

Stabilita parametrů krevního obrazu a mikroskopicky stanoveného diferenciálního počtu leukocytů

Babuňková E.¹, Kačírková P.², Oupická M.², Babuněk O.³, Salačová P.², Špaček M.¹

¹Centrální hematologické laboratoře ÚLB LD, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

²Laboratoř hematologie ÚLD, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

³Fakulta ekonomická Západočeské univerzity v Plzni

Transfuzie Hematol. dnes, 22, 2016, No. 4, p. 254–263

SOUHRN

Úvod: Vyšetření krevního obrazu (KO) a diferenciálního počtu leukocytů patří mezi základní laboratorní vyšetření. Faktorem, který může negativně ovlivnit validitu výsledků, je čas od odběru vzorku do jeho zpracování (stabilita vzorku). Cílem práce bylo při různé teplotě a délce skladování vzorku analyzovat změny v KO (včetně nových rozšířených parametrů) a v diferenciálním počtu leukocytů stanoveném na hematologickém analyzátoru krvinek i mikroskopicky, včetně kvalitativních morfologických změn.

Materiál a metoda: Data byla získána od 20 zdravých dobrovolníků (6 mužů/14 žen), kterým byly odebrány 3 zkumavky venózní krve s K3EDTA. Vzorky krve byly měřeny na hematologickém analyzátoru XE2100 (TOA Sysmex), nátěry periferní krve byly provedeny na nátěrovém a barvicím automatu SP1000i (TOA Sysmex). Vzorky byly opakovaně měřeny v intervalu 20 minut až 72 hodin od odběru a skladovány při laboratorní teplotě (18–25 °C) nebo v lednici (2–8 °C).

Výsledky: Statisticky významné změny KO již po 12 hodinách skladování při laboratorní teplotě byly pozorovány v případě přímo měřených parametrů HCT a PCT, stejně jako u parametrů odvozených výpočtem (MCV, MCHC, RDW, PDW, MPV, P-LCR). Všechny pozorované parametry jsou uvedeny v tabulce 1. Významně se měnily v čase i hodnoty RET-He a IPF. Naopak u ostatních parametrů KO nebyly prokázány statisticky významné změny po celou dobu sledování (72 hodin). Parametry diferenciálního počtu leukocytů z analyzátoru byly stabilní po celou dobu sledování, s výjimkou parametru počet monocytů (absolutně i relativně), který byl stabilní pouze při teplotě 2–8 °C. V případě mikroskopického diferenciálního počtu leukocytů docházelo při laboratorní teplotě po 12 hodinách a při teplotě 2–8 °C většinou po 24 hodinách k apoptóze krevních buněk a ke změnám jejich morfologie.

Závěr: Naše práce ukázala, že výsledky některých klinicky nejdůležitějších parametrů KO (WBC, HGB, PLT) zůstávají stabilní až 72 hodin od odběru bez ohledu na teplotu skladování vzorku, což může být v některých klinických situacích či z forenzních důvodů důležité. Některé parametry KO ale mají výrazně kratší dobu stability, proto je v běžné praxi nutné se řídit doporučením České hematologické společnosti ČLS JEP, které stanoví stabilitu KO a diferenciálního počtu leukocytů na 5 hodin při teplotě 15–25 °C.

KLÍČOVÁ SLOVA

stabilita – krevní obraz – diferenciální počet leukocytů – leukocyty – erytrocyty – trombocyty

SUMMARY

Babuňková E., Kačírková P., Oupická M., Babuněk O., Salačová P., Špaček M.

Stability of complete blood count and microscopic differential count parameters

Introduction: Complete blood count (CBC) including the automated differential white blood cell count (WBC differential) represent a routine laboratory test. The time interval between sample collection and testing (sample stability) may have an important effect on the quality of test results. The aim of this study was to analyse changes in CBC (including new advanced parameters) and WBC differential performed both by a haematology analyser and microscopic examination at different storage temperatures over time, including qualitative morphological changes.

Materials and methods: Data were obtained from 20 healthy volunteers (6 males/14 females) from whom 3 tubes with K3EDTA venous blood were taken. Blood samples were measured using the XE2100 haematology analyser (TOA Sysmex). Peripheral blood smears were performed on the SP1000i automatic analyser (TOA Sysmex). After collection,

samples were repeatedly measured at predetermined time intervals of 20 minutes to 72 hours and stored at room temperature (18°C to 25°C) or refrigerated (2°C to 8°C).

Results: Statistically significant changes were observed both in the directly measured parameters (HCT and PCT) and in derived parameters (MCV, MCHC, RDW, PDW, MPV, P-LCR) after 12 hours of storage at room temperature. All observed parameters are given in Table 1. RET-He and IPF parameters also changed significantly over time. In contrast, no significant changes were observed in the remaining CBC parameters. Automated WBC differentials were stable for the duration of the study (72 hours), with the exception of monocyte level count (both absolute and relative), which was stable only at lower storage temperature (2°C to 8°C). Peripheral blood films showed disintegration of leukocytes and changes in their morphology after 12 hours of storage at room temperature and after 24 hours in refrigerated samples.

Conclusion: Our study has shown that the results of some clinically important CBC parameters (WBC, HGB, PLT) remain stable for up to 72 hours after collection regardless of storage temperature. This may be important in certain clinical situations or for forensic reasons. However, some CBC parameters have a much shorter period of stability. It is therefore necessary to follow standards for specimen storage and handling in routine practice, which have been published by the Czech Society of Haematology ČLS JEP: The recommended maximum storage interval for CBC and differential counts were 5 hours at 15°C to 25°C.

KEY WORDS

stability – complete blood count – leukocyte differential count – leukocytes – erythrocytes – platelets

ÚVOD

Stanovení parametrů krevního obrazu a diferenciálního počtu leukocytů patří mezi jedno ze základních hematologických vyšetření. Vyšetření lze považovat za rychlé a snadno dostupné. Klinickému lékaři přináší jednu z prvních informací o zdravotním stavu pacienta a výsledky mohou sloužit k určení diagnózy či monitorování léčby. V současné době je měření krevního obrazu prováděno vysoce specializovanými automatickými analyzátory, které umožňují stanovení mnoha parametrů, které dříve dostupné nebyly. Výsledky krevního obrazu ale mohou být významně ovlivněny časem dodání vzorku do laboratoře a teplotou jeho skladování. Je proto nutné brát při hodnocení výsledků ohled i na tzv. stabilitu vzorku a teplotu skladování vzorku. Stabilita vzorku je definována jako doba, která uplyne od odběru primárního vzorku do jeho vyšetření [1], tj. doba po kterou je zaručeno vydání spolehlivého výsledku. V doporučení České hematologické společnosti ČLS JEP je stabilita KO a diferenciálního počtu leukocytů stanovena na 5 hodin při teplotě skladování 15–25 °C. V běžné praxi ale může nastat situace, kdy je z vážných důvodů nutné změřit vzorek i po překročení doporučené doby stability, nebo je vyšetřen vzorek, u kterého neznáme přesný čas odběru. Pro laboratorního i klinického pracovníka je proto nutné, být si vědom změn, ke kterým postupně při delší době od odběru dochází.

Cílem práce proto bylo v první řadě zjistit, jaká je při různé délce a teplotě skladování vzorku stabilita základních parametrů krevního obrazu, diferenciálního počtu leukocytů i tzv. rozšířených parametrů KO,

kteří je možné stanovit na automatickém analyzátoru Sysmex XE 2100. Dále pak bylo naším cílem popsat, k jakým změnám v průběhu času dochází, a to jak u jednotlivých parametrů získaných z automatického analyzátoru, tak i v případě mikroskopicky stanoveného diferenciálního počtu leukocytů, včetně kvalitativních změn v morfologii jednotlivých buněk.

MATERIÁL A METODY

Soubor dárců a použitý materiál

Do studie bylo zařazeno 20 zdravých dobrovolníků (6 mužů/14 žen). Zařazení muži s věkovým mediánem 33,5 roků (rozsah 26–45 let) a ženy s věkovým mediánem 35 roků (rozsah 25–58 let). Dobrovolní dárce byli odebráni v ranních hodinách a od každého byly odebrány 3 zkumavky venózní krve s protisrážlivým činidlem K3EDTA. Jedna zkumavka byla změřena do 20 minut od odběru a následně byla měřena po 1, 4, 6, 8, 12, 24, 48 a 72 hodinách; po celou dobu byla zkumavka skladována při laboratorní teplotě (18–25 °C). Druhá zkumavka od každého pacienta byla po odběru uložena do lednice (teplota 2–8 °C) a měřena po 24 hod., 48 hod. a 72 hod. od odběru, při každém měření byl zároveň proveden i nátěr v nátěrovém a barvicím automatu SP-1000i (tedy po 24, 48 a 72 hod.). Z důvodu dostatečného množství vzorku byla krev třetí zkumavky použita pouze pro provedení nátěru v nátěrovém a barvicím automatu SP-1000i, nátěry krve byly provedeny po 20 minutách od odběru a dále po 4, 6, 12, 24, 48, 72 hodinách od odběru, krev byla uchovávána při laboratorní teplotě. Dobrovolní dárce podepsali informovaný souhlas pro účast ve studii.

Metody

Vzorky krve byly měřeny na hematologickém analyzátoru XE 2100 (TOA Sysmex) ve verzi, která umožňuje provést analýzu krevního obrazu, populačního diferenciálu (včetně parametru IG), retikulocytů a nezralých frakcí trombocytů (softwarové programy XE-RET MASTER a XE-IPF MASTER). Princip měření jednotlivých parametrů je uveden v tabulce 1. Nátěry periferní krve byly provedeny na nátěrovém a barvicím automatu SP1000i (TOA Sysmex). Manuální diferenciál byl analyzován jednou laborantkou na digitálním mikroskopu DM96 (Cella Vision), počet hodnocených buněk byl 200, u nátěrů starších byla analýza provedena na 100 buněk. Všechny nátěry byly také zhodnoceny stejným lékařem s použitím světelného mikroskopu Olympus BX43.

Statistická analýza

Pro analýzu stability parametrů získaných na automatickém analyzátoru XE2100 byla využita metoda analýzy rozptylu (ANOVA), která porovnává velikost středních hodnot ukazatelů. V případě statisticky významně odlišných hodnot byly testovány kontrasty mezi jednotlivými časovými úseky, vedoucí ke zjištění, v jakých časových intervalech vznikají statisticky významné rozdíly [2].

VÝSLEDKY

Stanovené parametry byly rozděleny podle podminek skladování do dvou skupin. První skupinou jsou výsledky stabilit jednotlivých parametrů vzorků uchovávaných při laboratorní teplotě, měřených do 20 minut od odběru a následně po 1, 4, 6, 8, 12, 24, 48 a 72 hodinách (tab. 2). Parametry WBC, RBC, HGB, MCH, PLT, NEUT ABS/REL, LYMF ABS/REL, BASO ABS/REL, EOZ ABS/REL, RET ABS/REL, IRF, LFR, MFR, HFR, PLT-O a IG ABS/REL lze označit jako stabilní (p-hodnota 0,216-0,999). Zkratky všech zmíněných parametrů (viz tab. 1). Výsledky měření těchto parametrů nejsou ovlivněny dobou od odběru, pokud je vzorek skladován při laboratorní teplotě a je zpracován nejpozději do 72 hodin. Mezi parametry, u kterých bylo zjištěno, že se hodnoty statisticky významně liší v časech od odběru po analýzu vzorku, patří HCT, MCV, MCHC, RDW-SD, RDW-CV, PDW, MPV, P-LCR, PCT, MONO ABS/REL, RET-He a IPF. Po zhruba 12 hodinách od odběru vzorku již nelze výsledné hodnoty těchto parametrů brát za relevantní. Parametry mikroskopicky stanoveného diferenciálního počtu leukocytů byly stabilní do 12 hodin od odběru.

Druhou skupinu tvoří výsledky stabilit parametrů vzorků skladovaných v lednici při teplotě (2–8 °C) a měřených po 24, 48 a 72 hod. od odběru vzorku (tab. 3).

Parametry WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, PLT, PCT, NEUT ABS/REL, LYMF ABS/REL, MONO ABS/REL, BASO ABS/REL, EOZ ABS/REL, RET ABS/REL, IRF, LFR, MFR, RET-He a PLT-O jsou stabilní v čase, a ani po 72 hod. od odběru nemají významně rozdílné hodnoty. Naopak parametry MCHC, RDW-SD, RDW-CV, PDW, MPV, P-LCR, HFR, IPF a IG ABS/REL vzorků skladovaných v lednici nelze považovat za stabilní.

U parametrů mikroskopicky stanoveného diferenciálního počtu leukocytů vzorků uchovaných při teplotě 2–8 °C došlo v celkovém zhodnocení ke zvýšení stability, ze získaných dat lze vyvodit, že parametry mikroskopického diferenciálního počtu leukocytů jsou stabilní při uchování v lednici maximálně do 24 hodin od odběru.

Kvalitativní hodnocení morfologie buněk

Hodnocení morfologie erytrocytů, trombocytů a leukocytů v nátěrech vzorků uchovaných při laboratorní teplotě i při teplotě 2–8 °C.

Erytrocyty

U většiny nátěrů byla pozorována změna tvaru erytrocytů v tzv. echinocyty. Echinocyty se objevují v nátěrech vzorků uchovaných jak při laboratorní teplotě, tak v menší míře i při teplotě 2–8 °C přibližně 24 hod. od odběru vzorku. Se zvyšujícím se časem se zvyšuje i množství echinocytů. V některých nátěrech vzorků uchovaných při laboratorní teplotě i vzorků uchovaných v lednici je patrný mírný sklon k tvorbě rouleaux.

Trombocyty

Objektivně nebyly v nátěrech pozorovány výrazné morfologické odlišnosti v závislosti na čase a teplotě skladování. Ojedinele jsou přítomny menší shluky trombocytů, které jsou však pozorovány pouze u vzorků skladovaných při teplotě 2–8 °C.

Leukocyty

Granulocyty

V nátěrech vzorků uchovaných při laboratorní teplotě se objevují zhruba od 48 hod. preapoptotické a apoptotické formy neutrofilů (obr. 1), je patrná i změna velikosti, neutrofilů se zmenšují, srašťují se nebo se rozpadají (obr. 2). Pro porovnání jsou uvedeny i fyziologické neutrofilní segmenty (obr. 3, 4). V nátěrech vzorků skladovaných při 2–8 °C je stejně jako při uchování vzorků při laboratorní teplotě možné vidět preapoptotické neutrofilů a také neutrofilů polorozpadlé, ojedinele se objevuje zhruba od 24–48 hod. vakuolizace cytoplazmy neutrofilů. Populaci eozinofilních a bazofilních segmentů nebylo možné objektivně zhodnotit z důvodu nízkých počtů buněk v nátěrech.

STABILITA KO A DIFERENCIÁLU LEUKOCYTŮ

Tab. 1. Přehled stanovovaných parametrů, principů stanovení na analyzátoru XE2100 (TOA Sysmex) a jednotek

Zkratka	Název metody	Metoda	Jednotka
WBC	počet leukocytů (white blood cells)	fluorescenční průtoková cytometrie	$\times 10^9/l$
RBC	počet erytrocytů (red blood cells)	impedančně	$\times 10^{12}/l$
HGB	koncentrace hemoglobinu v krvi (hemoglobin)	fotometricky	g/l
HCT	hematokrit (hematocrite)	integrace napěťových impulsů/impedančně	ratio
MCV	střední objem erytrocytu (mean cell volume)	odvozeno-výpočet (HCT/RBC) $\times 10^{15}$	fl
MCH	střední množství hemoglobinu v erytrocytu (mean corpuscular hemoglobin)	odvozeno-výpočet (HGB/RBC) $\times 10^{12}$	pg
MCHC	střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (mean corpuscular hemoglobin concentration)	odvozeno-výpočet (HGB/HCT)	g/l
PLT	počet trombocytů (platelet)	impedančně	$\times 10^9/l$
RDW-SD	šíře distribuce erytrocytů – směrodatná odchylka (red cell distribution width-standard deviation)	odvozeno – vychází z hodnot MCV	fl
RDW-CV	šíře distribuce erytrocytů – variační koeficient (red cell distribution width-coefficient of variation)	odvozeno – vychází z hodnot MCV	%
PDW	šíře distribuce trombocytů (platelet distribution width)	odvozeno – vychází z hodnot MPV	fl
MPV	střední objem trombocytu (mean platelet volume)	odvozeno – výpočet (PCT/PLT) $\times 10^3$	fl
P-LCR	poměr velkých trombocytů (platelet large cell ratio)	odvozeno – vychází z hodnot MPV	%
PCT	trombocytární hematokrit/trombokrit (plateletcrit)	integrace napěťových impulsů/impedančně	%
NEUT #	neutrofily absolutně (neutrophils count/absolute)	fluorescenční průtoková cytometrie	$\times 10^9/l$
NEUT %	neutrofily relativně (neutrophils/in percent)	fluorescenční průtoková cytometrie	%
LYMF #	lymfocyty absolutně (lymphocytes count/absolute)	fluorescenční průtoková cytometrie	$\times 10^9/l$
LYMF %	lymfocyty relativně (lymphocytes in percent)	fluorescenční průtoková cytometrie	%
MONO #	monocyty absolutně (monocytes count/absolute)	fluorescenční průtoková cytometrie	$\times 10^9/l$
MONO %	monocyty relativně (monocytes in percent)	fluorescenční průtoková cytometrie	%
BASO #	bazofily absolutně (basophils count/absolute)	fluorescenční průtoková cytometrie	$\times 10^9/l$
BASO %	bazofily relativně (basophils in percent)	fluorescenční průtoková cytometrie	%
EOZ #	eozinofily absolutně (eosinophils count/absolute)	fluorescenční průtoková cytometrie	$\times 10^9/l$
EOZ %	eozinofily relativně (eosinophils in percent)	fluorescenční průtoková cytometrie	%
RET #	retikulocyty absolutně (reticulocytes count/absolute)	fluorescenční průtoková cytometrie	$\times 10^{12}/l$
RET %	retikulocyty relativně (reticulocytes in percent)	fluorescenční průtoková cytometrie	%
IRF	nezralá frakce retikulocytů (immature reticulocyte fraction)	odvozeno – výpočet (MFR + HFR)	%
LFR	nízký poměr fluorescence (low fluorescence ration)	fluorescenční průtoková cytometrie	%
MFR	střední poměr fluorescence (medium fluorescence ratio)	fluorescenční průtoková cytometrie	%
HFR	vysoký poměr fluorescence (high fluorescence ratio)	fluorescenční průtoková cytometrie	%
RET-He	obsah hemoglobinu v retikulocytech (reticulocyte hemoglobin equivalent)	fluorescenční průtoková cytometrie	g/l
PLT-O	opticky stanovený počet trombocytů (platelet – optical)	fluorescenční průtoková cytometrie	$\times 10^9/l$
IPF	frakce nezralých trombocytů (immature platelet fiction)	fluorescenční průtoková cytometrie	%
IG #	nezralé formy granulocytů absolutně (immature granulocytes/absolute)	fluorescenční průtoková cytometrie	$\times 10^9/l$
IG %	nezralé formy granulocytů relativně (immature granulocytes in percent)	fluorescenční průtoková cytometrie	%

Tab. 2. Stabilita parametrů vzorků uchovávaných při laboratorní teplotě po dobu 72 hodin

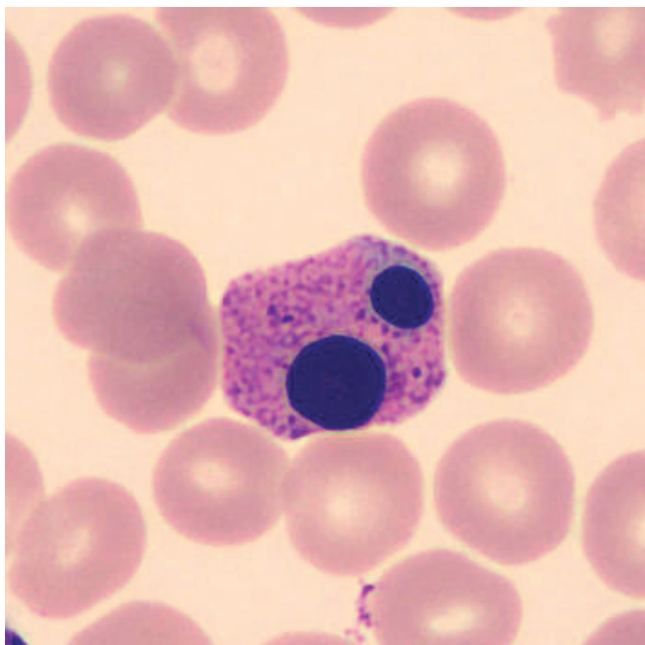
Laboratorní teplota (18–25 °C)						
Zkratka	p-hodnota	Vývoj hodnot v čase	Medián	Maximum	Minimum	n
WBC	0,99	bez vývoje	7,06	10,25	4,51	180
RBC	0,99	bez vývoje	4,69	5,86	3,80	180
HGB	0,99	bez vývoje	139,00	181,00	115,00	180
HCT	< 0,01	rostoucí	0,43	0,60	0,34	180
MCV	< 0,01	rostoucí	91,75	121,30	82,50	180
MCH	0,99	bez vývoje	30,10	32,60	28,00	180
MCHC	< 0,01	klesající	329,00	353,00	266,00	180
PLT	0,83	bez vývoje	263,00	444,00	168,00	180
RDW-SD	< 0,01	rostoucí	44,80	67,90	38,80	179
RDW-CV	< 0,01	rostoucí	13,50	16,90	12,10	179
PDW	< 0,01	rostoucí	12,90	20,30	9,80	180
MPV	< 0,01	rostoucí	11,00	14,70	9,30	180
P-LCR	< 0,01	rostoucí	33,35	64,80	18,70	180
PCT	< 0,01	rostoucí	0,29	0,54	0,17	180
NEUT ABS	0,99	bez vývoje	3,10	6,30	1,87	180
NEUT REL	0,75	bez vývoje	50,20	71,60	35,90	179
LYMF ABS	0,99	bez vývoje	2,34	4,26	1,04	179
LYMF REL	0,99	bez vývoje	37,20	52,90	19,90	179
MONO ABS	< 0,01	klesající	0,50	0,96	0,15	180
MONO REL	< 0,01	klesající	8,25	12,70	2,60	180
BASO ABS	0,98	bez vývoje	0,03	0,07	0,01	180
BASO REL	0,99	bez vývoje	0,40	1,10	0,10	180
EOZ ABS	0,98	bez vývoje	0,17	0,46	0,00	180
EOZ REL	0,92	bez vývoje	2,90	9,40	0,00	180
RET ABS	0,94	bez vývoje	0,04	0,09	0,02	180
RET REL	0,96	bez vývoje	0,82	1,78	0,37	180
IRF	0,96	bez vývoje	4,85	17,30	0,50	180
LFR	0,96	bez vývoje	95,15	99,50	82,70	180
MFR	0,96	bez vývoje	4,65	16,00	0,00	180
HFR	0,89	bez vývoje	0,40	2,90	0,00	180
RET-He	0,01	klesající	35,70	38,90	32,00	180
PLT-O	0,87	bez vývoje	249,00	399,00	170,00	179
IPF	< 0,01	rostoucí	2,90	11,40	1,20	180
IG ABS	0,27	bez vývoje	0,02	0,06	0,00	179
IG REL	0,22	bez vývoje	0,20	0,80	0,00	179
Mikroskopicky stanovený diferenciální počet leukocytů			Medián	Maximum	Minimum	n
Neutrofilní segmenty		klesající	44,25	70,5	1	128
Neutrofilní tyče		bez vývoje	1	5	0	128
Eozinofily		klesající	2	8,5	0	128
Bazofily		rostoucí	0,5	7	0	128
Monocyty		↑↓	6	14	0	128
Lymfocyty		rostoucí	42,75	92	19	128
LGL		bez vývoje	0,5	11	0	128
Holé jaderné stíny		rostoucí	10,25	266	0	128
Apoptotické buňky		rostoucí	0,5	18	0	121

abs. – absolutně, relat. – relativně, ↑↓ trend nejprve rostoucí, následně klesající, n – počet analýz

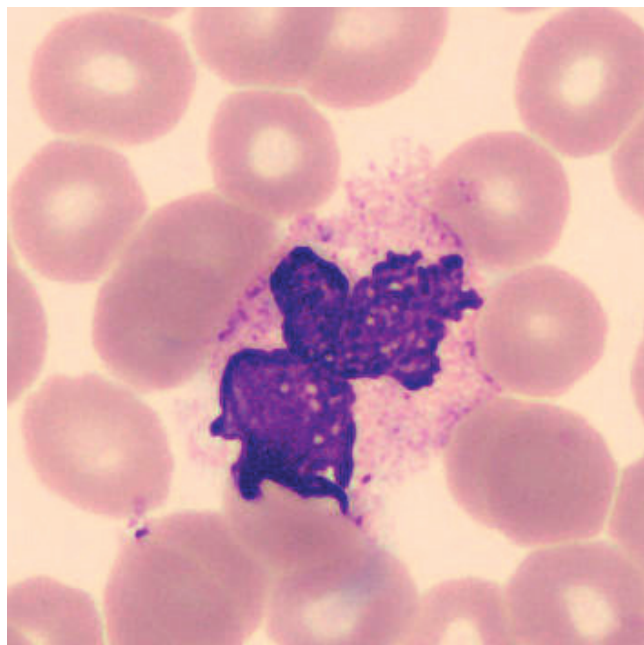
Tab. 3. Stabilita parametrů vzorků uchovávaných při teplotě (2–8 °C) po dobu 72 hodin

Uloženo v lednici (2–8 °C)						
Zkratka	p-hodnota	Vývoj hodnot v čase	Medián	Maximum	Minimum	n
WBC	0,99	bez vývoje	6,96	10,43	4,54	180
RBC	0,99	bez vývoje	4,70	5,78	3,80	180
HGB	0,99	bez vývoje	139,00	178,00	114,00	180
HCT	0,98	bez vývoje	0,42	0,54	0,34	180
MCV	0,12	bez vývoje	90,40	110,30	82,50	180
MCH	0,99	bez vývoje	30,10	32,00	27,90	180
MCHC	< 0,01	klesající	333,00	353,00	268,00	180
PLT	0,78	bez vývoje	253,50	406,00	157,00	180
RDW-SD	< 0,01	↑↓	42,60	54,40	38,80	179
RDW-CV	< 0,01	↑↓	13,00	15,40	11,90	179
PDW	0,01	bez vývoje	12,70	23,50	9,80	180
MPV	< 0,01	rostoucí	10,90	14,90	9,30	180
P-LCR	< 0,01	rostoucí	31,90	64,80	18,70	180
PCT	0,09	bez vývoje	0,28	0,44	0,17	180
NEUT ABS	0,99	bez vývoje	3,18	6,63	1,87	180
NEUT REL	0,96	bez vývoje	49,90	66,50	35,90	180
LYMF ABS	0,97	bez vývoje	2,36	4,26	0,92	180
LYMF REL	0,98	bez vývoje	37,45	52,90	19,30	180
MONO ABS	0,99	bez vývoje	0,55	0,99	0,33	180
MONO REL	0,98	bez vývoje	8,60	13,10	5,40	180
BASO ABS	0,87	bez vývoje	0,03	0,07	0,01	180
BASO REL	0,98	bez vývoje	0,40	1,00	0,10	180
EOZ ABS	0,99	bez vývoje	0,18	0,49	0,00	180
EOZ REL	0,99	bez vývoje	2,90	9,40	0,00	180
RET ABS	0,99	bez vývoje	0,04	0,09	0,02	179
RET REL	0,99	bez vývoje	0,84	1,78	0,45	179
IRF	0,06	bez vývoje	5,70	19,90	0,50	179
LFR	0,06	bez vývoje	94,30	99,50	80,10	179
MFR	0,10	bez vývoje	5,10	15,40	0,00	179
HFR	0,01	↓↑	0,50	4,50	0,00	179
RET-He	0,97	bez vývoje	35,90	38,90	31,50	179
PLT-O	0,98	bez vývoje	252,00	399,00	167,00	178
IPF	< 0,01	↓↑	2,90	14,10	1,20	179
IG ABS	< 0,01	rostoucí	0,01	0,35	0,00	180
IG REL	< 0,01	rostoucí	0,20	4,20	0,00	180
Mikroskopicky stanovený diferenciální počet leukocytů			Medián	Maximum	Minimum	n
Neutrofilní segmenty	< 0,01	klesající	47,5	70,5	11	128
Neutrofilní tyče	< 0,06	rostoucí	1	11	0	128
Eozinofily	< 0,01	klesající	1,5	9	0	127
Bazofily	0,04	bez vývoje	0,5	5	0	128
Monocyty	< 0,01	klesající	5	11	0	128
Lymfocyty	< 0,01	rostoucí	39,25	86	19	128
LGL	0,25	bez vývoje	0,5	11	0	128
Holé jaderné stíny	< 0,01	rostoucí	9,5	237	0	128
Apoptotické buňky	< 0,01	rostoucí	0	9	0	120

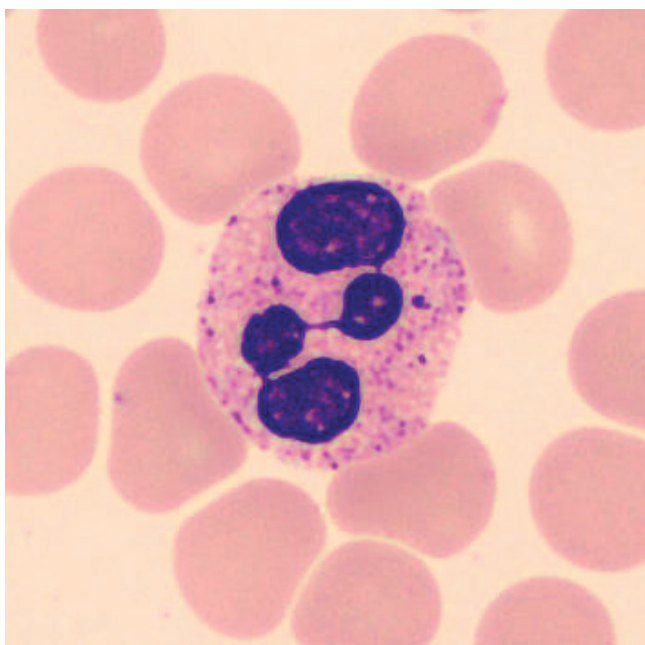
abs. – absolutně, relat. – relativně, ↑↓ trend nejprve rostoucí, následně klesající, ↓↑ trend nejprve klesající, následně rostoucí, n – počet analýz



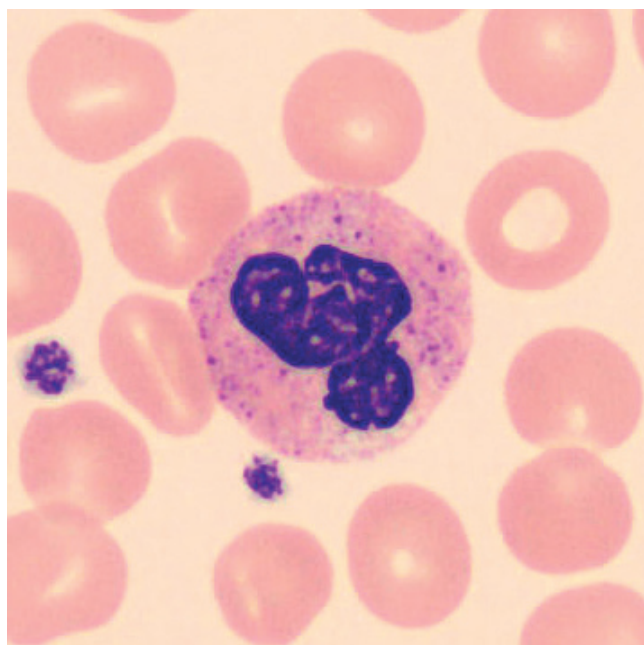
Obr. 1. Apoptotická forma neutrofilního segmentu (24 hodin po odběru, laboratorní teplota)



Obr. 2. Rozpadající se neutrofilní segment (24 hodin po odběru, laboratorní teplota)



Obr. 3. Neutrofilní segment (20 minut po odběru, laboratorní teplota)

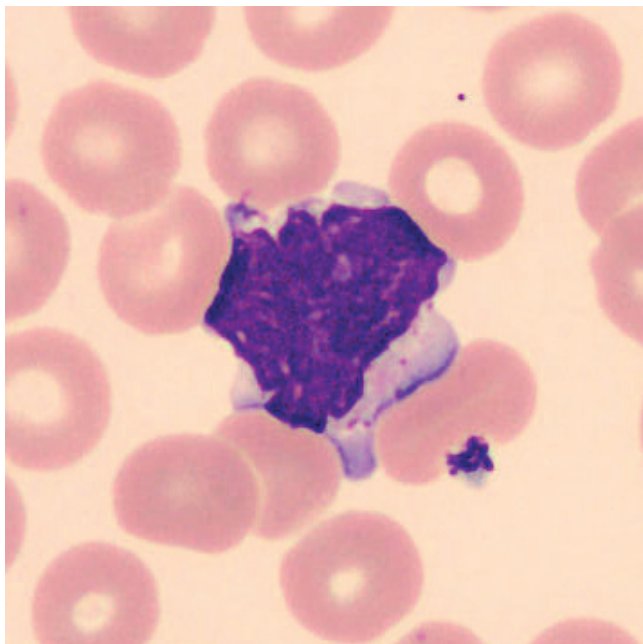


Obr. 4. Neutrofilní segment (6 hodin po odběru, laboratorní teplota)

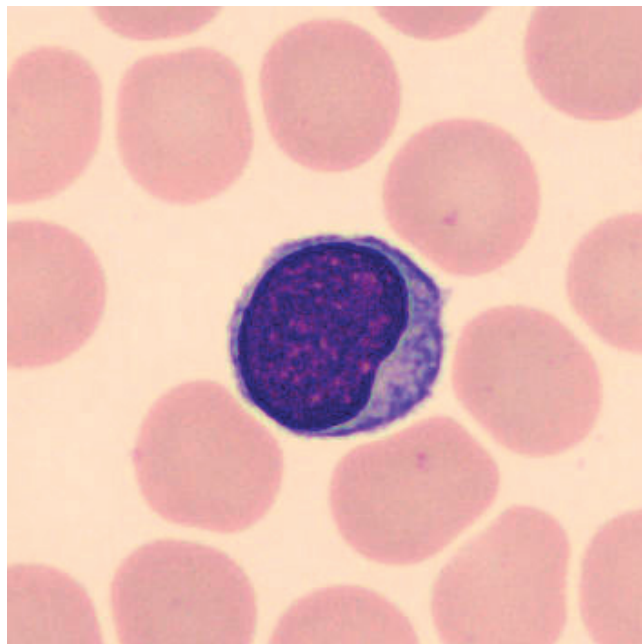
Lymfocyty

V nátěrech vzorků uložených při laboratorní teplotě se zhruba po 24 hod. velikost lymfocytů snižuje, blíží se velikosti erytrocytů, svrašťují se, v jiných nátěrech vzorků skladovaných při laboratorní teplotě dochází

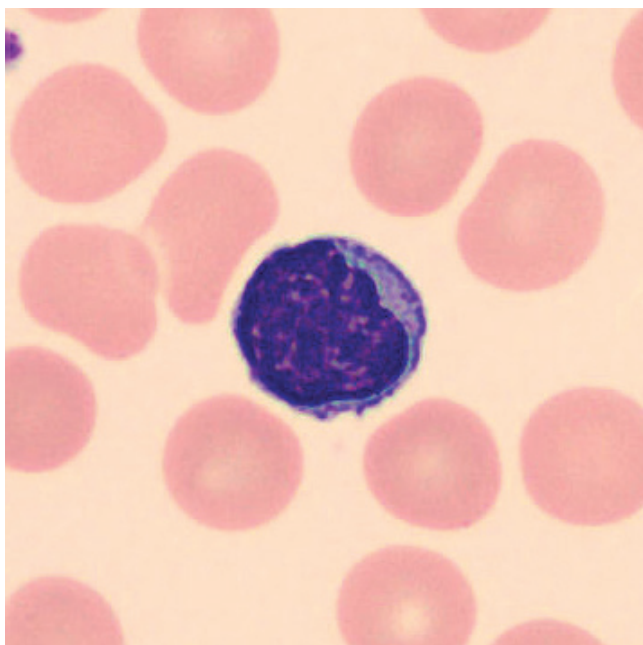
k lobulizaci jader (obr. 5), fyziologické lymfocyty (obr. 6, 7). V nátěrech vzorků uchovaných při teplotě 2–8 °C je po 24 hod. také patrná lobulizace jader lymfocytů a velikost lymfocytů se zmenšuje, svrašťují se, ojediněle se objevuje i vakuolizace plazmy lymfocytů.



Obr. 5. Lymfocyt (24 hodin po odběru, laboratorní teplota)



Obr. 6. Lymfocyt (20 minut po odběru, laboratorní teplota)



Obr. 7. Lymfocyt (6 hodin po odběru, laboratorní teplota)

Monocyty

U vzorků uchovávaných při laboratorní teplotě byly pozorovány po 24 hod. od odběru monocyty s výraznější vakuolizací (obr. 8), v některých nátěrech byly monocyty svaštělé a měly abnormálně výrazně lobuli-

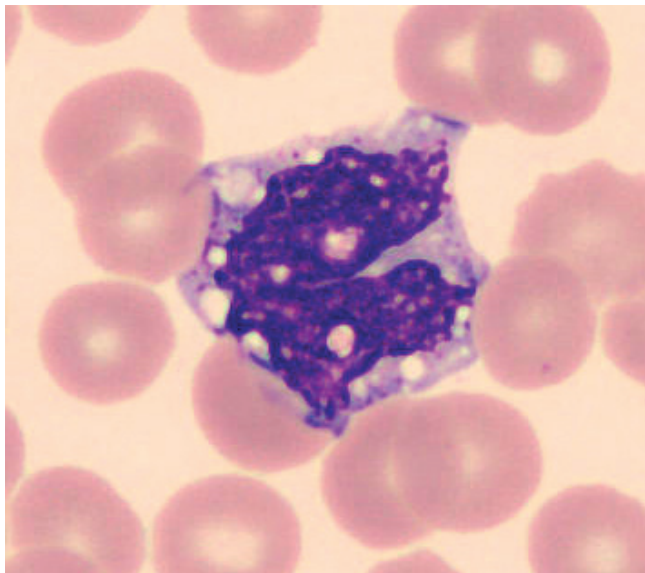
zovaná jádra, zhruba po 48 hod. je možné ještě častěji pozorovat v nátěrech menší monocyty. Ojedinele byly u vzorků uchovaných při teplotě 2–8 °C cca od 24 hod. pozorovány protruze jaderné hmoty monocytů. Pro porovnání jsou uvedeny i fyziologické monocyty (obr. 9, 10).

DISKUSE A ZÁVĚR

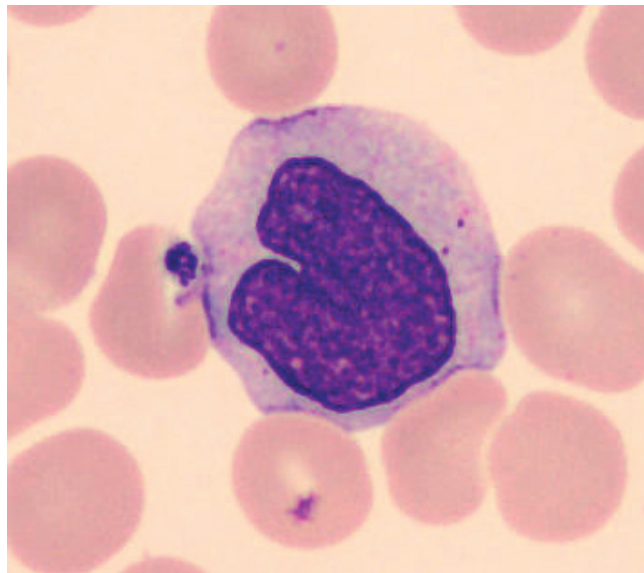
Podle našich výsledků získaných z normálních vzorků periferní krve od zdravých dobrovolníků se základní parametry krevního obrazu WBC, RBC, HGB, PLT s časem měření a teplotou skladování (18–25 °C i 2 až 8 °C) statisticky až po dobu 72 hod. významně nemění, což je ve shodě s publikovanými pracemi [3–7]. Pouze v jedné studii Imeri et al. [6] byl počet WBC stabilní při uchování při laboratorní teplotě jen po dobu 24 hod.

Dalším parametrem základního krevního obrazu, který je možné označit jako nezávislý na čase měření a teplotě skladování je MCH. Výsledky se statisticky významně nemění, nicméně při skladování vzorku v lednici je parametr MCH stabilnější, což ukazuje i práce Oddoze et al. [4].

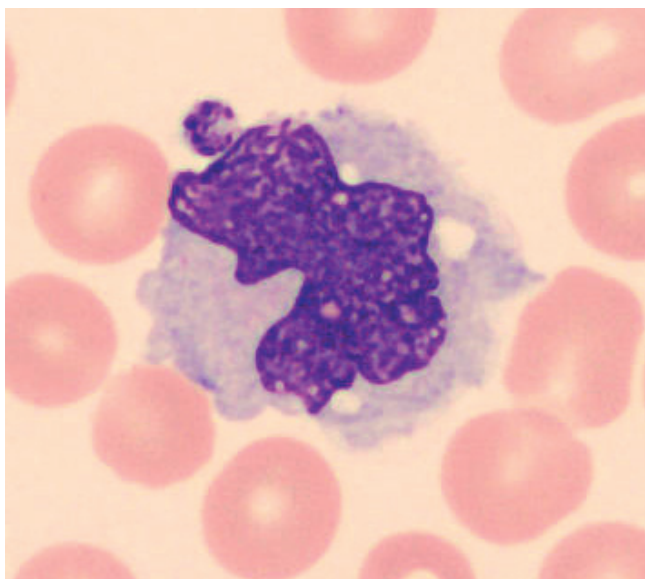
Další parametry vzorků uchovaných při laboratorní teplotě (HCT, MCV, MCHC, RDW-SD, RDW-CV, PDW, MPV, P-LCR, PCT) se statisticky významně lišily podle času zpracování vzorku. Parametry MCV, MCHC, RDW-SD a RDW-CV měřené ihned po odběru a 24 hod. po odběru se statisticky významně lišily, stejně jako



Obr. 8. Monocyt (24 hodin po odběru, laboratorní teplota)



Obr. 9. Monocyt (20 minut po odběru, laboratorní teplota)



Obr. 10. Monocyt (6 hodin po odběru, laboratorní teplota)

uvádí Lippi et al. [8]. Po 48 hodinách od odběru vzorku byly významně odlišné parametry HCT, PDW, MPV, P-LCR a PCT. Podle našich výsledků jsou parametry HCT a MPV stabilnější, než uvádí citovaná studie [8], ve které byly pozorovány významné změny již po 24 hod. Naopak Lombardi et al. [7] ukázali podobnou stabilitu parametrů MCV a HCT jako v našem souboru. Navíc se v naší práci stabilita parametrů HCT a MCV výrazně zvýšila u vzorků uchovávaných při teplotě 2–8 °C. Výsledky parametrů MCHC, RDW-SD, RDW-CV, PDW,

MPV nejsou při uchovávání vzorků v lednici stabilní. U parametrů automaticky stanoveného diferenciálního počtu leukocytů (neutrofily absolutně/relativně, lymfocyty absolutně/relativně, eozinofily absolutně/relativně, bazofily absolutně/relativně) nebylo prokázáno, že by byly parametry statisticky významně ovlivněny časem měření a teplotou skladování po celou dobu sledování. Shodné výsledky uvádí Lippi et al. [8], naopak další práce [6] označuje parametry eozinofily a lymfocyty jako nestabilní v čase. Podle naší studie se parametr monocyty absolutně/relativně statisticky významně liší v čase od odběru vzorku po jeho zpracování při skladování za laboratorní teploty, naopak při uchování za teploty 2–8 °C se parametr monocyty absolutně/relativně jeví jako stabilní v čase.

U ostatních parametrů (RET absolutně/relativně, IRF, LFR, MFR, HFR, PLT-O a IC absolutně/relativně) nebylo prokázáno, že by se hodnoty parametrů statisticky významně lišily v čase při laboratorní teplotě, a to až po dobu 72 hodin od odběru. Parametry RET-He a IPF se statisticky významně liší v čase od odběru vzorku po jeho zpracování při uchování vzorku za laboratorní teploty.

Pokud jsou vzorky uchovávány v lednici a změřeny po 24, 48 a 72 hodinách, je u většiny parametrů patrné zvýšení stability, nicméně u parametrů PLT, lymfocyty absolutně/relativně, bazofily absolutně/relativně a u IRF, LFR, MFR, HFR, IC absolutně/relativně naopak došlo k snížení stability vzorků.

Na základě našich výsledků lze tvrdit, že parametry mikroskopicky stanoveného diferenciálního počtu leukocytů nejsou stabilní déle než 12 hod. od provedeního

odběru. Z kvalitativního hodnocení změn v morfologii erytrocytů vyplývá, že s přibývajícím časem od odběru vzorků se mění erytrocyty v echinocyty [9]. V našich výsledcích bylo u vzorků uchovaných při teplotě 2–8 °C echinocytů v nátěrech přítomno méně. V morfologii trombocytů nebyly pozorovány výrazné změny v závislosti na čase odběru vzorku, pouze u vzorků skladovaných při teplotě 2–8 °C byly ojediněle pozorovány shluky trombocytů.

Morfologický popis změn leukocytů se převážně shoduje jak u vzorků uchovávaných při laboratorní teplotě, tak u vzorků uchovávaných v lednici.

Naše práce ukázala, že validní výsledky většiny základních i rozšířených parametrů krevního obrazu a diferenciálního počtu leukocytů lze získat až 12 hod. od odběru vzorku, a to bez ohledu na teplotu skladování. Některé nejdůležitější klinické parametry (např. WBC, HGB, PLT, RET a další) byly stabilní až 72 hod. od odběru. V případě mikroskopického hodnocení diferenciálního počtu leukocytů i morfologie leukocytů, erytrocytů a trombocytů docházelo k významným změnám po 12 hod. od odběru vzorku.

Ke změnám v některých parametrech KO a diferenciálního počtu leukocytů ale docházelo již v kratším čase od odběru. Je proto jistě opodstatněné a důležité se řídit doporučením České hematologické společnosti ČLS JEP, které stanoví stabilitu KO a diferenciálního počtu leukocytů na 5 hod. při teplotě 15–25 °C.

Nicméně v běžné klinické a laboratorní praxi může výjimečně nastat situace, kdy je z vážných důvodů nezbytné vyšetřit KO či provést nátěr k mikroskopickému hodnocení ze staršího vzorku (klinicky závažná situace při nemožnosti odběru nového vzorku, forenzní důvody apod.). V tom případě je pro laboratorního i klinického pracovníka důležité vědět, k jakým změnám může v průběhu času docházet.

LITERATURA

1. <http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni_sekce/k_cinnostem.php>9.12.2015 Hrachovinová I, Charvát J, Pecka M. Doporučení ČHS ČSL JEP ke stabilitě a k transportu primárních vzorků biologického materiálu do hematologické laboratoře. 2012.
2. Karpíšek Z. Kvantitativní metody v řízení (Quantitative methods in management). Brno: Akademie Sting, 2007.
3. Vogelaar SA, Posthuma D, Boomsma D, Kluft C. Blood sample stability at room temperature for counting red and white blood cells and platelets. Vasc Pharmacol 2002; 39: 123–125.
4. Oddo Ch, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. Clin Biochem 2012; 45: 464–469.

5. Zini G and International Council for Standardization in Haematology (ICSH). Stability of complete blood count parameters with storage: toward defined specifications for different diagnostic applications. Int J Lab Hematol 2014; 36: 111–113.
6. Imeri F, Herklotz R, Rish L, et al. Stability of hematological analytes depends on the hematology analyser used: A stability study with Bayer Advia 120, Beckman Coulter LH 750 and Sysmex XE 2100. Clin Chimica Acta 2008; 397: 68–71.
7. Lombardi G, Lanteri P, Colombini A, Lippi G, Banfi G. Stability of hematological parameters and its relevance on the athletes biological passport model. Sports Med 2011; 41: 1033–1042.
8. Lippi G, Salvagno GL, Solero GP, Franchini M, Guidi GC. Stability of blood cell counts, hematologic parameters and reticulocytes indexes on the Advia A120 hematologic analyzer. J Lab Clin Med 2005; 146: 333–340.
9. Bain BJ. Blood cells: a practical guide. 4. vyd. Oxford, Blackwell Publishing, 2006; 476 s.

Podíl autorů na rukopisu

- EB – příprava studie, organizace sběru dat, zpracování rukopisu
 PK – morfologické zpracování studie, připomínkování a kontrola rukopisu
 MO – příprava studie, organizace sběru dat
 OB – statistické zpracování
 PS – morfologické zpracování studie
 MŠ – návrh studie, připomínkování a kontrola rukopisu

Poděkování

Podpořeno projektem OPVK CZ.2.16/3.1.00/24012.

Prohlášení o konfliktu zájmů

Eva Babuňková prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i spoluautorů Petry Kačírkové, Miroslavy Oupické, Ondřeje Babuňky, Petry Salačové a Martina Špačka.

Doručeno do redakce dne 11. 4. 2016.

Přijato po recenzi dne 21. 9. 2016.

RNDr. Eva Babuňková

Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
 Centrální hematologické laboratoře ÚLBD
 U Nemocnice 2
 128 08 Praha 2
 e-mail: Eva.Babunkova@vfn.cz