty	mikrocytóza nebo schistocyty	nižší počet erytrocytů	Mikrocyty a schistocyty nedosahují objemu dolní hranice detekce ery
	polycytemie	nižší počet erytrocytů	sčítání agregovaných erytrocytů
	Howell-Jolly tělíška	vyšší počet trombocytů	H-J tělíška jsou podobné velikosti jako trombocyty
Leukocyty	leukocytóza ; nad $50 \times 10^9/l$	nižší počet leukocytů; vyšší MCV erytrocytů	sčítání agregovaných leukocytů; některé leuko „přečteny“ jako ery
	ALL, CLL * virové infekce	nižší počet leukocytů	zvýšená fragilita leukocytů, včetně jejich nezralých forem
	chemoterapie akutní leukémie	vyšší počet trombocytů	fragmenty leukemických bb. jsou sčítány jako trombocyty
Trombo	destičkové aglutininy	nižší počet trombo, někdy i falešně vyšší počet leuko	agregáty destiček , mohou být sčítány jako leukocyty
Plasma	chladové aglutininy	nižší počet erytrocytů s makrocytózou	dublety, triplety erytrocytů sčítány jako makrocyty
	kryoglobuliny, kryofibrinogen	variace počtu destiček	bílkovinné precipitáty mohou být sčítány jako trombocyty

(1)	WBC	6.90	[10 ⁹ /L]	
	RBC	4.64	[10 ¹² /L]	
	HGB	154	[g/L]	
	HCT	44.0	[%]	
	MCV	94.8	[fL]	
	MCH	33.1	[pg]	
	MCHC	350	[g/L]	
	PLT	353	[10 ⁹ /L]	
	RDW-SD	46.0	[fL]	
	RDW-CV	13.4	[%]	
	PDW	11.6	[fL]	
	MPV	10.6	[fL]	
	P-LCR	30.0	[%]	
	PCT	0.37	[%]	
	NEUT	4.19	[10 ⁹ /L]	60.7 [%]
	LYMPH	1.54	[10 ⁹ /L]	22.3 [%]
	MONO	0.51	[10 ⁹ /L]	7.4 [%]
	EO	0.60	[10 ⁹ /L]	8.7 [%]
	BASO	0.06	[10 ⁹ /L]	0.9 [%]
	NRBC	0.00	[10 ⁹ /L]	0.0 [/100WBC]
	RET	1.70	[%]	78.9 [10 ⁹ /L]
	IRF	6.7	[%]	
	LFR	93.3	[%]	
	MFR	6.1	[%]	
	HFR	0.6	[%]	



(10) WBC IP Message(s) (11) RBC/RET IP Message(s) (12) PLT IP Message(s)

(1) Analysis data (2) DIFF scattergram (3) WBC/BASO scattergram (4) IMI scattergram (5) NRBC scattergram (6) RET scattergram (7) PLT-O scattergram (8) RBC histogram (9) PLT histogram (10) WBC system IP message (11) RBC/RET system IP message (12) PLT system IP message



Vyšetřovací metody v hematologii /2

1) Krevní obraz (KO)

- základní vyšetření v hematologii
- určuje počet krevních bb. a jejich parametrů
 - na analyzátorech krevních elementů
 - v indikovaných případech mikroskopicky

Krevní obraz - počet:

- erytrocytů (+ Hb , Htk...)**
- leukocytů**
- destiček**

Vyšetřovací metody v hematologii / 3

Červený krevní obraz (čko)

Počet erytrocytů (ERY) - v jednom litru krve
fyziologické hodnoty **muži: 4,3 - 5,7. 10¹²/l**
 ženy: 3,8 - 4,9. 10¹²/l



fyziologické zvýšení počtu

novorozenci,

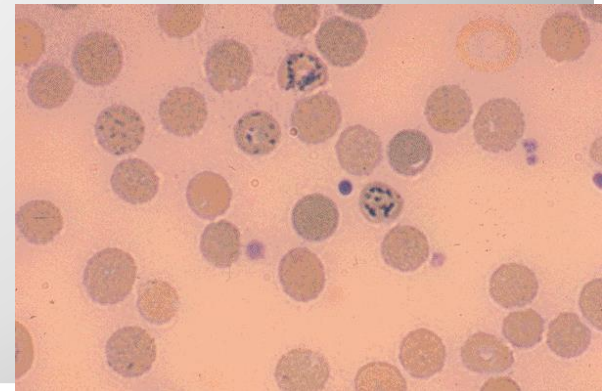
lidé žijící delší dobu ve vyšších nadmořských výškách

patologické zvýšení (polyglobulie)

srdeční vady, plicní onemocnění, polycytemia vera

retikulocyty

- nejmladší ery v periferní krvi
- vypuzení jádra.. zbytky organel - ribozomy, ER
- relativní zastoupení: 0, 005 - 0, 015



Vyšetřovací metody v hematologii / 4

Červený krevní obraz (čko)

Hemoglobin (Hb)

- červené krevní barvivo, - vyplňuje zralý erytrocyt
- umožňuje mu plnit funkci přenosu kyslíku.

Muži: 136 – 176 g/l

Ženy: 120 - 168 g /l

Hematokrit (Htk) - poměr mezi objemem erytrocytů a plazmy:

- muži 40 : 60 %; ženy 35 : 65 %

Příklad: Htk 0,40 znamená, že v 1 litru krve je 400 ml erytrocytů

Muži: 0,39- 0,49 l/l

Ženy: 0,35- 0,46 l/l

Snížení Hb, Htk – anémie

Zvýšení Hb, Htk – polyglobulie, zahuštění krve - dehydratace

ANÉMIE - definice, rozdělení

DEFINICE: Snížení množství Hb (zpravidla i Htk a počtu ery) v 1 litru krve pod dolní hodnotu zdravých jedinců.

muži < Hb 135 g/ l (< 0,40 Htk)

ženy < Hb 115 g/ l (< 0,36 Htk)

ROZDĚLENÍ: klasifikace - patofyziologická
- morfologická

ANÉMIE

- A. z nedostatečné krvetvorby (hypoproliferativní)
- B. ze zvýšených ztrát

Vyšetřovací metody v hematologii / 5

Odvozené hodnoty čko

střední objem červené krvinky - 80 - 95 fl

(MCV - Mean Cell Volume)

informace o velikosti krvinky (mikrocyt, normocyt, makrocyt)

průměrná hmotnost Hb v ery 27- 32 pg

(MCH - Mean Corpuscular Hemoglobin)

informace, zda je krvinka normochromní či hypochromní = zda má dostatek červeného krevního barviva, hemoglobinu

barevná koncentrace Hb v ery mase 0,32 - 0,37

(MCHC - Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)

informace, zda je erymasa normochromní či hypochromní

Vyšetřovací metody v hematologii / 6

Červený krevní obraz (čko)

MCV – střední objem červené krvinky (sočk)

anémie	- mikrocytová -	MCV < 80 fl
	- normocytová -	MCV = 80 - 95 fl
	- makrocytová -	MCV > 95 fl

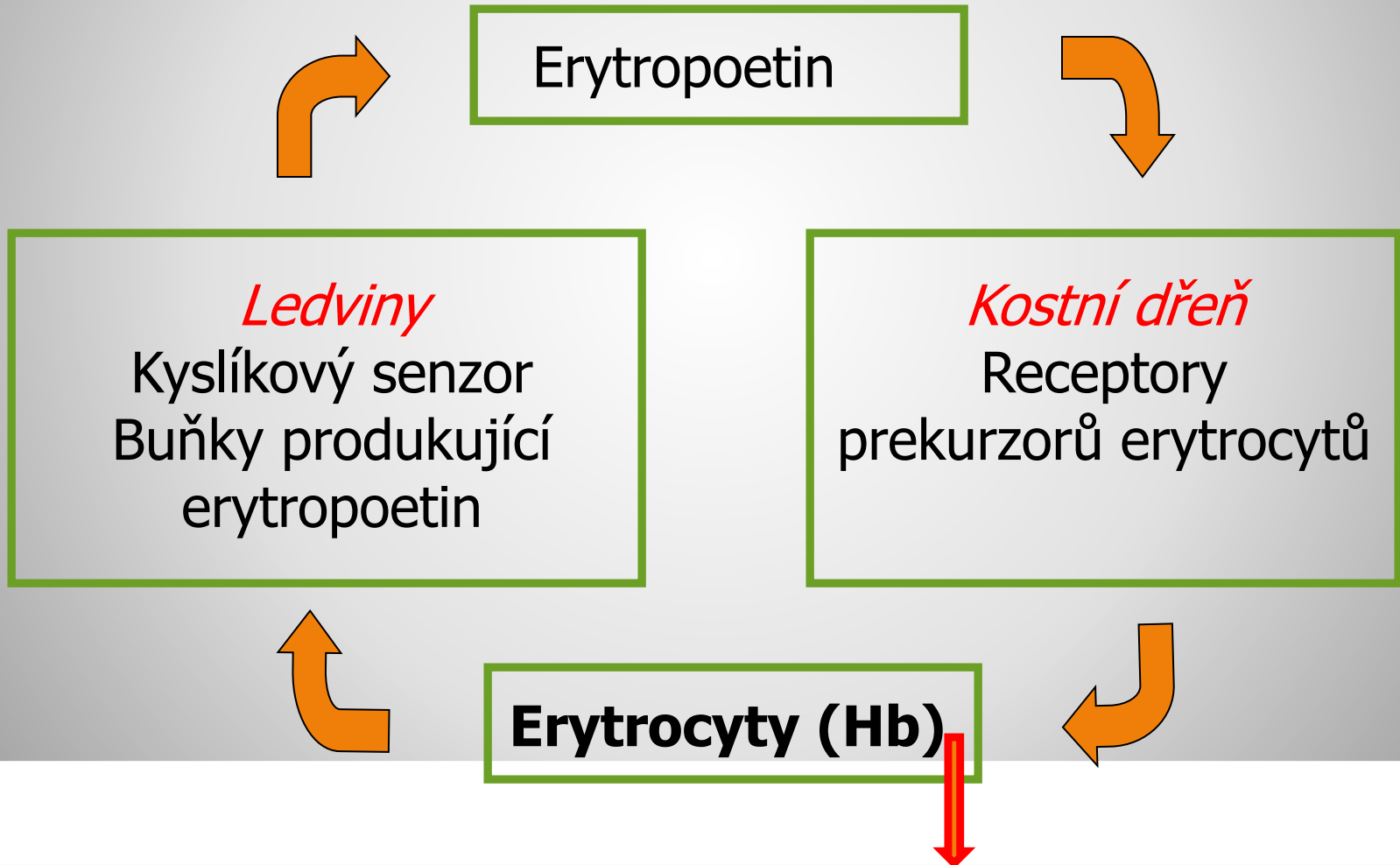
MCHC - střední koncentrace Hb v erytrocytu (bk)

anémie	- normochromní	0,32-0,37
	- hypochromní	< 0,32

RDW – **šíře rozptylu ery** 11,5 - 14,5 %

(Red Cell Distribution Width - vyjadřuje variabilitu průměru (velikosti) červených krvinek = **anizocytózu**)

Regulace tvorby červených krvinek - erythropoézy



Co je to erythropetin? „EPO“

Vyšetřujeme hladinu endogenního erythropoetinu

- erythropoetin(EPO) je hormon tvořený především v ledvinách
- stimuluje tvorbu a vyzrávání erytrocytů v kostní dřeni
- tvorba erythropoetinu stoupá při některých typech anémií
- snížená produkce je u onemocnění ledvin
- anémie vyvolané nedostatkem EPO provází zánětlivá a nádorová onemocnění
- „vyrobený“ (= rekombinantní) EPO v přísných indikacích má výborný účinek na odstranění anémie
- Vyrobený EPO se dá zneužít...

**MORFOLOGICKÉ – mikroskopické
HODNOCENÍ KREVNÍHO OBRAZU**

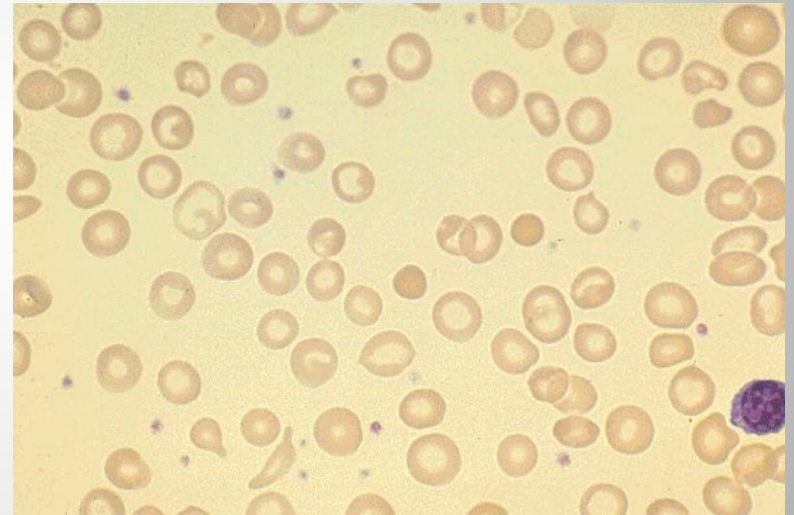
Vyšetřovací metody v hematologii / 7

Morfologické anomálie červených krvinek

hodnotí se na základě krevních nátěrů - viz obrázek



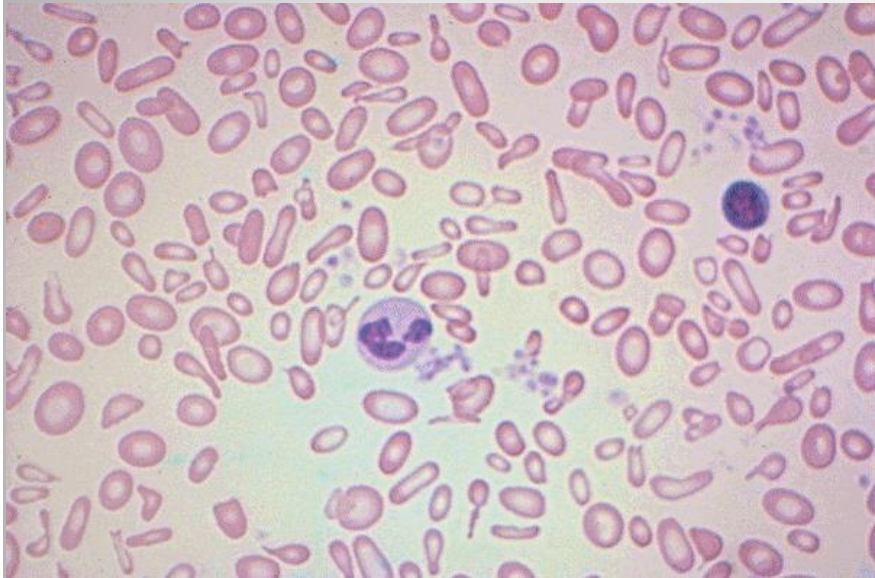
normální krevní obraz



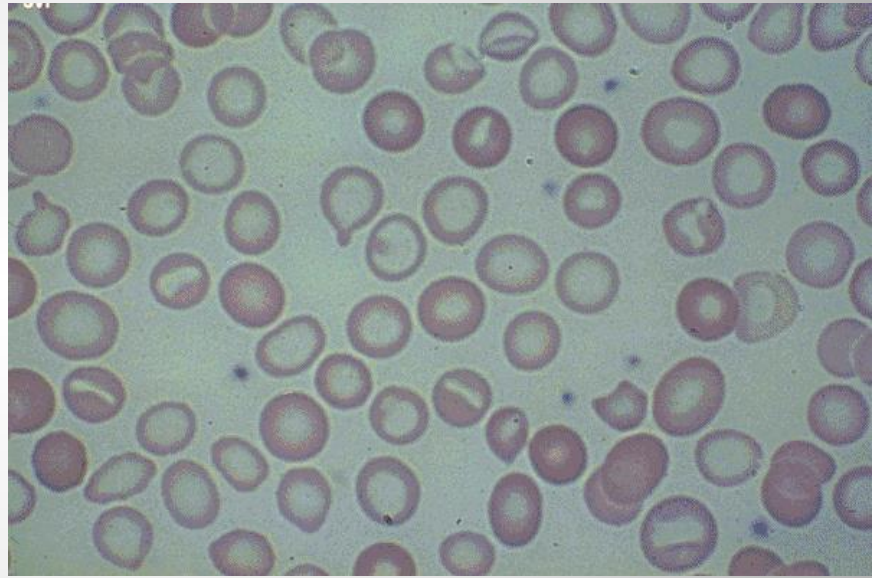
anémie z nedostatku železa (sideropenická)

Vyšetřovací metody v hematologii / 6 ERY

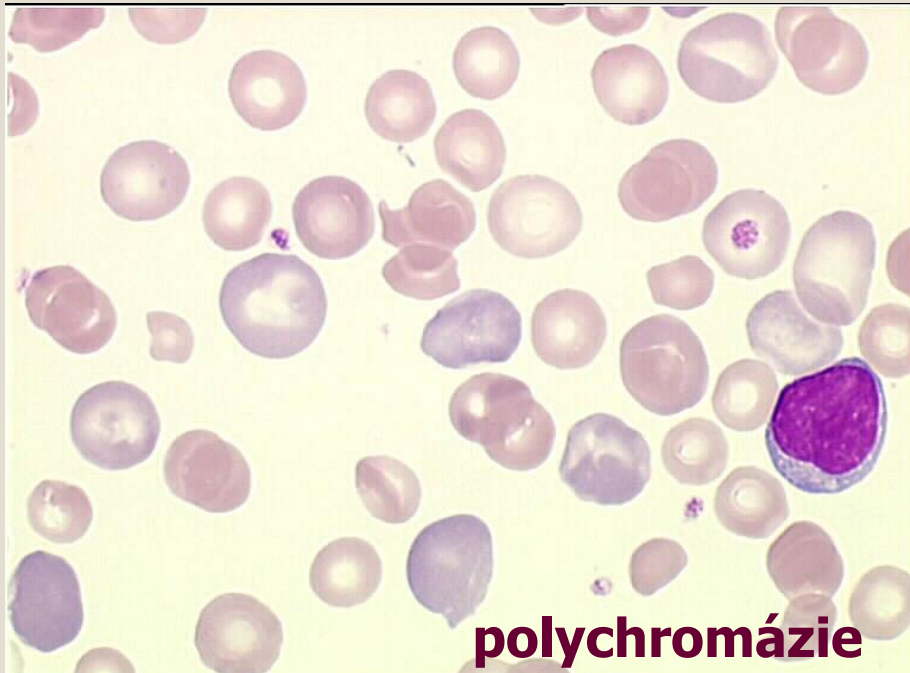
Morfologické anomálie červených krvinek



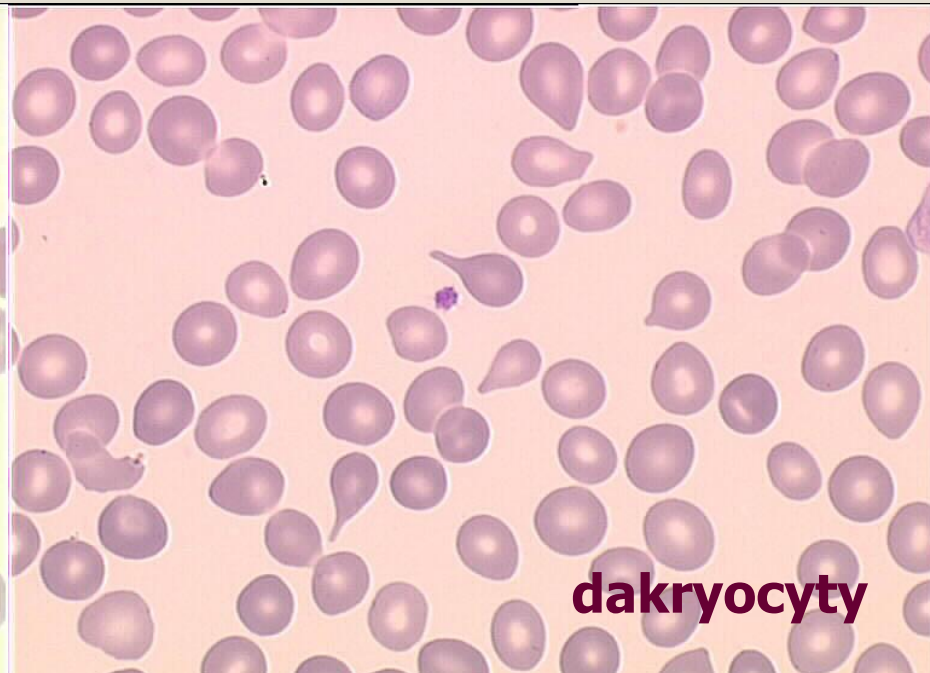
**mikrocytóza, anizocytóza,
poikolocytoza, hypochromie**



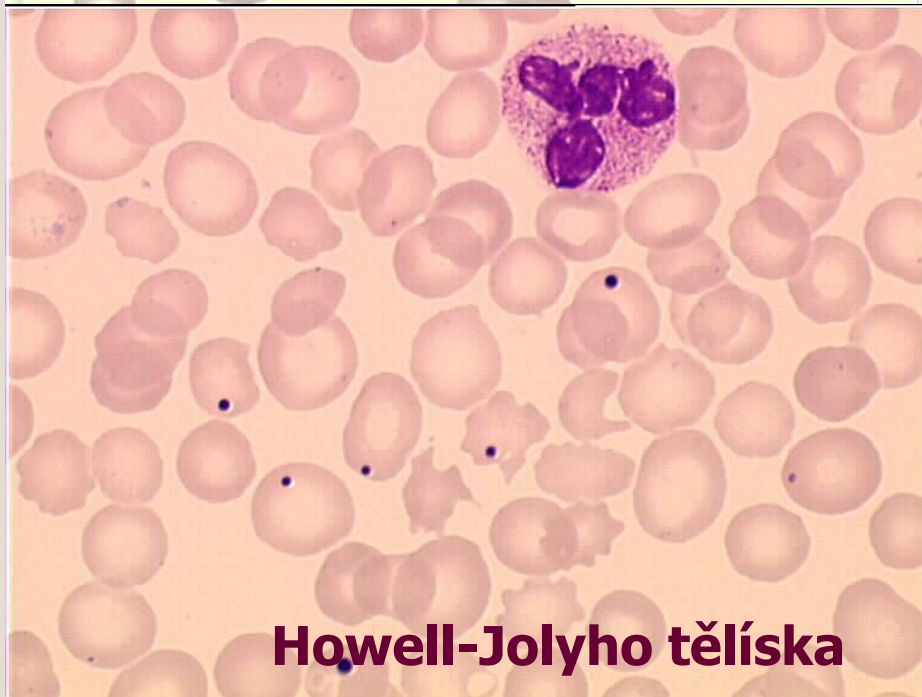
**sideropenická anemie
po transfuzi**



polychromázie



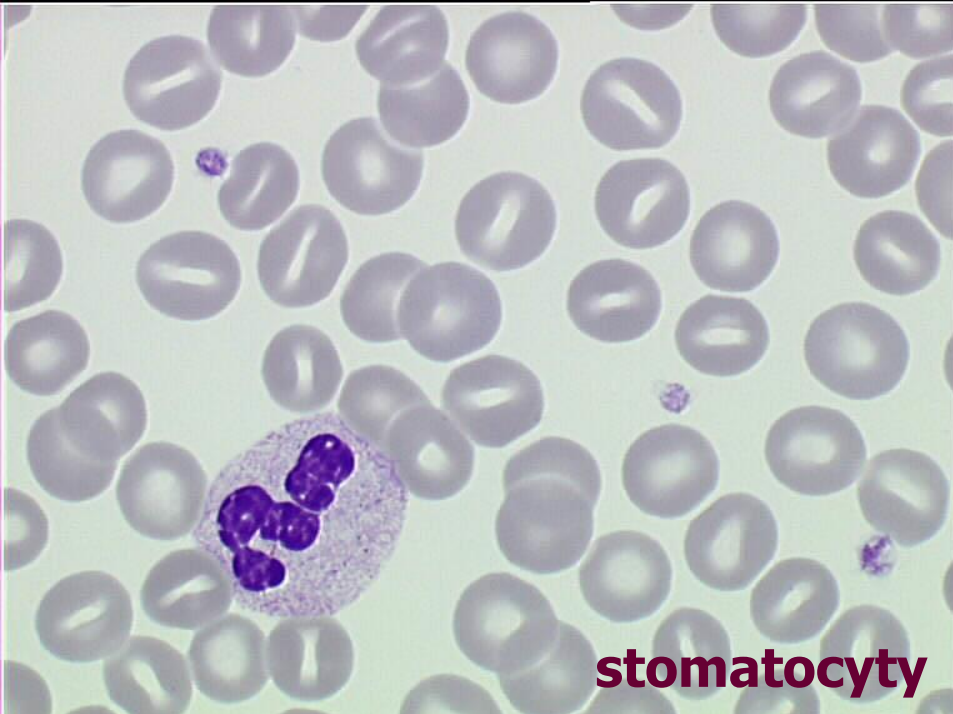
dakryocyty



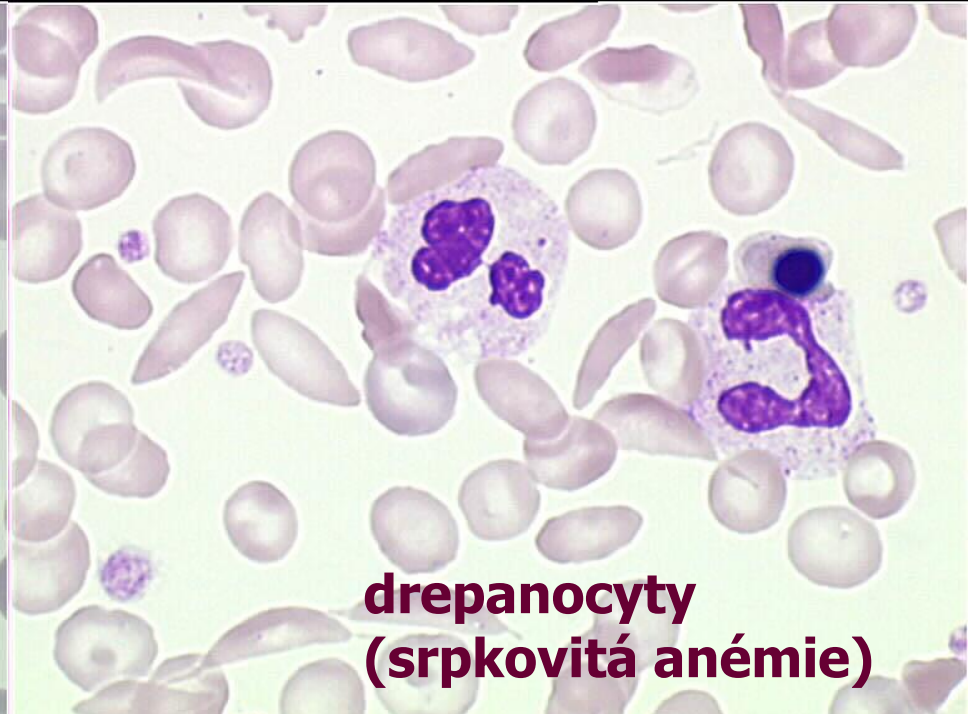
Howell-Jolyho tělíška



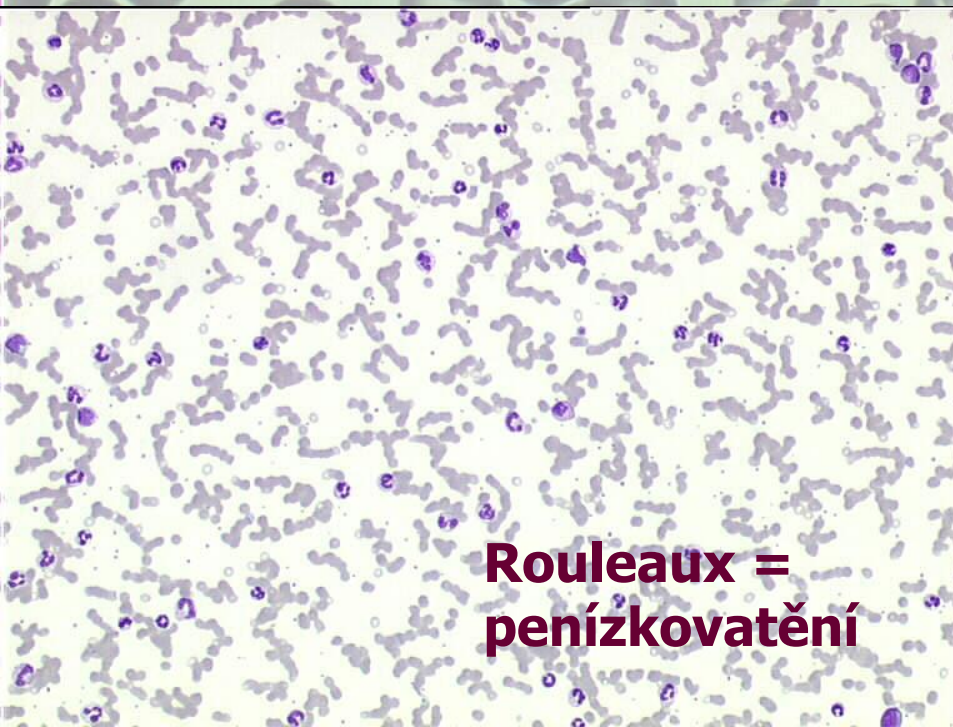
**bazofilní
tečkování**



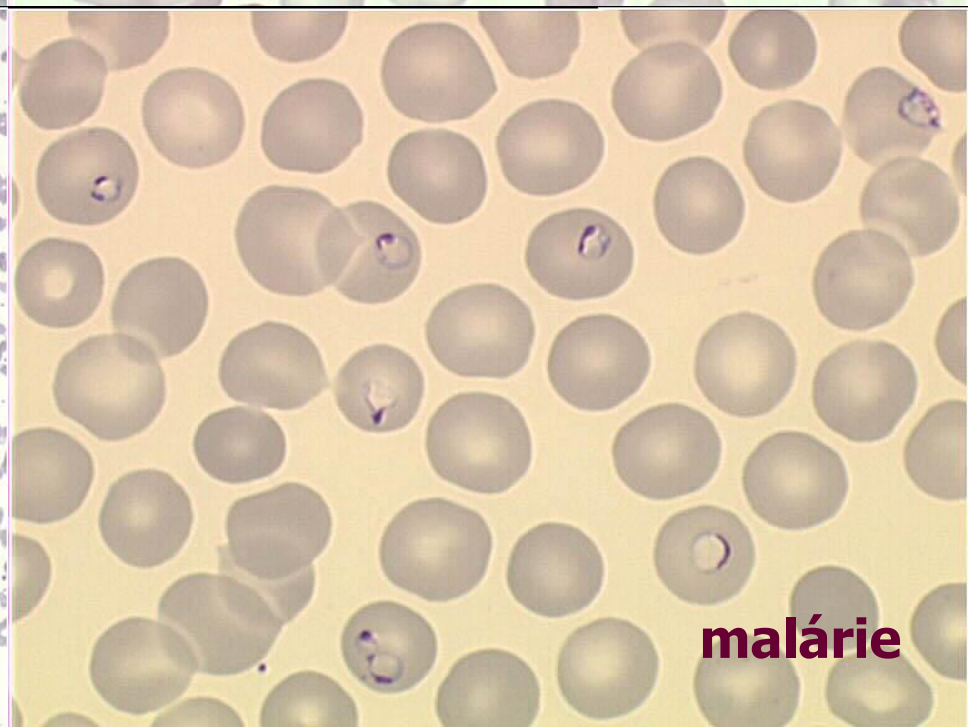
stomatocyty



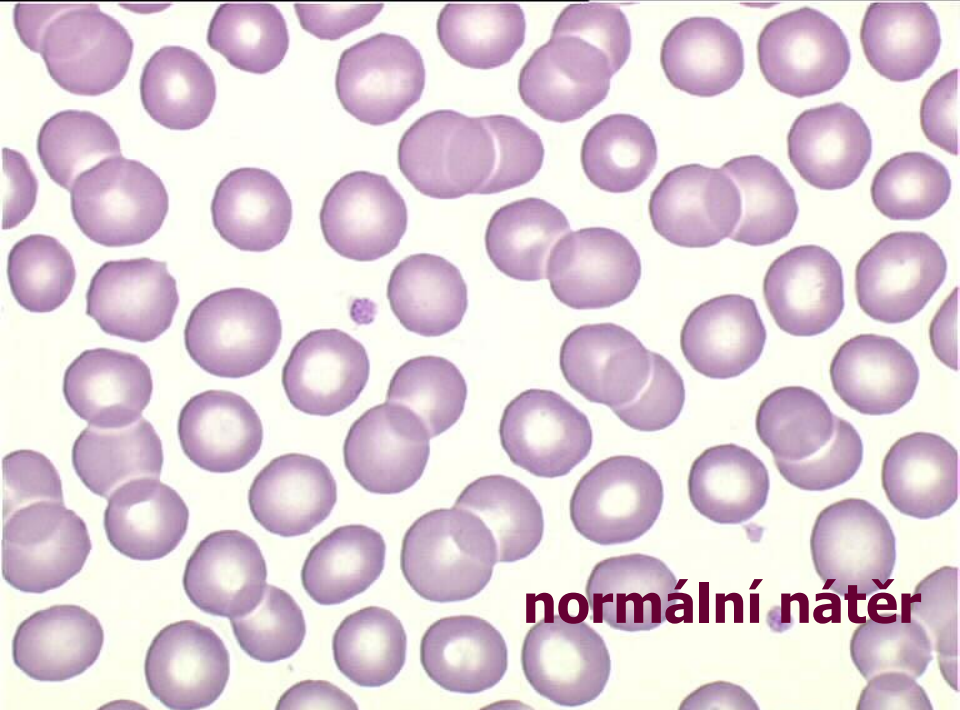
**drepanocyty
(srpkovitá anémie)**



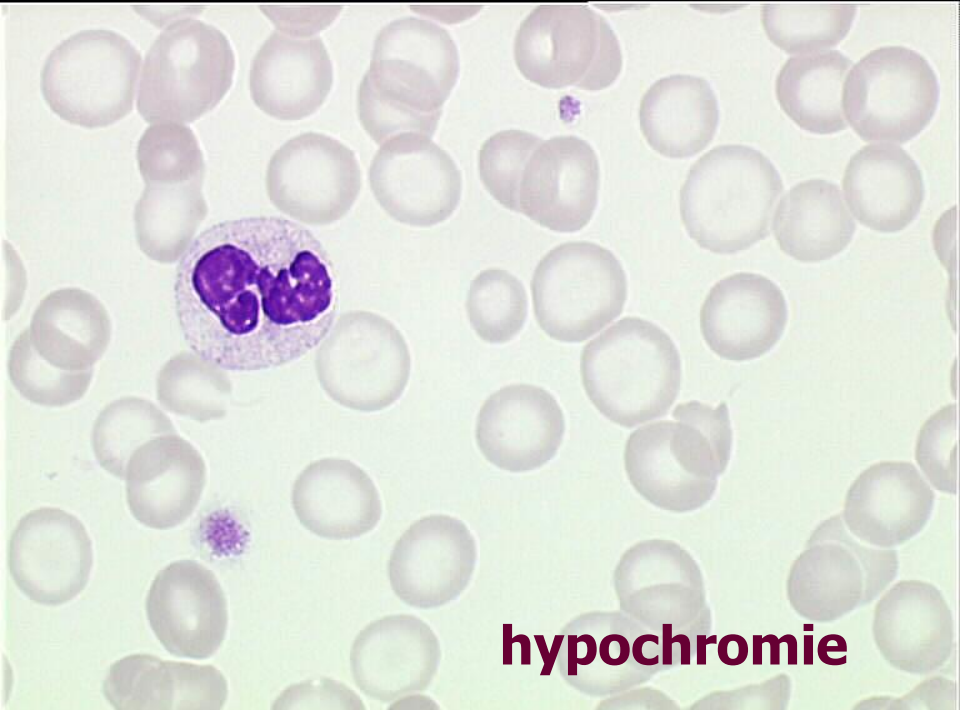
**Rouleaux =
penízkovatění**



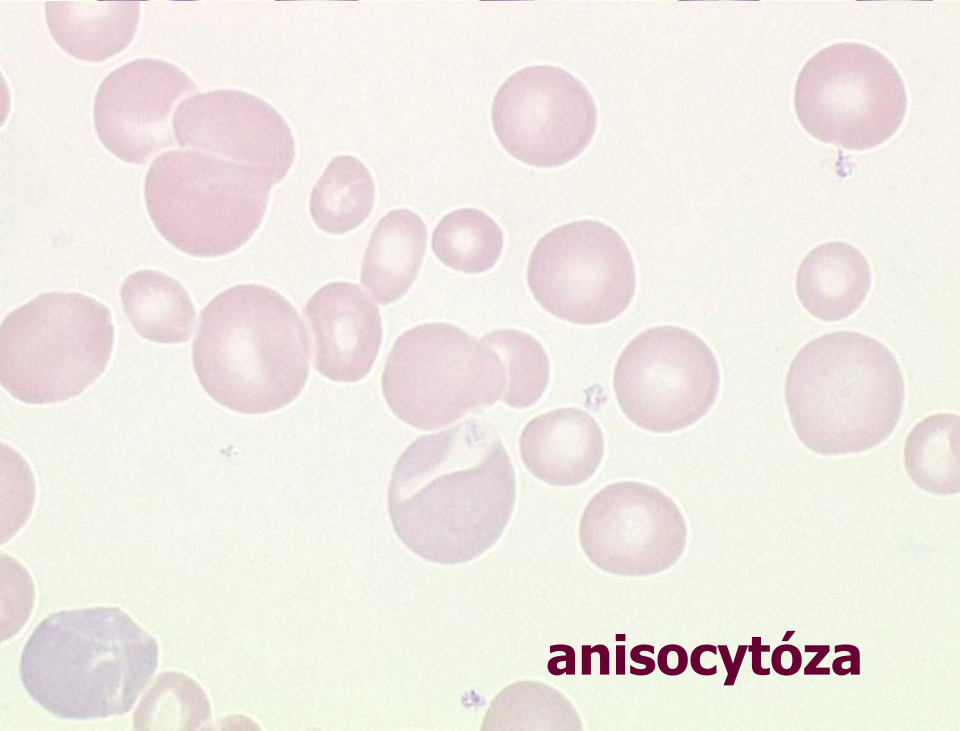
malárie



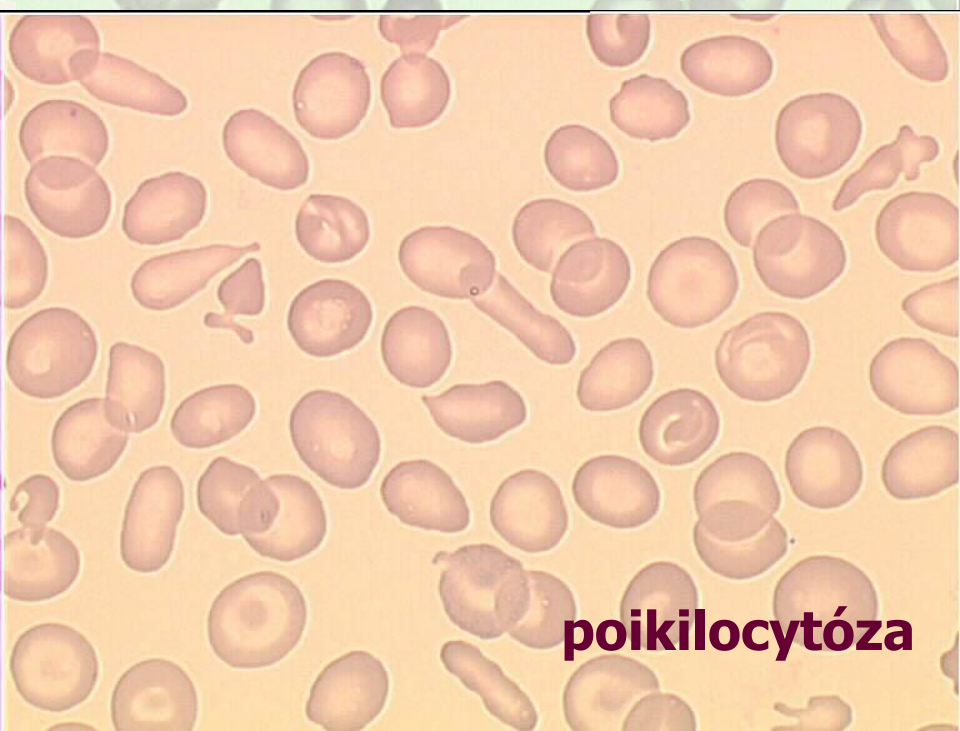
normální nátěr



hypochromie



anisocytóza

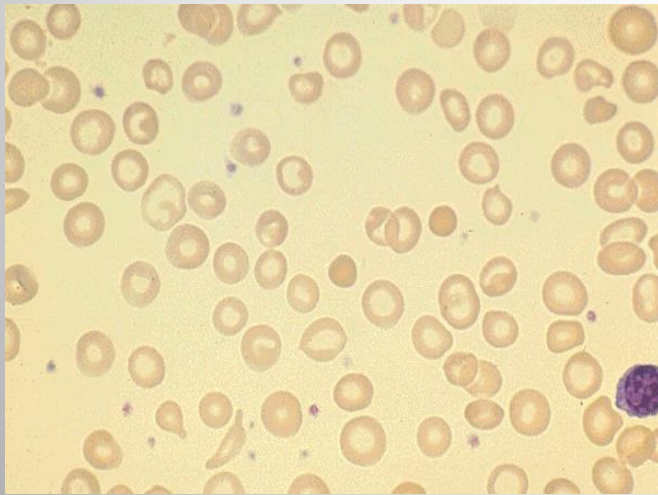


poikilocytóza

Vyšetřovací metody v hematologii

- příklady použití

sideropenická anémie



normální čko



Příklad: Mikrocytární hypochromní sideropenická anémie (z nedostatku železa)

snížené hodnoty Hb, HtK a většinou i erytrocytů

- **SOČK snížený** - mikrocyty
- BK snížená - hypochromie
- BČK snížená - hypochromie

snížená hodnota sérového železa a feritinu

příčiny vzniku:

- dlouhodobé chronické krvácení (**gynekologické**, GIT...)
- nedostatečný přívod železa do organismu (**stravovací návyky**, nedostatečné vstřebávání z GIT, poresekční stavy)
- zvýšené nároky na železo (**těhotenství**, laktace, období růstu, dárci krve)
- * **SOČK= střední objem červené krvinky**

Kinetika železa v organismu

GIT	SLIZNICE	FUNKČNĚ VÁZANÉ	ZÁSoby
		Tkáně:	
Příjem potrava 10-15/mg/den		myoglobin, enzymy 500 mg	
⇒	Absorpce 1-1,5 mg/den	↑ Krev :	
	⇒	transferin ⇒	⇔
Ztráty Fe 1 mg/den		5 mg	↓
↓		↓	Feritin
bb. střevního epitelu, krev		20 mg ⇒	1000 mg
(+ malé ztráty kůží a močí)		↑ ↗	↓
		Erytrocyty	20 mg
		2500 mg ↘	⇔
			⇔
Celkem cca:		3000 mg	1000 mg

Příjem a resorpce železa

Denní příjem : 10 -15 mg

Denní potřeba: muži 1,3 mg/ den

ženy 1,8 mg/den (**menzes = ztráta 0,8 mg/den**)

Obrana organismu proti sideropenii - 2x zvýší resorpci z GIT

Resorpce z GIT = 10%

HCl v žaludku- redukce Fe^{2+} (není nezbytné)

maximum resorpce v duodenu, distálněji klesá

V bb. střevního epitelu :

- aktivní transport do plazmy - vazba na intracelulární protein
- nebo inkorporace Fe do feritinu ve střevních buňkách
- transferin plazmy

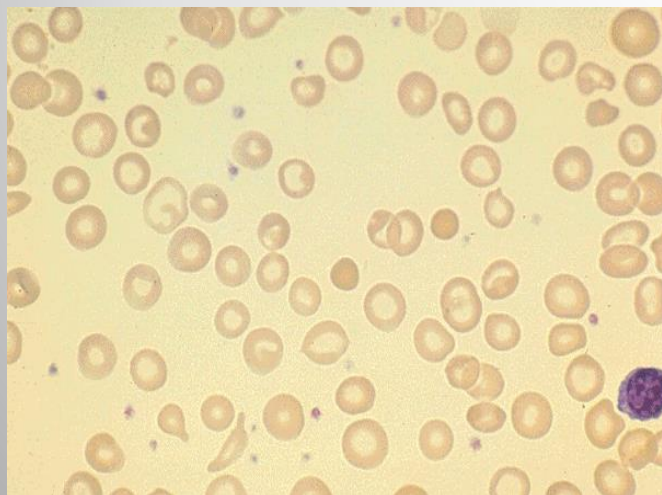
Erytropoéza – doplňková vyšetření - železo

	<u>Muži</u>	<u>Ženy</u>	<u>Oba</u>
Fe [mmol/l]	10,6 - 28,3	6,7 - 26,0	
transferin g/l			2,0 - 3,7
TIBC [mmol/l]			44,8 - 71,6
cirkulující transferin. receptory (cTfR)			1,0-3,7 mg/l
Saturace transferinu			20 - 60 %
Feritin v séru [mg/l]	30-300	12-125	
Sideroblasty- dřeň			20 - 65 %
Resorpce ⁵⁹ Fe z GIT			> 25 %
Volný protoporf. v ery (FEP)			350-500mg/l
kys. listová			2 - 6 mg/l
Vitamin B ₁₂			200-900 ng /l
Sérový erythropoetin (Epo)			4 -26 mU /ml

Sideropenická anémie

kazuistika

sideropenická anémie



normální čko



Sideropenická anémie

žena 1964

opakovaně dyspeptické obtíže, pyróza, plynatost, jí málo masa

Gastroskopie 26.5.04

Zá: Bulbitida, mírná antrální gastritida. omeprazol

H. pylori - negativní

stolice na OK - negativní

8/2008: Léčena pro revmatoidní artritidu, anemická, revmatolog chce kontrolu KO

= hematol vyšetření =

Léčba: Sorbifer durules 2x1, zapít džusem

Sideropenická anémie

Periferní krevní obraz:

Leu: 6,73, Ery: 4,27, **HB: 99**, HTC: 0,311, **MCV: 72,8**, **MCH: 23,1**,
MCHC: 318, **RDW: 17,8**, Plt: 421, MPV: 7,3, PCT: 0,306

Dif.stroj. relat: Ne: 61,3, Ly: 21,4, Mo: 14,8, Eo: 1,6, Ba: 0,9

Dif.stroj. absol: Ne: 4,1, Ly: 1,4, Mo: 1,0, Eo: 0,1, Ba: 0,1

Ostatní hematologie: Rtc promile: 9, Rtc abs.: 0,036

Fe: 4,2 transferin **3,6** Vaz.kap.Fe (**TIBC**):69,0, **Saturace Fe: 6**,
Ferritin: 2,6

Vitamín B12: 389, Kys.listová: 12,

Závěr: **mikrocytární, hypochromní, sideropenická anémie**

Sideropenická anémie - vývoj nálezů

	08/08	11/08	01/09	05/09	
Leu	6,73	7,3	5,1	4,6	10 ⁹ /l
Ery	4,27	4,60	4,4	4,3	10 ¹² /l
Hb	99	123	125	124	g/l (116-163)
Htk	0,311	0,370	0,377	0,375	0,33-0,47
MCV	72,8	80,4	84,8	88,0	fl (82,3-100,6)
MCH	23,1	26,8	28,2	29,2	pg (28,2-35,6)
MCHC	318	333	332	332	g/l (330-363)
RDW	17,8	20,5	17,4	16,0	% (11,9-16,3)
TR	421	310	293	324	10 ⁹ /l

Sideropenická anémie - vývoj nálezů

	08/08	11/08	01/09	05/09	
Fe	4,2	6,3	5,2	16,5	umol/l (6,6)
TIBC	69,0	52,5	50,6	50,7	umol/l (44,8)
Fe satur	6	12	0,1	0,33	%
transfer	3,61	2,8	2,55	2,53	umol/l (2-3,6)
trf satur	5,1	9,9	9,0	28,7	% (19- 49) (výpočet)
R- Trf		5,4			mg/ml (1,9-4,4)
feritin	2,6	21,8	20,6	24,7	ug/l (10-291)

Makrocytová anémie z nedostatku vit. B12

snížené hodnoty Hb, Htk a erytrocytů

- **SOČK zvýšený - makrocyty**
- BK normální
- BČK normální nebo zvýšená

snížená sérová hladina vitamínu B12

megaloblastová přestavba kostní dřeně
atrofická gastritida, achlorhydrie

léčba:

- aplikace vitamínu B12 i.m. → retikulocytová krize, udržovací léčba do konce života
- každý rok kontrolní gastrokopie (atrofická gastritida je prekanceróza)

Makrocytová anémie z nedostatku vit. B12

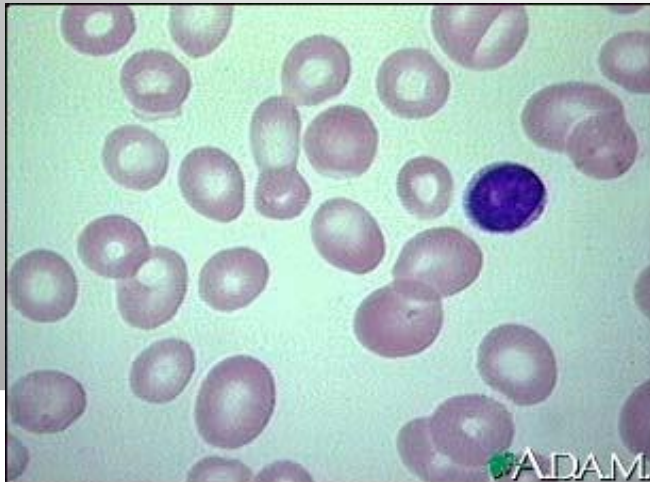
Hemoglobin (g/l)	81,0
Erytrocyty ($10^{12}/l$)	1,7
Hematokrit	0,229
Barevná koncentrace	0,352
Objem erytrocytu (fl)	133,6 (N: do 96 fl)
Retikulocyty	0,004
Trombocyty ($10^9/l$)	167,0

Leukocyty ($10^9/l$)	4,6
Neutrofilní segment	0,57
Neutrofilní tyč	0,02
Eosinofilní segment	0,03
Basofilní segment	
Monocyt	0,06
Lymfocyt	0,32

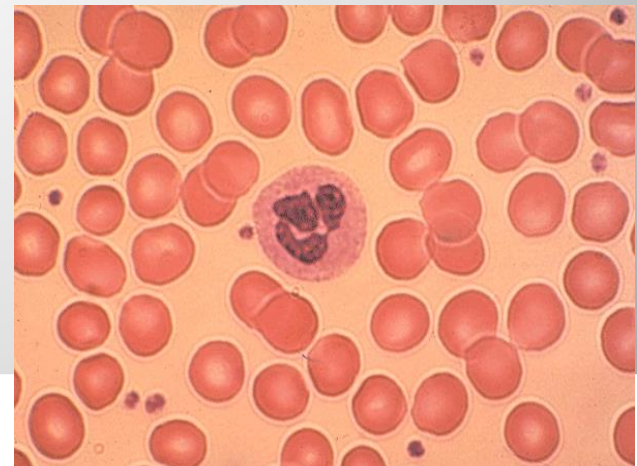
pozn.: č.o. značná anisomakro-normo-ovalocytóza
b.o. hypersegmentace jader neutrofilních segmentů

Makrocytová anémie perniciózní (zhoubná) - ? při avitaminóze B 12 kazuistika

makrocytová anémie



normální čko



Patologické stavy spojené s makrocytózou

Deficit kyseliny listové

Deficit vitamínu B 12

Nemoci jater

Chronický alkoholismus

Sideroblastická anémie

Selhání kostní dřeně

Hypothyreóza

Nádory

Hemolytická anémie

Léky (azathioprin, cyklofosfamid, zidovudin, hydroxyurea)

Myelodysplázie (5q syndrom)

- **muž 67 let - přijat 6.1.2009 pro těžkou únavu, slabost, tachykardii s palpitacemi**
- **při přijetí velmi bledý + ikterický**
- **nechutenství, za 2 měsíce zhubnul 10 kg**
- **bez nočních potů, pruritu, febrilií**
- **obstipace (Guttalax), stolice světle hnědá, kašovitá, bez patol. příměsí (není melena ani krev)**
- **laboratorně: pancytopenie, výrazně makrocytová, hluboká anémie, vysoké LD**

Krevní obraz:

Leu: 1,9, **Ery: 1,21**, **HB: 56**, **HTC: 0,161**, **MCV: 132,8**; MCH: 45,5; MCHC: 343; **RDW: 19,2**; **Plt: 43**
rtc: 35 (5-25)

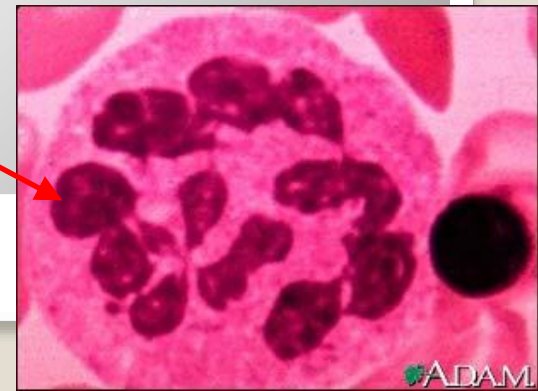
Dif.stroj. relativní: Ne:64,0; Ly:19,4, Mo:5,2, Eo:0,3, Ba: 0,1

Dif.stroj. absolutní Ne: 1,4, Ly: 0,4, Mo: 0,1, Eo: 0,0, Ba: 0;

Diferenciál manuální: SEG: 80, Ly: 16, Mo: 4, : poly,

hemolýza, anisocytóza, makrocytóza, schistocyty,

hypersegmentace jader neutrofilů



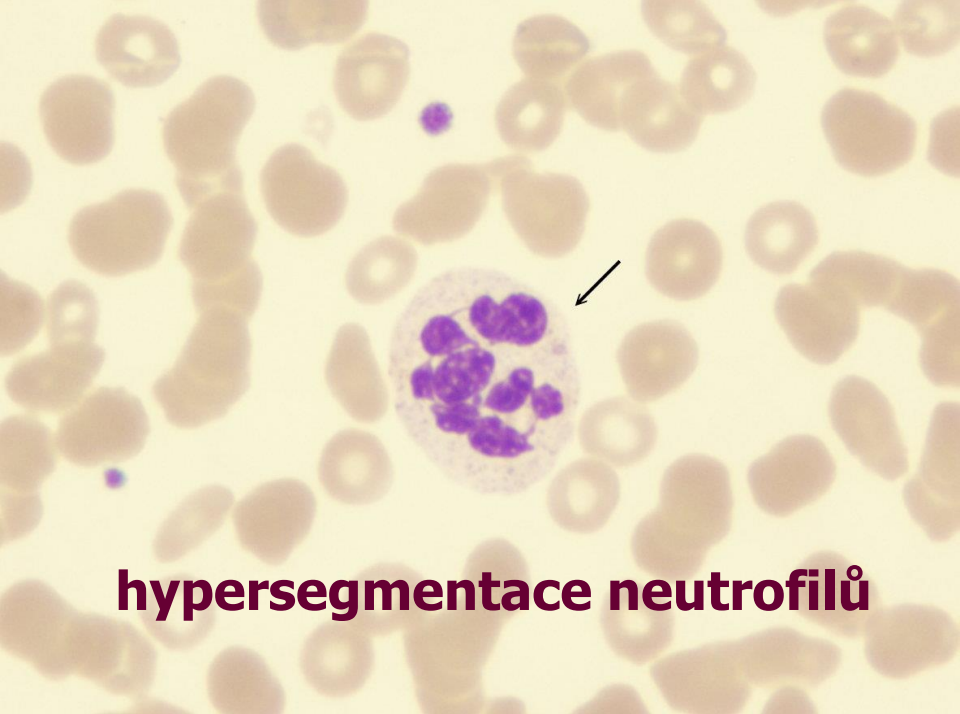
Jaterní testy: **Bili: 50,9, Bili př.: 7,4**, ALT: 0,61, AST: 1,13,
GGT: 0,15, ALP: 0,82, Cholinesteráza: 64
Enzymy:, LD: 49,30

Transferrin: 1,58 ↘ **Ferritin: 520,4** ↗

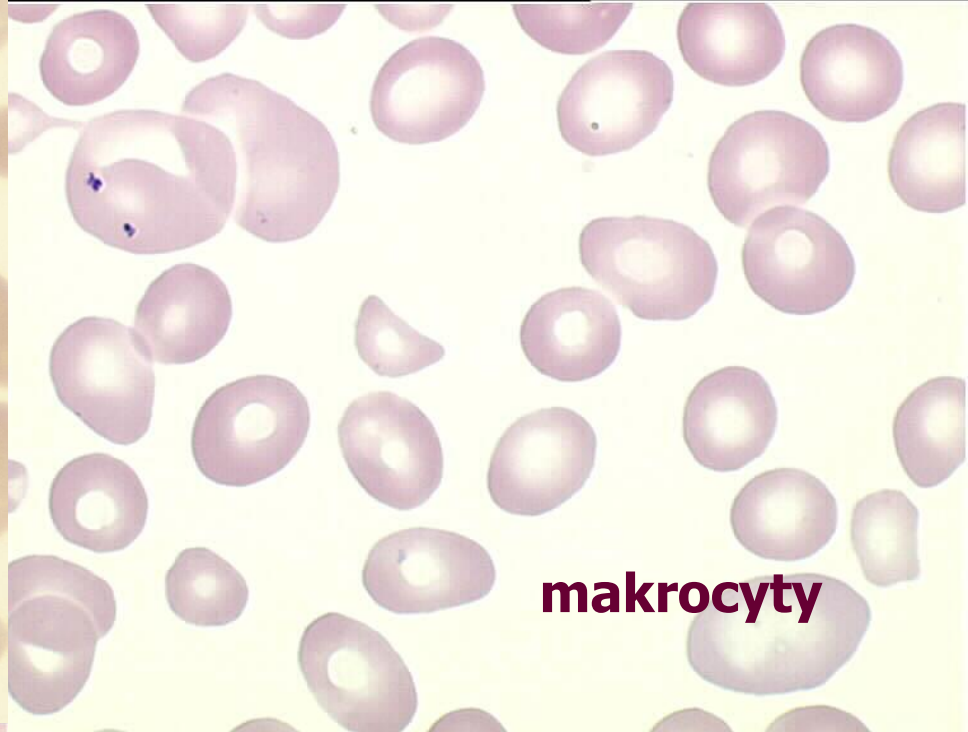
Sérum spec.vyšetření: **Vitamín B12: 54** ↘
Aktivní B12 (Holo TC): 2

... doporučeno gastroscopické vyšetření k
vyloučení tu žaludku, které ale pacient odmítá i
přes podrobné poučení...

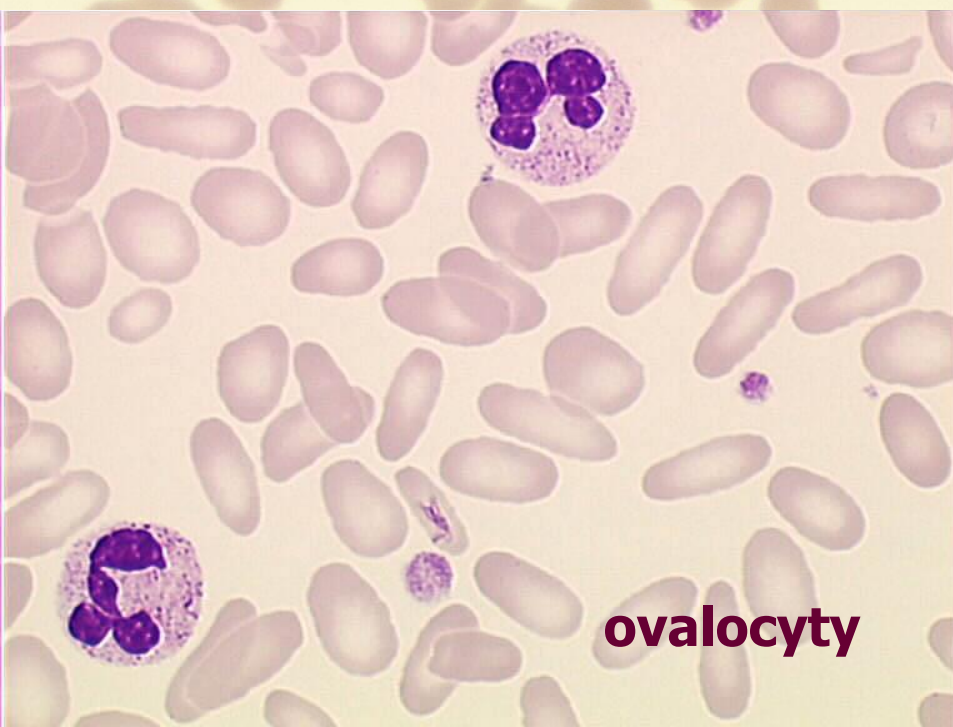
atrofická gastritida = prekanceróza



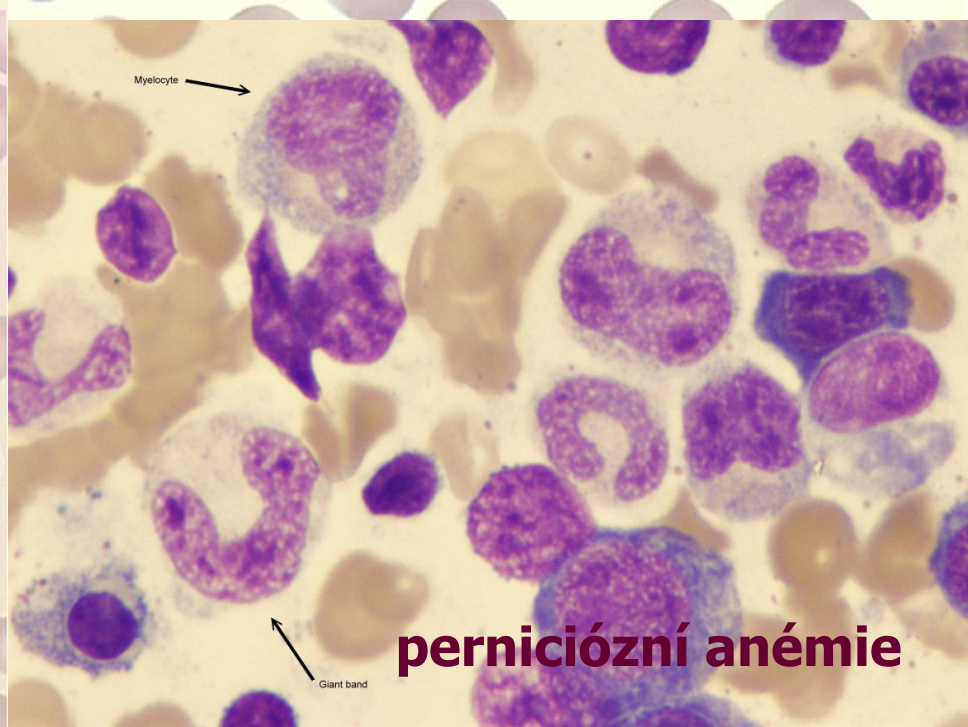
hypersegmentace neutrofilů



makrocyty



ovalocyty



perniciózní anémie

Vyšetřovací metody v hematologii / 6 ERY

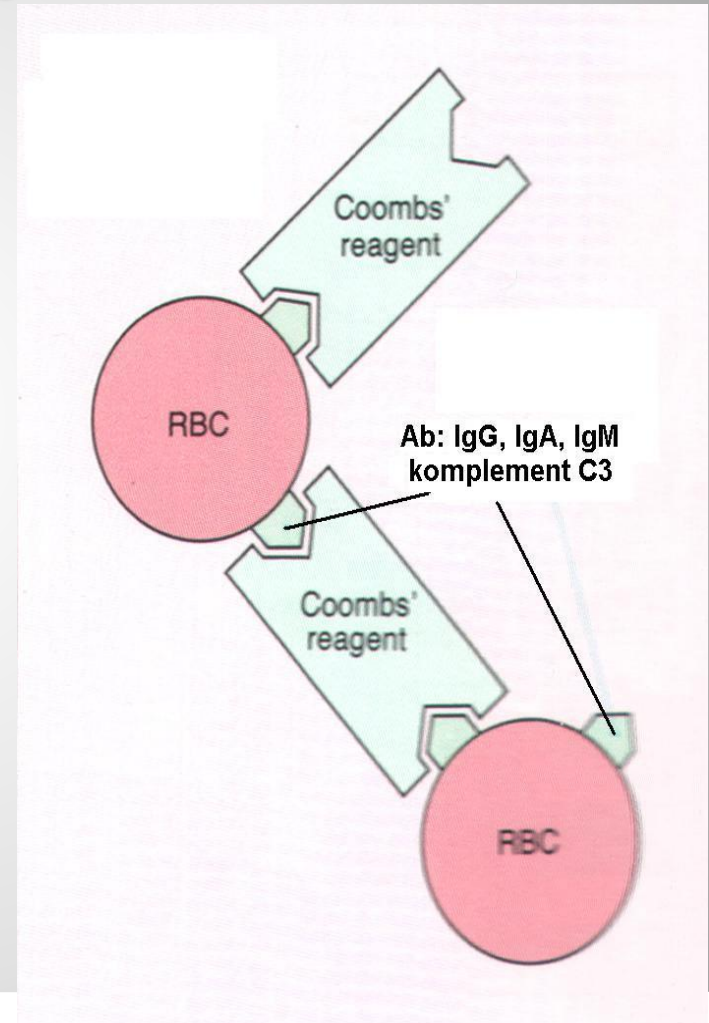
Hemolytické anémie = rozpad erytrocytů

Vyšetření protilátek proti ery:

- **Přímý antiglobulinový test (PAT)
(přímý Coombsův test)**
- **Nepřímý antiglobulinový test (NAT)
(nepřímý Coombsův test)**
- **Další test: stanovení haptoglobinu**

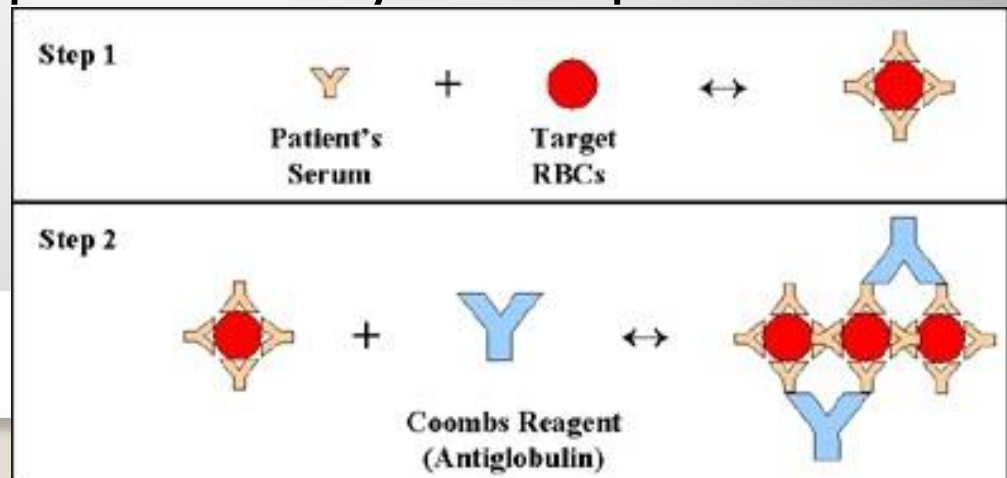
Přímý antiglobulinový test - PAT

- PAT, přímý Coombsův test)
-
- k průkazu autoantilát (IgG) navázaných na povrch erytrocytu.
- Sérum proti lidskému globulinu (SAG) nebo anti-C3 přidané do suspenze testovaných krvinek způsobí aglutinaci erytrocytů senzibilizovaných autoantikátkou navázanou na svém povrchu



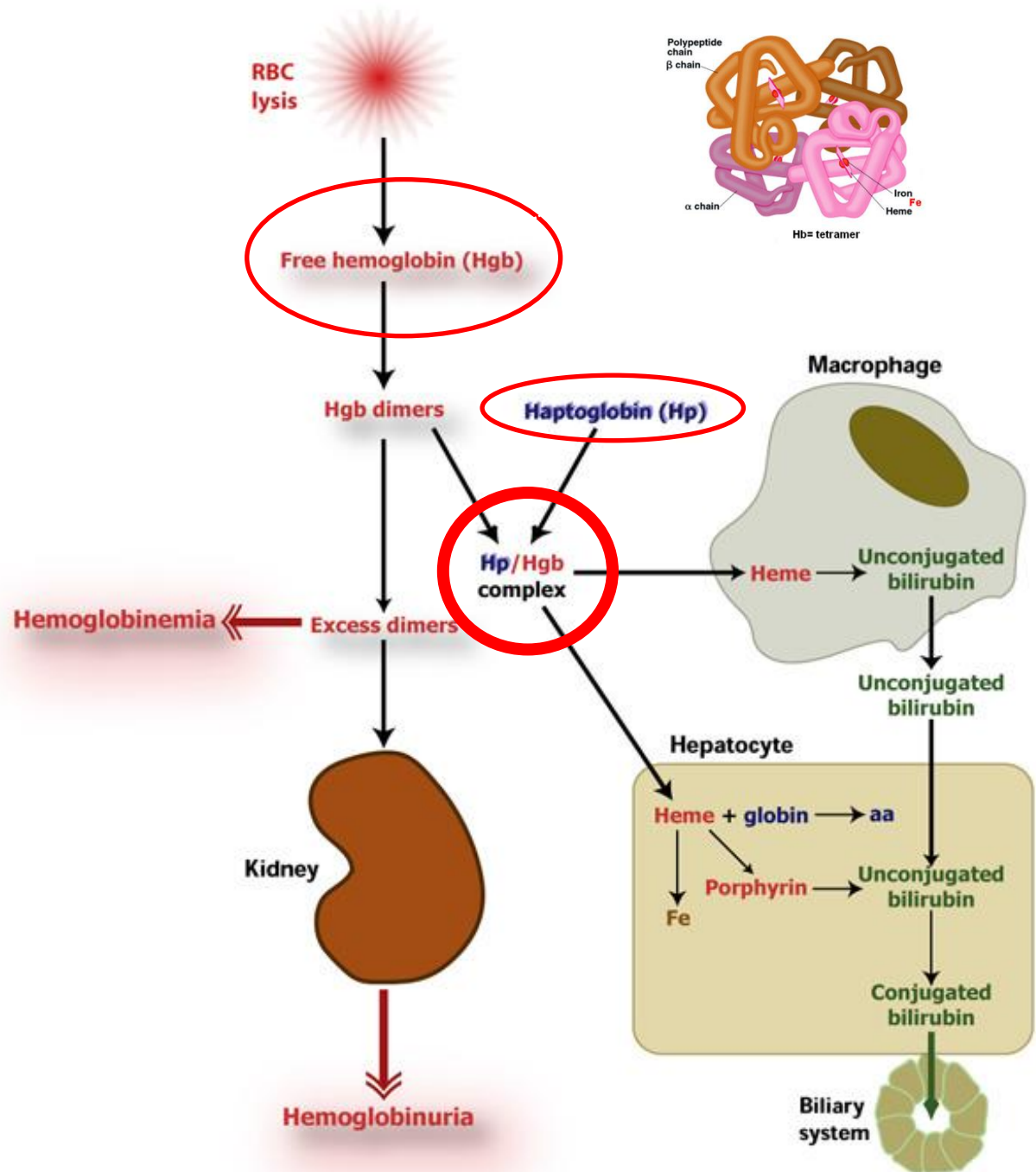
Nepřímý antiglobulinový test - NAT

- **NAT, nepřímý Coombsův test**
- slouží k **průkazu volně cirkulujících** (na krvinky nenavázaných) autoprotilátek (IgG) v séru nemocného.
- **Kompatibilní krvinky zdravého jedince jsou inkubovány se sérem nemocného**, a volné protilátky se tak navážou na povrch těchto erytrocytů.
- Po vyprání volného séra a po přidání antihumánního globulinového séra (SAG) nebo anti-C3 do vzorku dojde k aglutinaci – k průkazu volných autoprotilátek.



Hemolytická anémie – spotřeba haptoglobin

haptoglobin v plasmě



POLYCYTÉMIE = zvýšený počet ery

Hemoglobin (g/l)	190,0
Erytrocyty ($10^{12}/l$)	6,01
Hematokrit	0,58
Barevná koncentrace	0,32
Objem erytrocytu (fl)	95,3
Retikulocyty	0,005
Trombocyty ($10^9/l$)	628,0

Leukocyty ($10^9/l$)	11,5
Neutrofilní segment	0,62
Neutrofilní tyč	0,03
Eosinofilní segment	
Basofilní segment	
Monocyt	0,06
Lymfocyt	0,29

pozn.: FW 0 za 1 hod

Vyšetřovací metody v hematologii / 7

bílý krevní obraz - Leu

- **Leukocyty**
 - Granulocyty
 - neutrofilní
 - esinofilní
 - basofilní
 - Agranulocyty
 - lymfocyty
 - Monocyty

Vyšetřovací metody v hematologii / 7

Bílý krevní obraz - Leu

Počet leukocytů (White Blood Cells – WBC)

- v jednom litru krve

fyziologické hodnoty dospělí: $4,4 - 10,0 \cdot 10^9/l$

Diferenciální rozpočet bílých krvinek „diferenciál“

- zastoupení jednotlivých typů bílých krvinek v periferní krvi

diferenciál:

granulocyty –	neutrofilní
	basofilní
	eosinofilní
monocyty	
lymfocyty	

- mikroskopické hodnocení obarveného nátěru periferní krve:
morfologie leukocytů, erytrocytů i trombocytů.

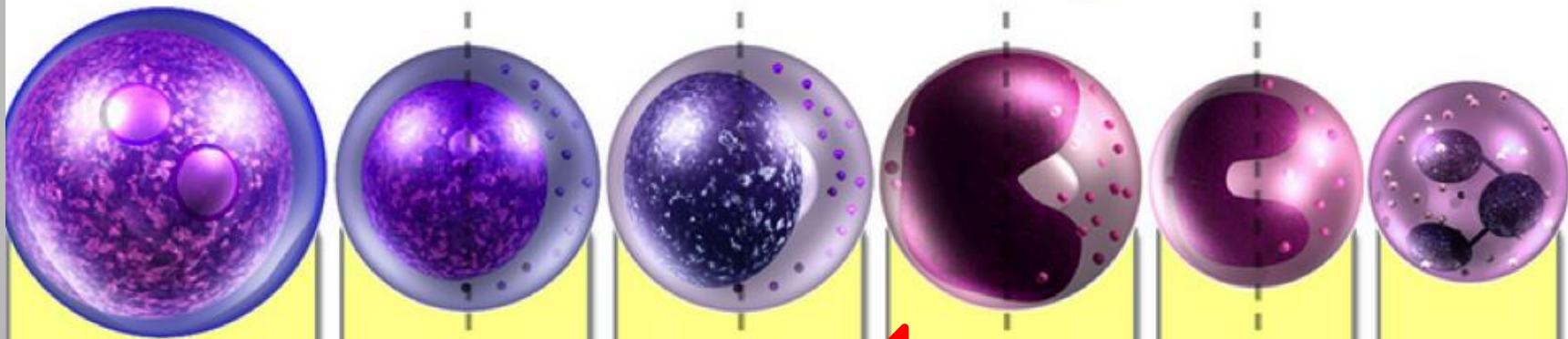
NÁLEZY V BÍLÉM KREVNÍM OBRAZE

NORMÁLNÍ HODNOTY DIFERENCIÁLNÍHO KREVNÍHO OBRAZU

Leukocyty ($10^9/l$)	3,6 – 9,6
Neutrofilní segment	0,50 – 0,75
Neutrofilní tyč	0,01 – 0,05
Eosinofilní segment	0,0 – 0,04
Basofilní segment	0,0 – 0,01
Monocyt	0,03 – 0,10
Lymfocyt	0,20 – 0,40

REAKTIVNÍ ZMĚNY V DIFERENCIÁLNÍM KREVNÍM OBRAZE

Vyzrívání granulocytů



Myeloblast

Promyelocyt

Myelocyt

Metamyelocyt

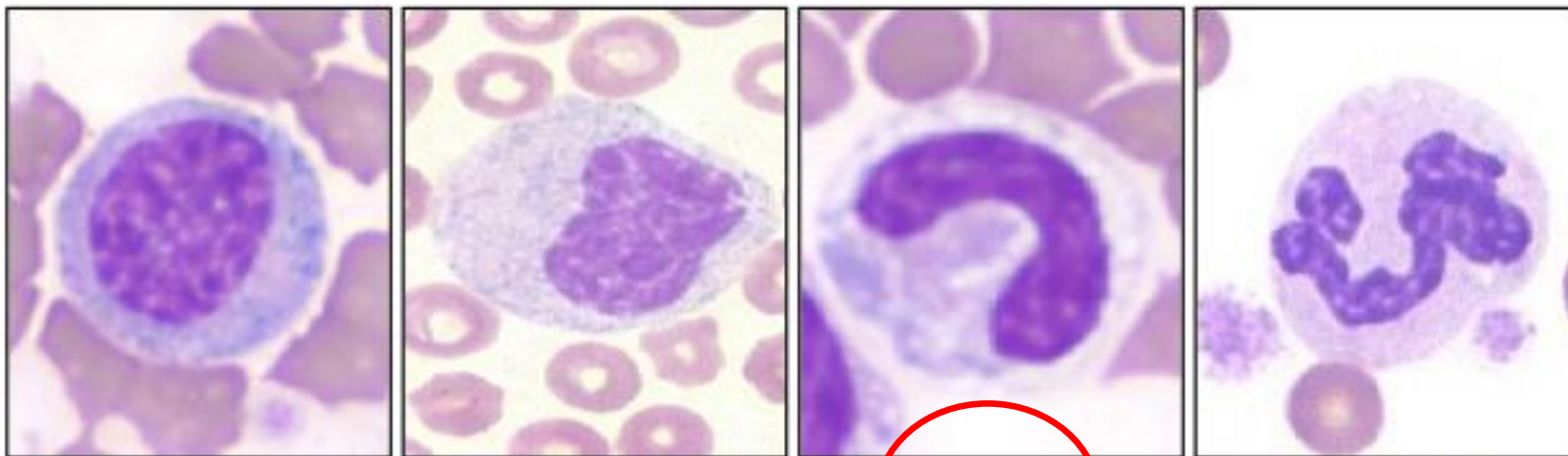
Neutrofilní
tyčka

Neutrofilní
segment

Posun doleva



REAKTIVNÍ ZMĚNY V DIFERENCIÁLNÍM KREVNÍM OBRAZE



Myelocyte

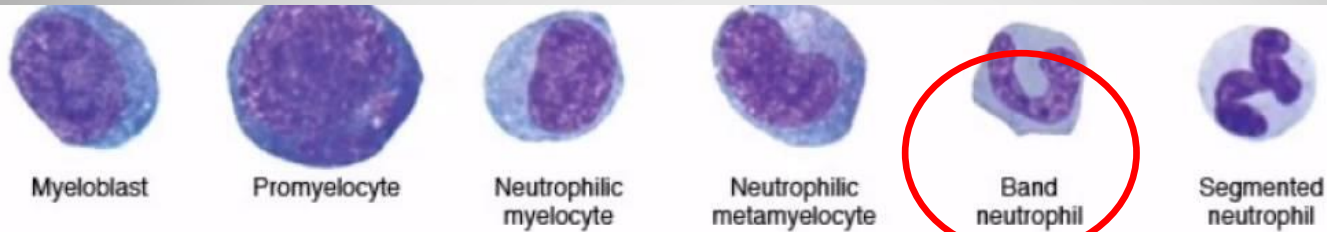
Metamyelocyte

tyčka

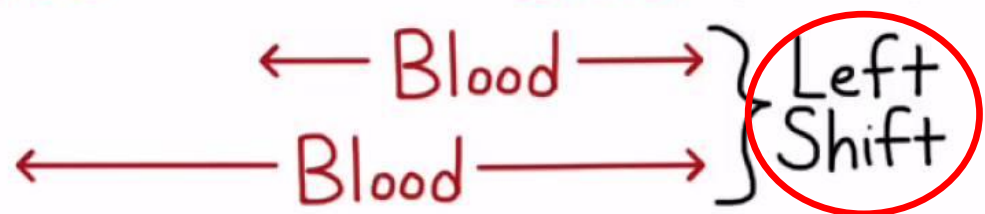
Segmented
neutrophil

Posun doleva

posun doleva = reakce na bakteriální infekci



← Bone Marrow → Blood Normal



① Degenerative

- &/or {
- * Immature > Seg. Neuts.
 - * ↓ Seg. Neuts. + Left shift
 - Severe/Overwhelming inf.
 - Sepsis, severe infection
 - P_r

② Regenerative

= posun doleva = reakce na bakteriální infekci

REAKTIVNÍ ZMĚNY V DIFERENCIÁLNÍM KREVNÍM OBRAZE

Posun doleva vyplavení mladších forem neutrofilních leukocytů - tyčky, MC a MMC



Leukemoidní reakce: posun doleva až k myeloblastům

REAKTIVNÍ ZMĚNY V DIFERENCIÁLNÍM KREVNÍM OBRAZE

lymfocytóza / polyklonální / virové infekce

monocytóza – virové infekce

eosinofilie – alergické onem., parazitární onem.

.

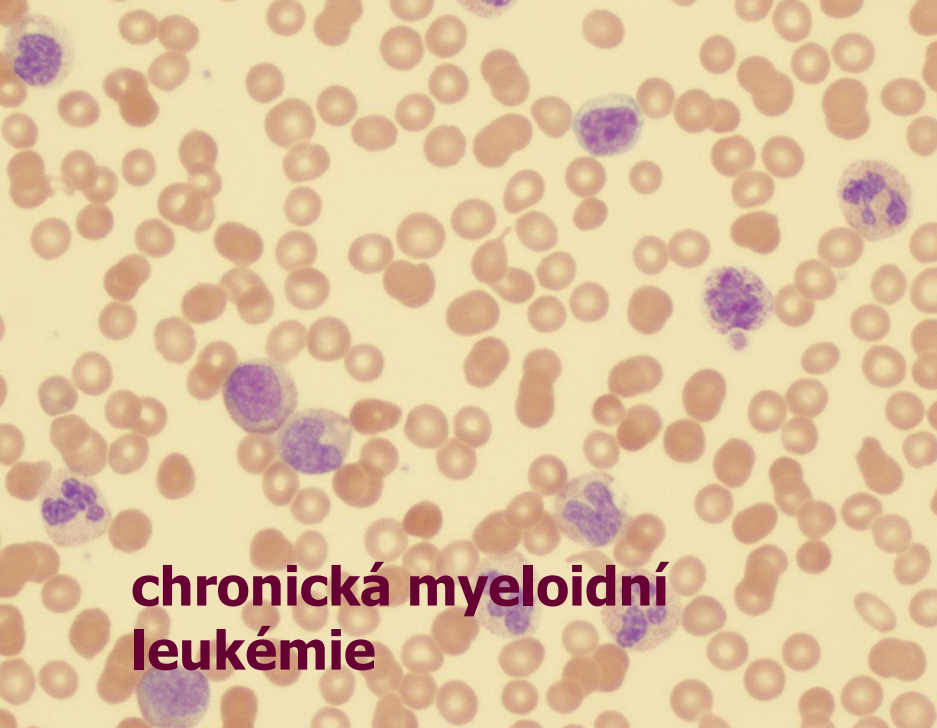
Příklady změn v bílé řadě

Hemoglobin (g/l)	136
Erytrocyty ($10^{12}/l$)	4,42
Barevná koncentrace	0,35
Hematokrit	0,39
Objem erytrocytu (fl)	88
Retikulocyty	0,003
Trombocyty ($10^9/l$)	654,0

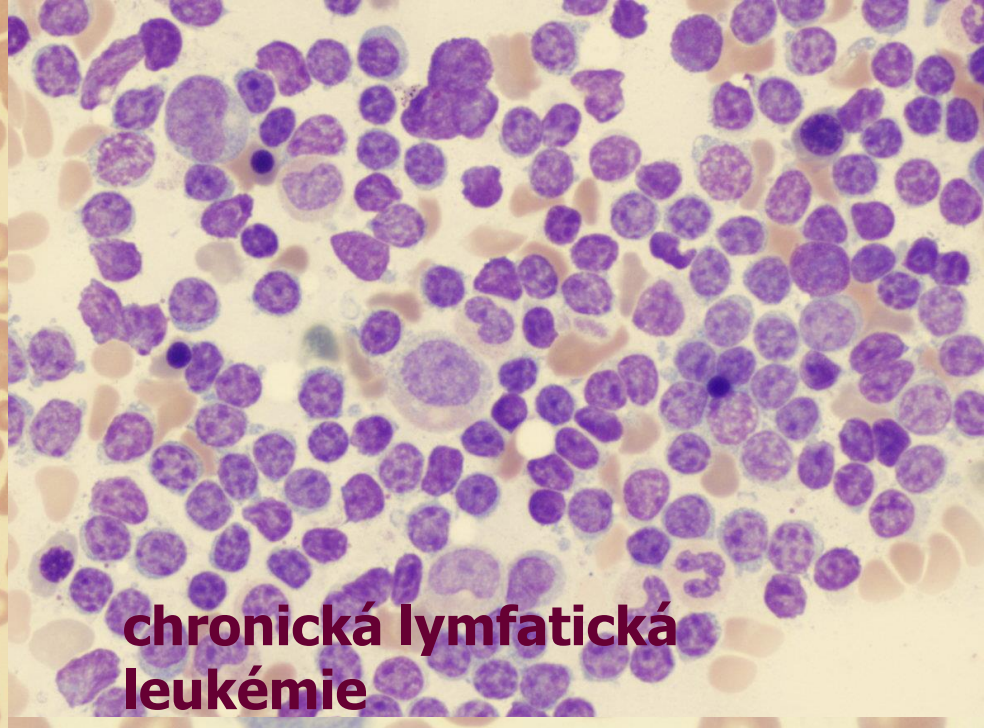
Chronická myeloidní leukemie

ČO: mírná anisocytóza
alkalická fosfáza v leuko: 0

Leukocyty ($10^9/l$)	234,0
Neutrofilní segment	0,17
Neutrofilní tyč	0,23
Myeloblast	0,02
Promyelocyt	0,04
Neutrofilní myelocyt	0,28
Neutrofilní metamyelocyt	0,14
Eosinofilní segment	0,03
Basofilní segment	0,06
Monocyt	0,02
Lymfocyt	0,01



**chronická myeloidní
leukémie**



**chronická lymfatická
leukémie**



Gumprechtovy stíny



vlasatobuněčná leukémie

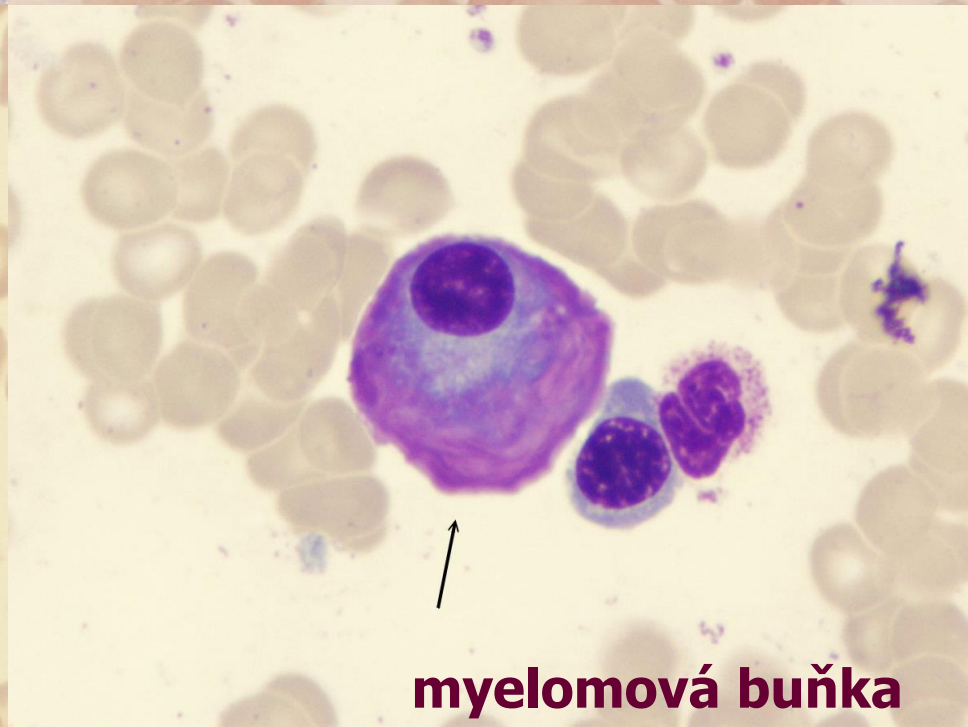
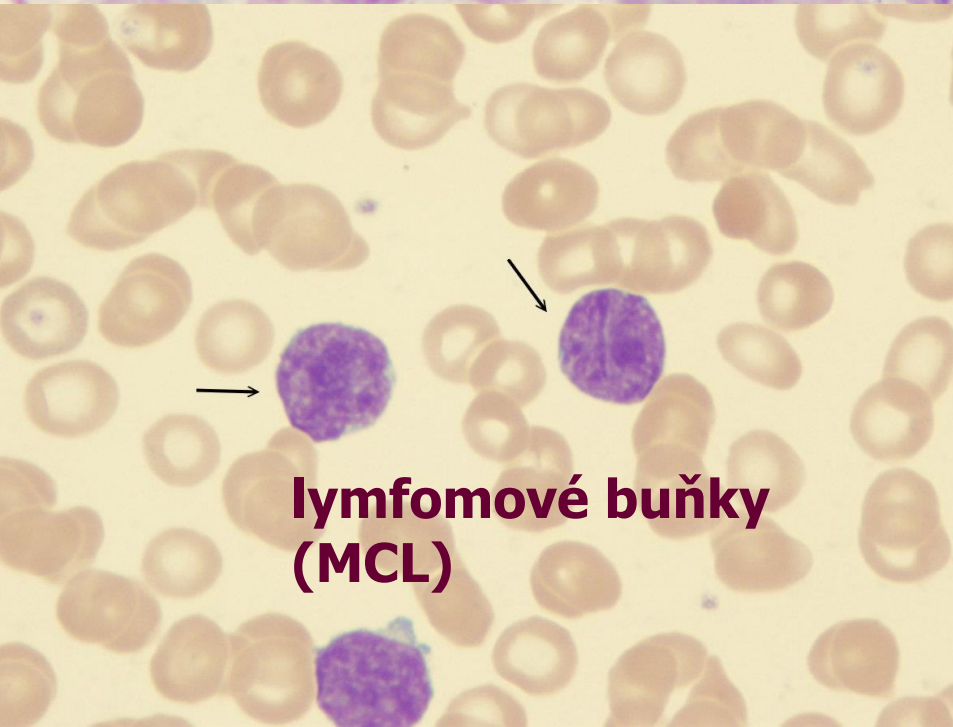
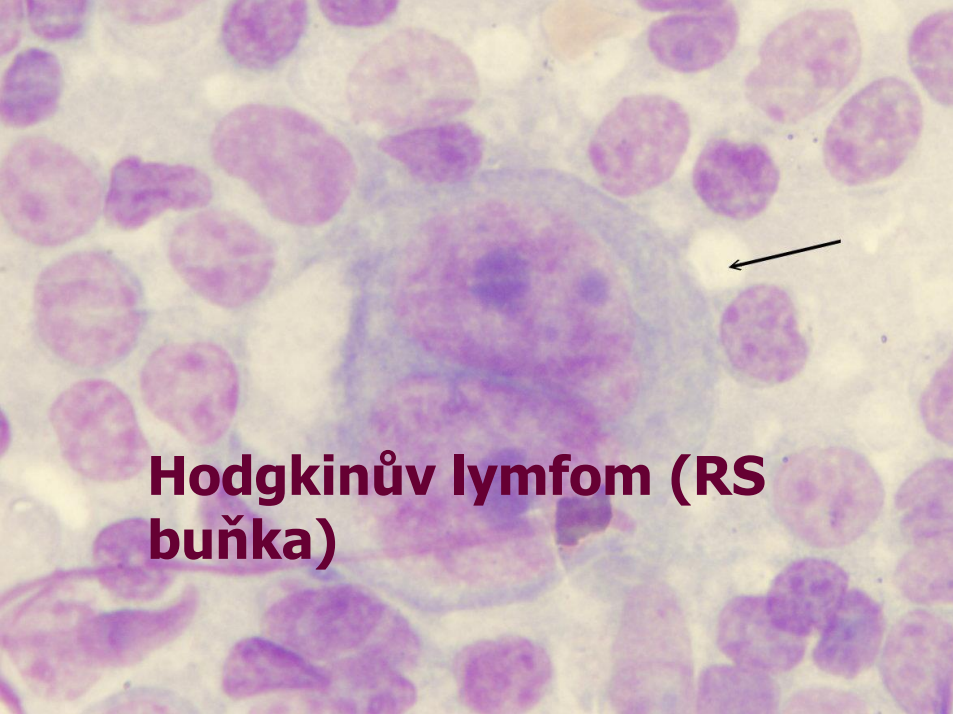
Příklady změn v bílé řadě

Hemoglobin (g/l)	109,0
Erytrocyty ($10^{12}/l$)	3,95
Hematokrit	0,34
Barevná koncentrace	0,32
Objem erytrocytu (fl)	86,0
Retikulocyty	0,005
Trombocyty ($10^9/l$)	152,0

Leukocyty ($10^9/l$)	129,0
Neutrofilní segment	0,03
Neutrofilní tyč	
Eosinofilní segment	
Basofilní segment	
Monocyt	0,01
Lymfocyt	0,96

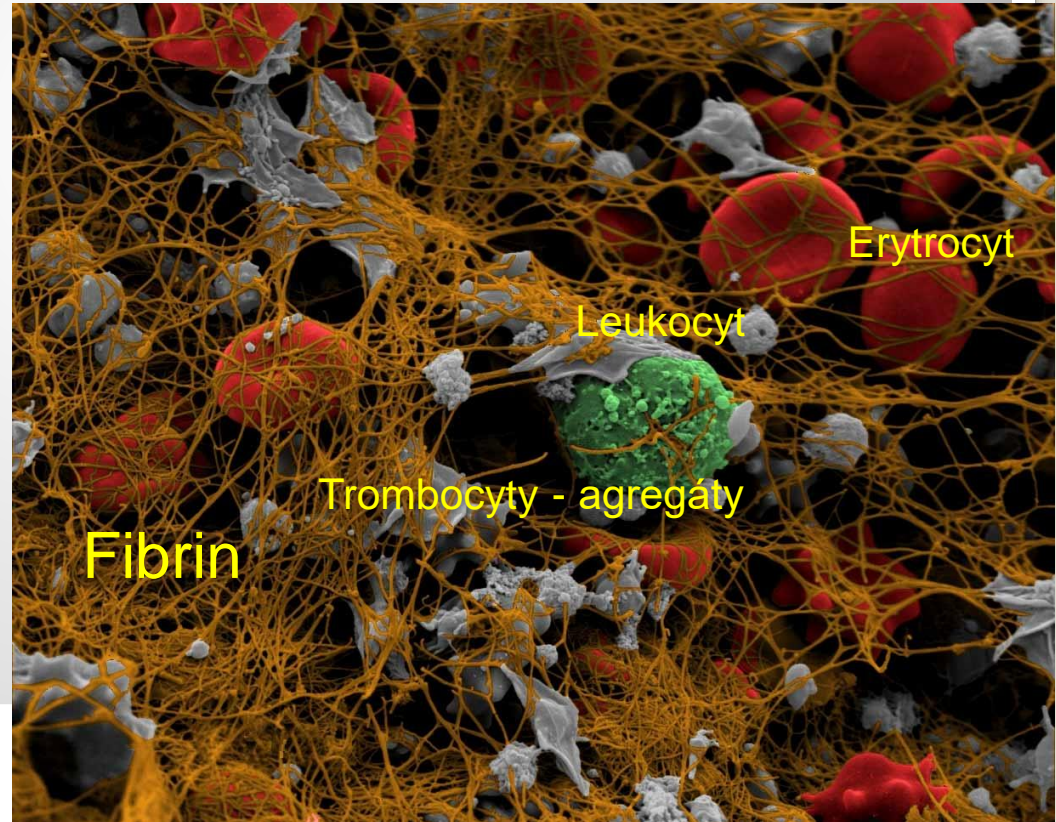
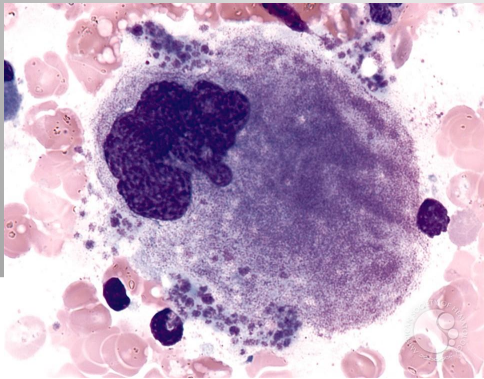
Chronická lymfocytární leukemie

pozn.: Gumprechtovy stíny **23/100**

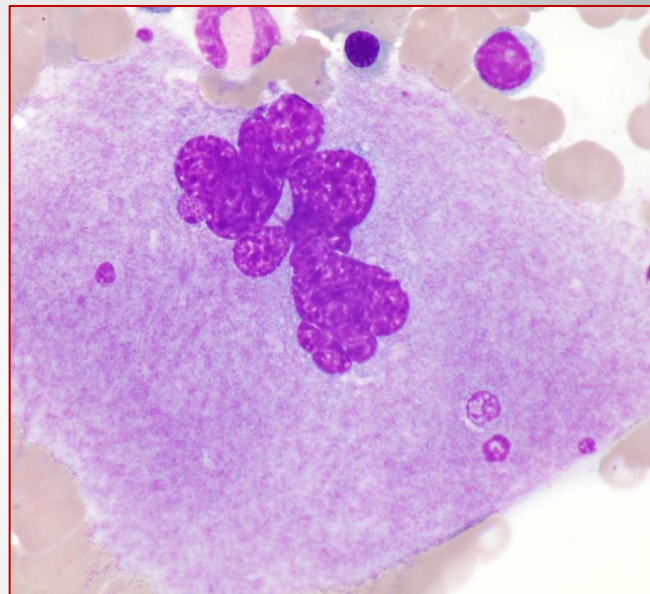
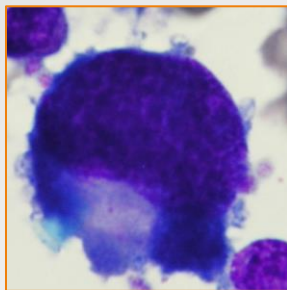
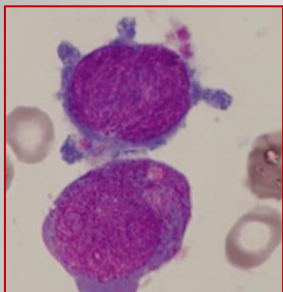


Složení a funkce krve: **trombocyty** destičky

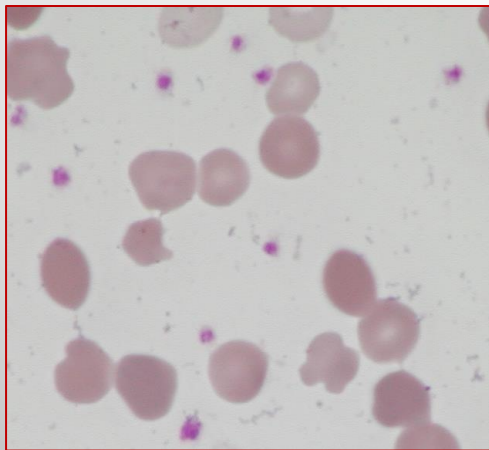
- nejmenší z pevných součástí krve
- zásadní postavení ve srážení krve
- účastní se na vzniku trombóz a embolií
- nejsou buňkami, pouze fragmenty cytoplasmy obrovských buněk, megakaryocytů (mgc).
- mgc jsou v kostní dřeni

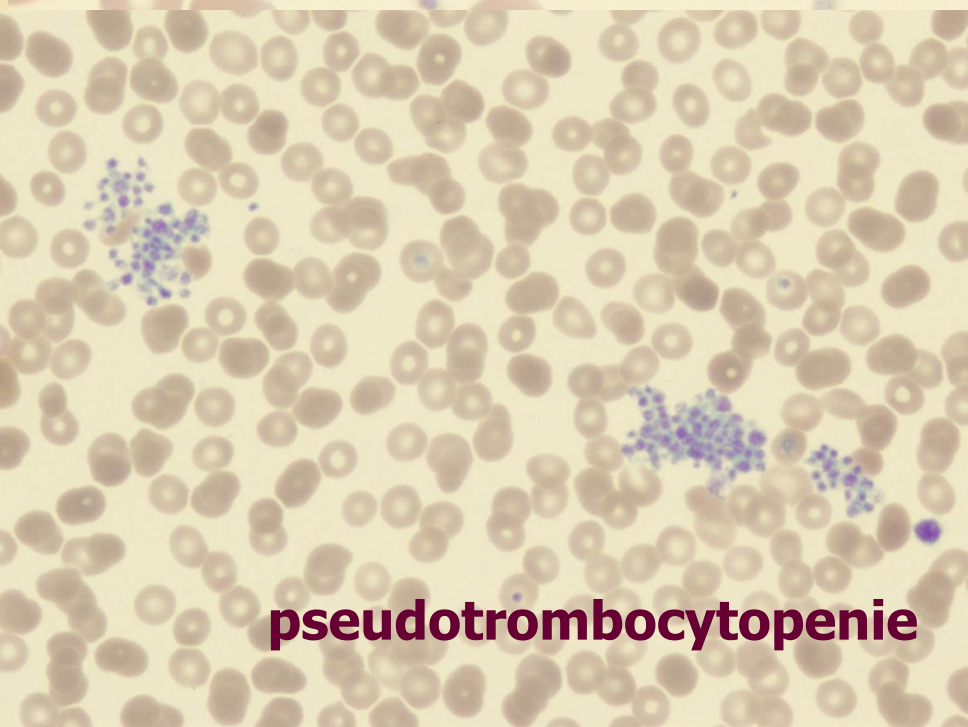
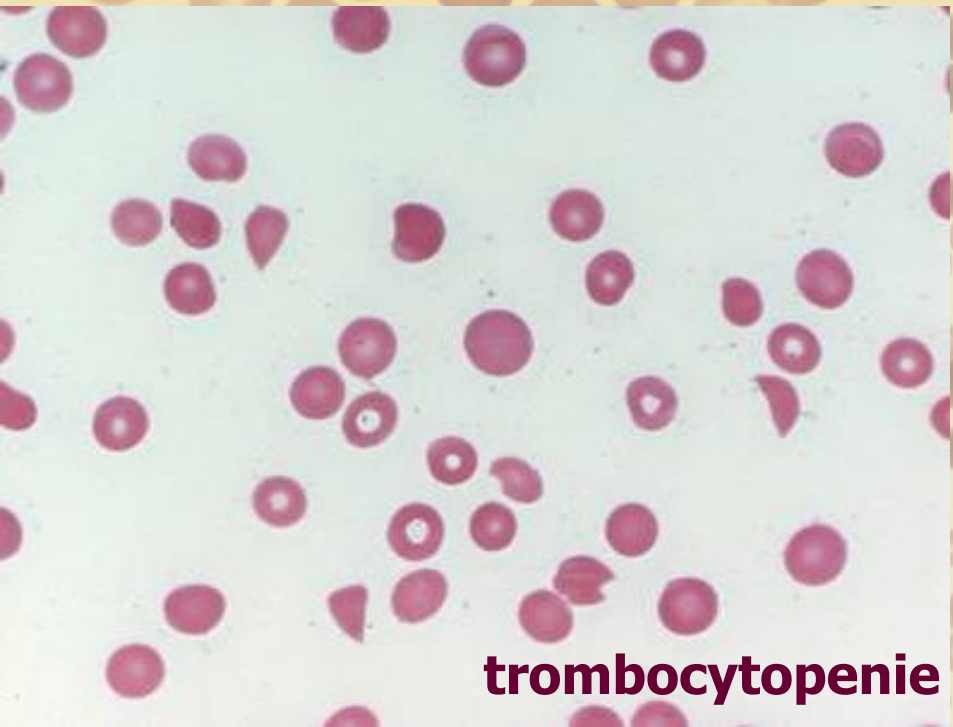
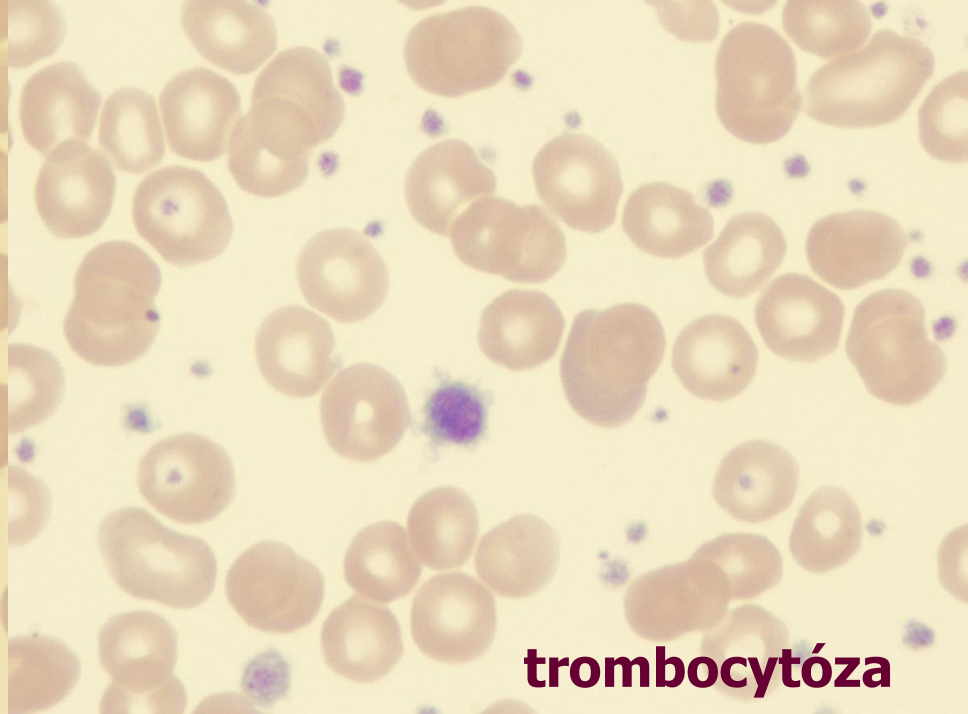
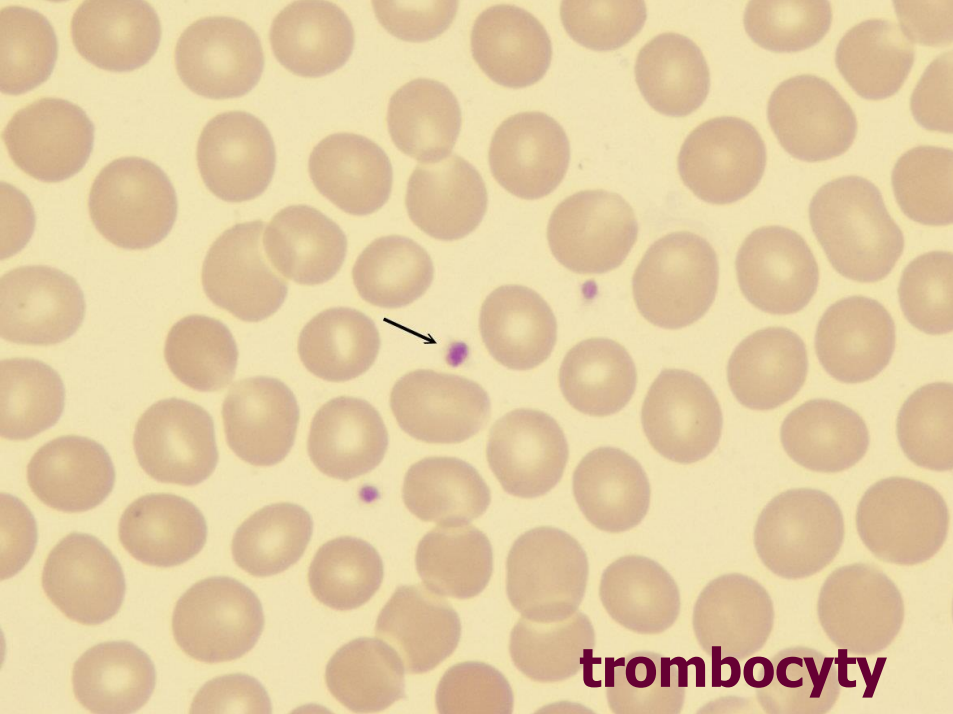


megakaryoblast → promegakaryocyt → megakaryocyt



trombocyty





Ad 2/ Vyšetření kostní dřeně

Odběr vzorku kostní dřeně

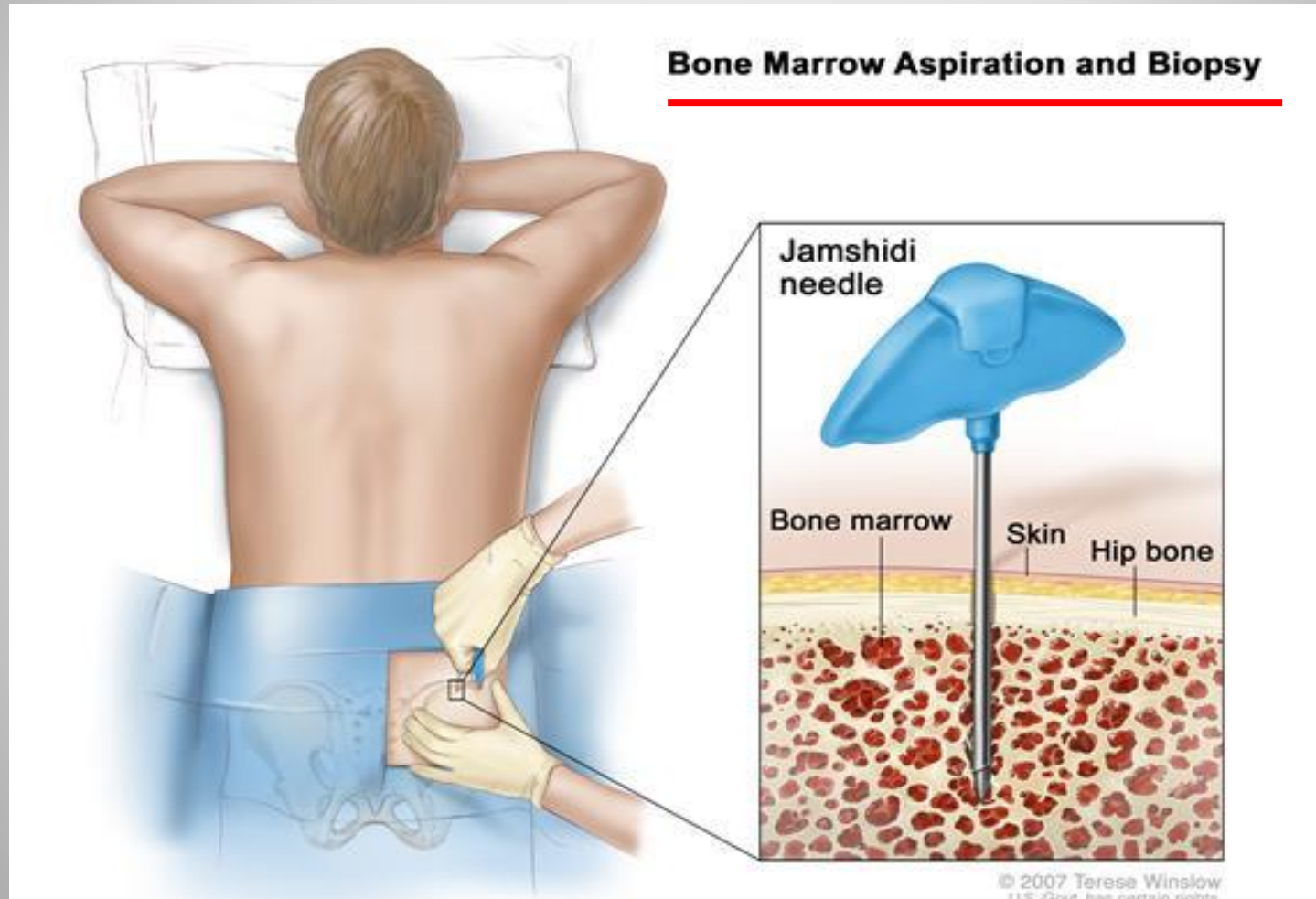
a/ Trepanobiopsie - histologické vyšetření

b/ Aspirační punkce - cytologické vyšetření

1/ při trepanobiopsii

2/ aspirace ze sternální kosti

- a/ Trepanobiopsie - histologické vyšetření kostní dřeně**
b/ Aspirační punkce kostní dřeně - cytologické vyšetření



Ad 2/ Vyšetření kostní dřeně

a/ Trepanobiopsie

- histologické vyšetření

b/ Aspirační punkce

- cytologické vyšetření

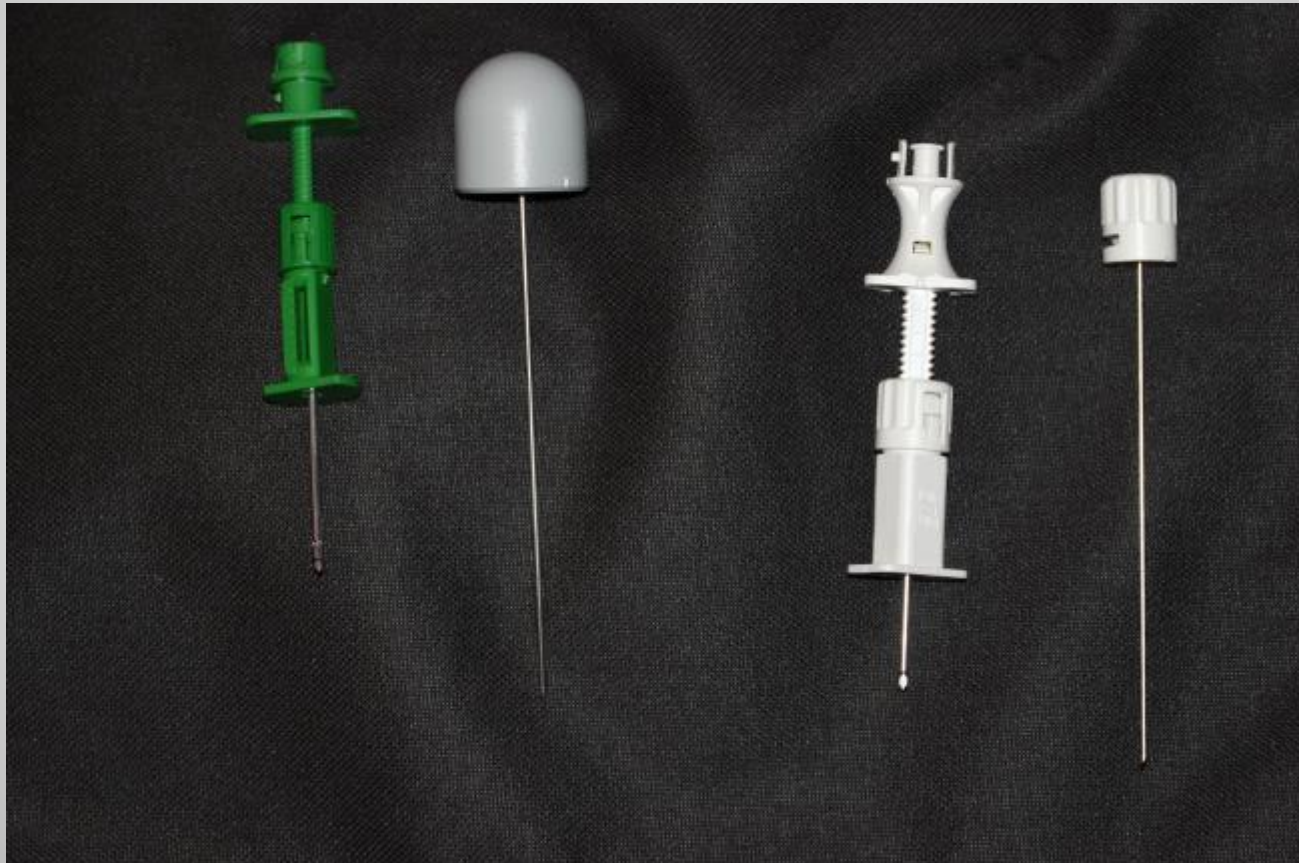
**b/1 při
trepanobiopsii**



**b/2 aspirace ze
sternální kosti**



Punkční a sternální jehla



Trepanobioptické jehly



ad 3/ Speciální vyšetření

- **3/ Speciální vyšetření**
 - cytochemické vyšetření krevních buněk
 - **cytogenetické** vyšetření buněk kostní dřeně
 - **molekulárně biologické (cytogenetické)** vyšetření buněk kostní dřeně a nádorové tkáně
 - **imunofenotypizace (FACS)**
 - **kultivace hematopoetických buněk *in vitro***

Cytochemické vyšetřovací metody

– **pomocí barevných reakcí** prokazují přítomnost některých substancí, nebo enzymů, a tím umožní prokázat příslušnost krevních elementů k určité vývojové řadě.

Například:

Reakce na **železo** - lze prokázat přítomnost železa v erytrocytech nebo erytroblastech.

Alkalická fosfatáza v leukocytech – přítomna v plazmě zralých neutrofilních leukocytů.

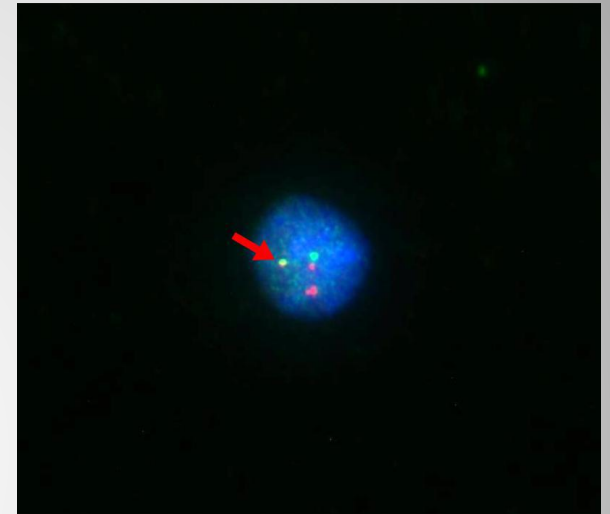
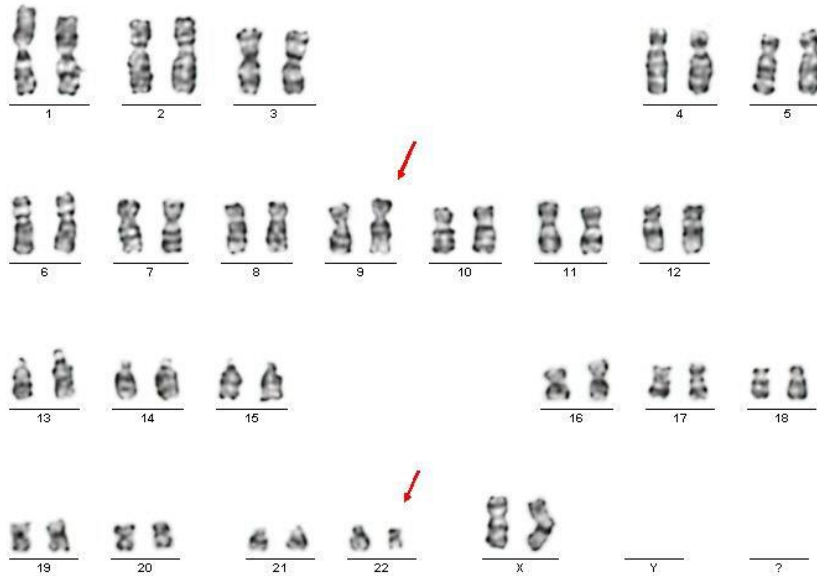
Kyselá nespecifická esteráza - u lymfocytů reakce tečkovitá, u monocytů difuzní

PAS (Periodic Acid Schiff) – identifikace lymfoblastické populace, pozitivní i v erytroblastech erytroleukémií.

Cytogenetické / molekulárně biologické metody

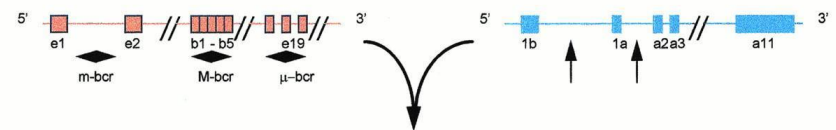
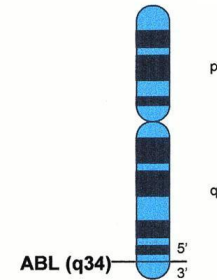
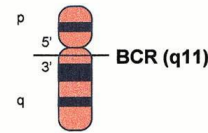
- **cytogenetické metody** – průkaz translokací genů
- U hematologických onemocnění je nálezný klon s patologickým karyotypem důkazem probíhajícího maligního procesu - např. **Philadelphia chromosom** u chronické myeloidní leukemie.
- Při opakovaných vyšetřeních v průběhu léčby leukémií umožní výsledek cytogenetického vyšetření
 - posoudit úspěšnost léčby
 - potvrdit remisi choroby
 - nebo odhalit blížící se relaps onemocnění
 - u pacientů po transplantaci kostní dřeně se pomocí cytogenetických metod sleduje úspěšnost léčby.

Philadelphia chromosom



Chromozóm 22

Chromozóm 9



Imunologické markery

- Slouží k přesné diagnostice typu zhoubných krevních chorob
- CD (Cluster of Differentiation) klasifikační systém
- pomocí **průtokové cytometrie** jsou určovány populace lymfocytů (T a B)
- jsou stanovovány antigeny, jejichž kombinace jsou typické pro různé typy leukocytů a různá stadia zralosti
- např. CD3 - T lymfocyty
- CD19, CD20, CD21, CD22 - **B lymfocyty**.

Onkologické markery

- význam pro sledování a prognózu nádorového onemocnění např.
- **Beta2 – mikroglobulin** – používá se pro monitorování pacientů s mnohočetným myelomem a nádory lymfatického systému
- **LD**
- **Ferritin** – signifikantní pro lymfomy a leukémie

4/ Koagulační vyšetření

Hemokoagulační testy

A. Globální, skupinové, vyhledávací:

1. parciální tromboplastinový čas (PTT), resp. **aPTT**,
2. tromboplastinový test – Quickův test (**INR**),
3. trombinový čas (TT),
4. konzumpční protrombinový test,
5. retrakce koagula.

B. Specifické:

1. izolované určení faktorů (I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII),
2. tromboplastinový generační test,
3. určení antitrombinu III.

4/ Koagulační vyšetření - základní

Hemokoagulační testy

A. Globální, skupinové, vyhledávací:

1. parciální tromboplastinový čas (PTT), resp. **aPTT**
2. tromboplastinový test – **Quickův test (INR)**

Koagulační vyšetření

aPTT

Postavení testu: používá se rutinně, standardně při předoperačním vyšetření, při kontrole léčby heparinem, dává se mu přednost před TT

aPTT je závislý především na činitelích počátečních období koagulace – na faktorech XII, XI, IX, VIII a teprve ve druhé řadě jsou zachyceny faktory X, V, II, I.

Prodloužení:

- hemofilie A, B (nedostatek faktorů VIII, IX), vzácně XII, XI,
- DIC, hyperfibrinolýza (= konzumpce faktorů),
- získaný (většinou přechodný) nedostatek f. VIII při masivní krevní transfuzi, po PNC,
- nedostatek faktorů I, II, V, X,
- inhibitory krevního srážení = heparin,
- fyziologicky u kojenců

Koagulační vyšetření

Prodloužení Quickova testu (INR):

- Význam spočívá zejména v **kontrole léčby dikumariny** (warfarin), kdy se hodnoty udržují podle základní indikace:
 - **profylaxe (riziko trombózy, operace):** INR = 1,5 až 2,5; (při nižších hodnotách INR (mezi 1,5–2,0) se uplatňuje spíše antitrombotický než antikoagulační efekt warfarinu);
 - **terapie trombózy, profylaxe (ortopedické) operace:** INR=2,0-3,0
- recidivující trombózy a embolie: INR = 3,0–4,0;
- nedostatek a chybění faktorů II, VII, X, V;
- při poškození jaterního parenchymu;
- DIC v přítomnosti štěpných produktů fibrinogen//fibrin (= FDP);
- trombolytická léčba;
- při léčbě heparinem, je-li koncentrace vyšší než 1 IU/1 ml plazmy

