

Základní hematologická vyšetření

Ústav patologické fyziologie
1.LF UK

Co vyšetřujeme?

1. Krev
2. Kostní dřeň
 - aspirační punkce
 - trepanobiopsie
3. Lymfatické uzliny - extirpace

Přehled metod

1. **FW**
2. **Krevní obraz**
3. **Koagulace**
4. Cytochemie
5. Vyšetření metabolismu Fe
6. Vyšetření metabolismu HGB
7. Immunologie
8. Průtoková cytometrie
9. Cytogenetika a molekulární biologie

Sedimentace erytrocytů (FW)

- Rychlost sedimentace závisí na **tvorbě agregátů erytrocytů – penízkovatění** (suspensní stabilitě)



- **Zrychlení** – fibrinogen, imunoglobuliny, CRP a jiné proteiny akutní fáze, anémie
- **Zpomalení** – albumin, polycytémie
- Metoda Fahreus-Westergrenova (**FW**)
- **Norma:** 2-5 mm/h u mužů
3-8 mm/h u žen (↓ ery, ↑ fibrinogen)
- Nespecifické vyšetření – screening, sledování průběhu (dynamiky) nemoci

Krevní obraz (KO)

kvantitativní vyšetření

- Hemoglobin (HGB)
- Hematokrit (HCT)
- Počet erytrocytů (RBC)
- Objem RBC (MCV)
- Množství HGB v RBC (MCH)
- Koncentrace HGB v RBC (MCHC)
- Distribuční šíře RBC (RDW)
- Retikulocyty (ret)

- Počet trombocytů (PLT)
- Distribuční šíře PLT (PDW)
- Objem PLT (MPV)
- Počet leukocytů (WBC)
- Diferenciální rozpočet WBC
 - segmenty a tyče
 - eozinofily
 - bazofily
 - monocyty
 - lymfocyty

kvalitativní vyšetření

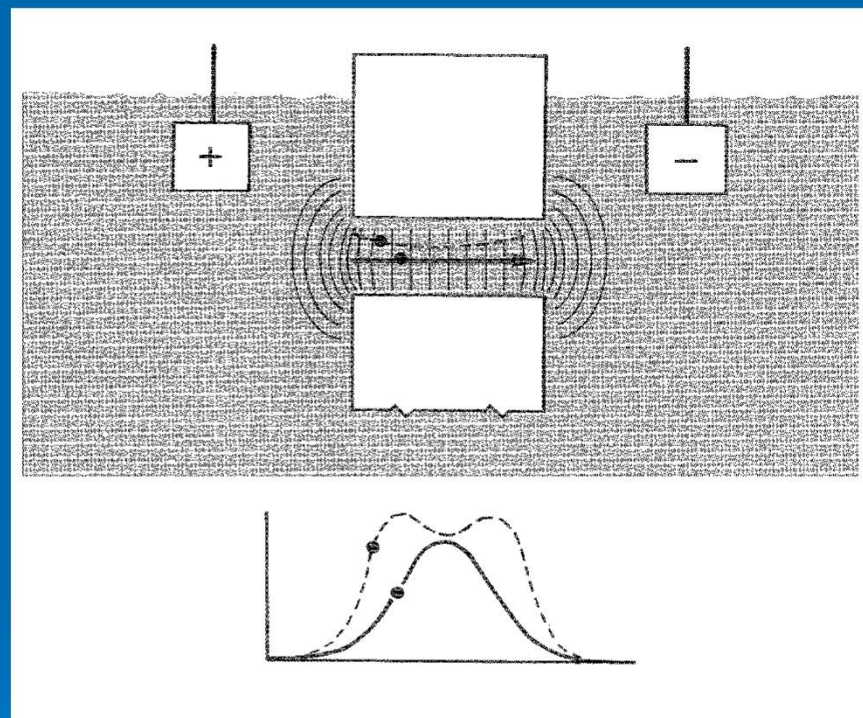
➤ Automatické stanovení hematologickými analyzátory



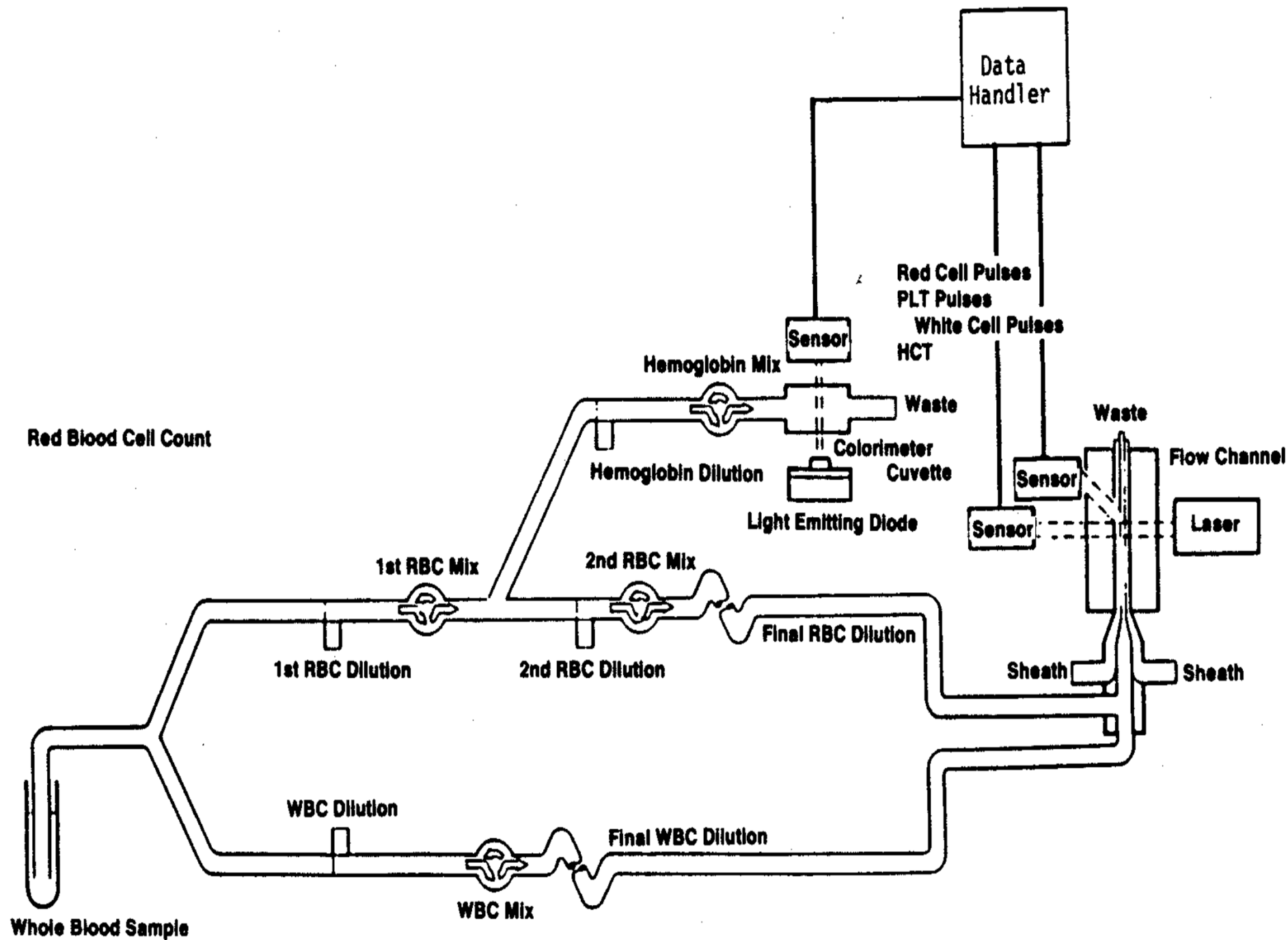
Jak funguje analyzátor ?

- **impedanční** – při průchodu částice mezi elektrodami vzroste impedance

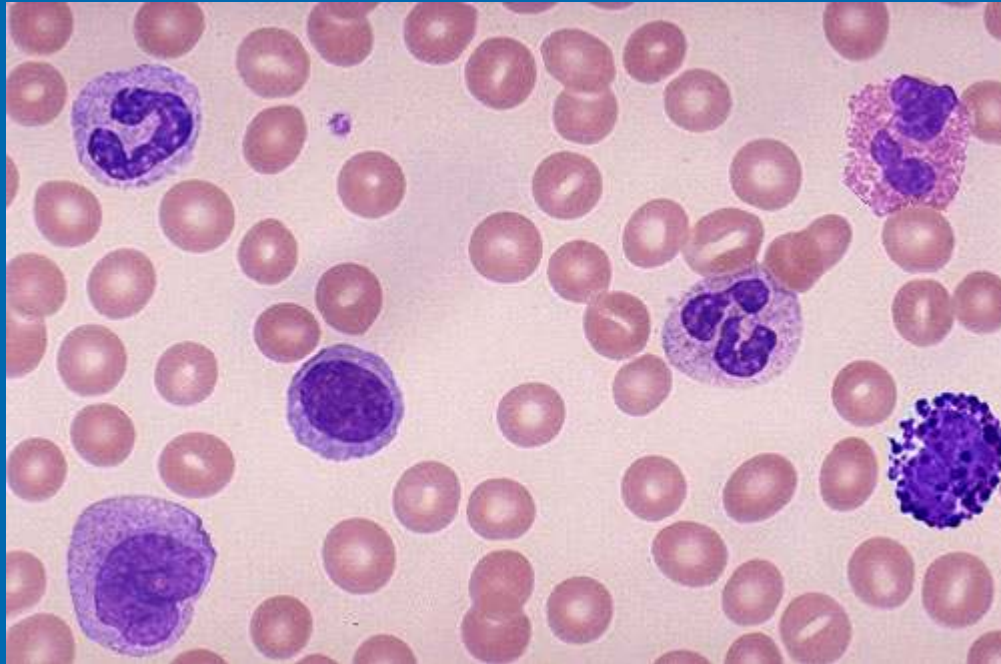
- počet impulzů = počet částic
- amplituda = objem částice



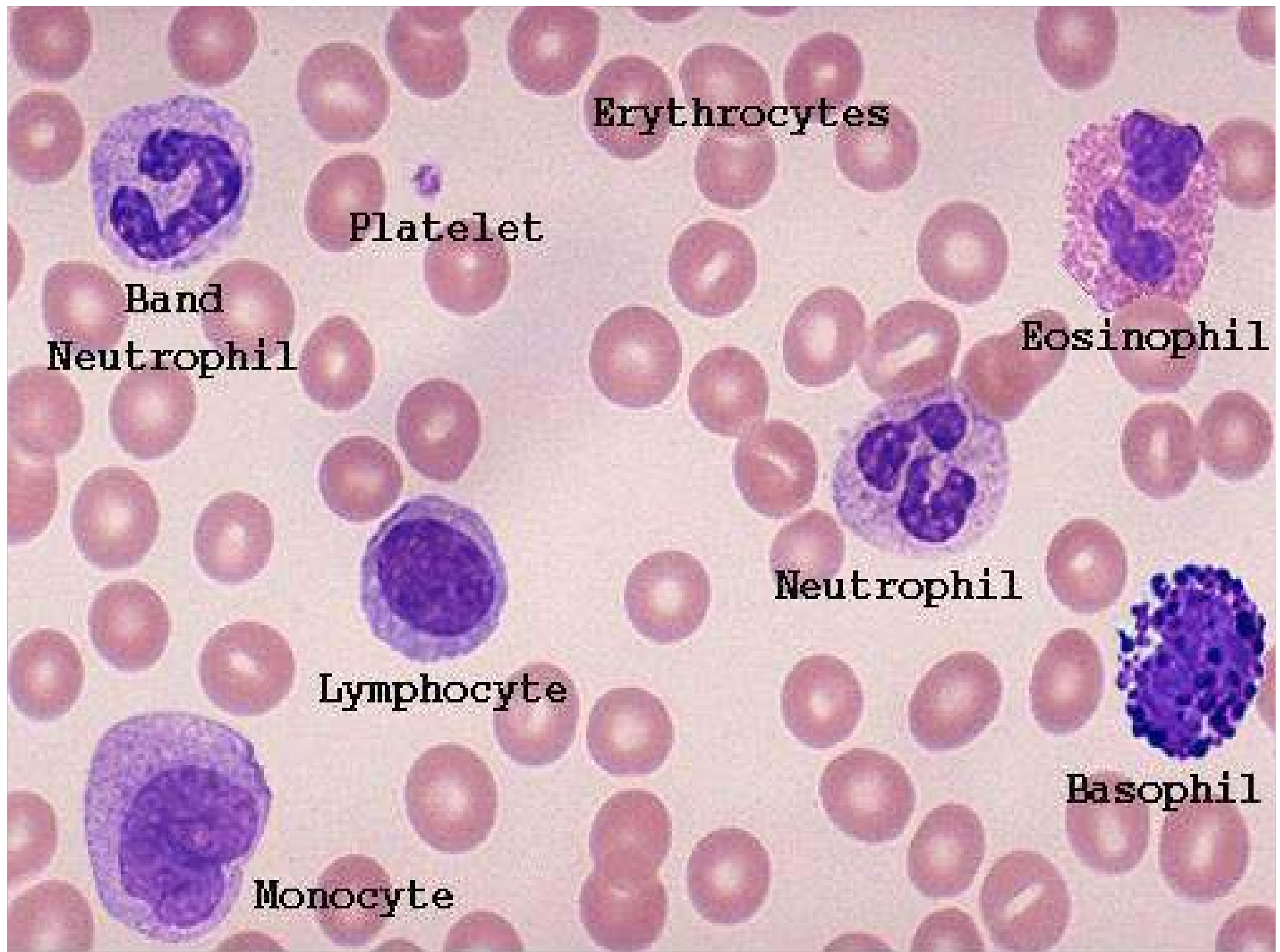
- **optické** – při průchodu částice přes fokusovaný světelný paprsek dojde k rozptylu světla

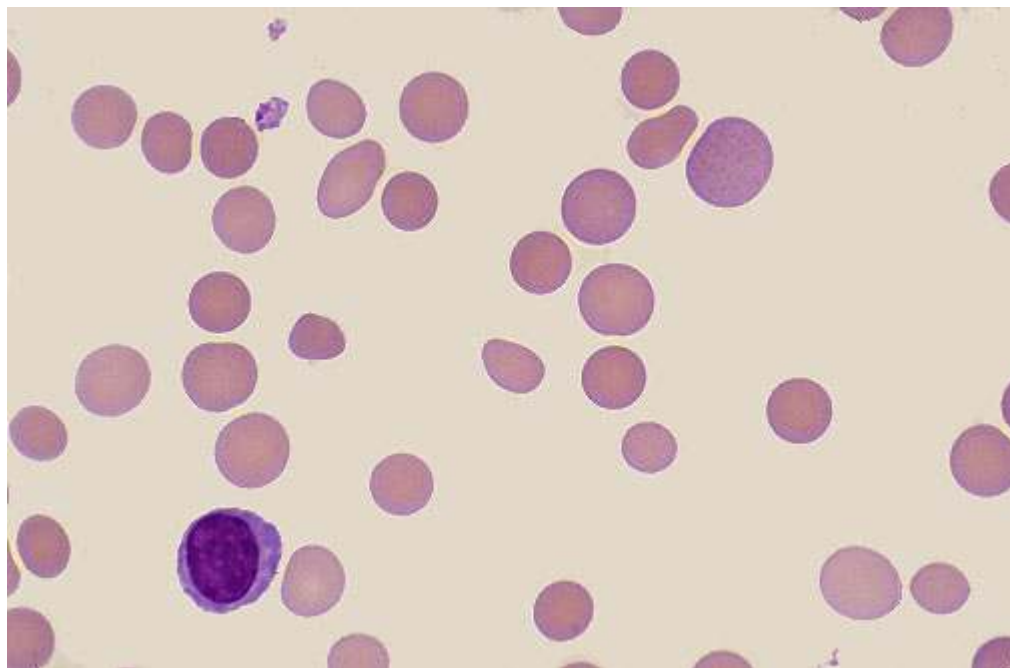


➤ Klasický krevní nátěr



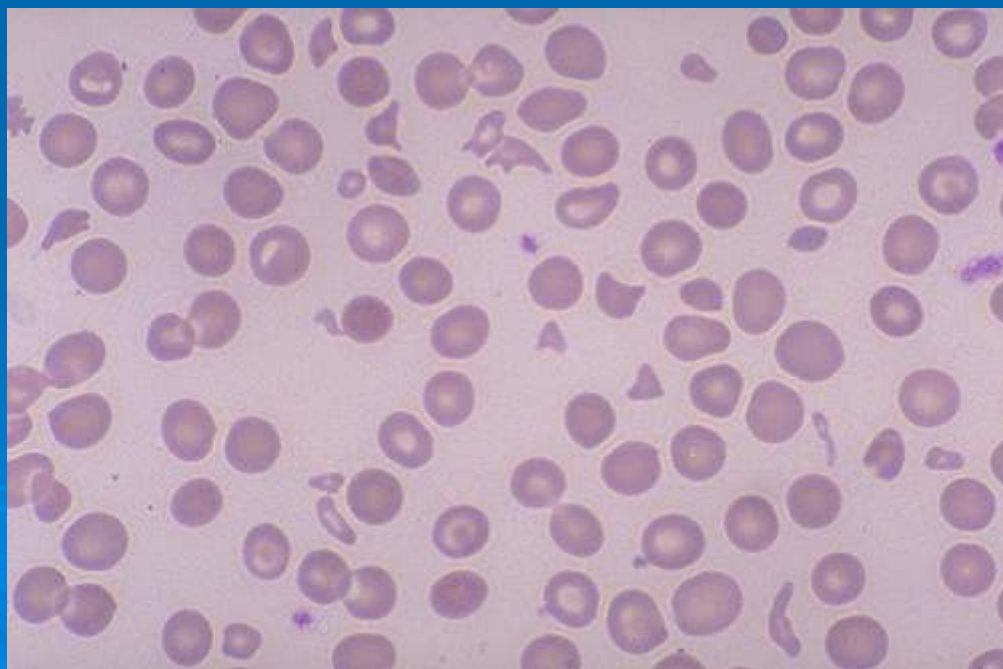
- při patologickém nálezu na analyzátoru
- zhodnocení morfologie buněk





← sférocity

schistocity →



Hemoglobin

- Stanovení spektrofotometricky po hemolýze erytrocytů a přeměně na hemiglobinkyanid
- **Normální hodnoty**
ženy: 120 – 160 g/l
muži: 130 – 175 g/l
- **Zvýšení:** polycytémie, dehydratace
- **Snížení:** anémie, hyperhydratace

Hematokrit

- HCT udává **procentuelní zastoupení** erytrocytů v **objemové jednotce** krve
(analyzátor vypočítá HCT z RBC a MCV)

- **Normální hodnoty**

ženy: 0,35 – 0,46 35 - 46 %

muži: 0,40 – 0,50 40 – 50 %

- **Zvýšení:** polycytémie, dehydratace

- **Snížení:** anémie, hyperhydratace

Počet erytrocytů

- udáván v množství $\times 10^{12}/l$ nebo $\times 10^6/\mu l$
- **Normální hodnoty**
ženy: $3,8 - 5,2 \times 10^{12}/l$
muži: $4,2 - 5,8 \times 10^{12}/l$
- **Zvýšení:** polycytémie, dehydratace
- **Snížení:** anémie, hyperhydratace

MCV – mean cell (corpuscular) volume

➤ **Výpočet:**

$$MCV = \frac{\text{hematocrit}}{\text{poč_ery.}}$$

- určen přímo analyzátozem !

➤ **Normální hodnota:** 80 – 99 fl

- **Rozlišení** - normocyty
- mikrocyty
- makrocyty

MCH – mean cell (corpuscular) hemoglobin

➤ **Výpočet:**

$$MCH = \frac{\text{hemoglobin}[g/l]}{\text{poč}_{ery}[l^{-1}]}.$$

➤ **Normální hodnota:** 27 – 33 pg

- **Rozlišení** - normochromní RBC (normo nebo makrocyty)
- hypochromní RBC (většinou mikrocyty)

MCHC – mean cell (corpuscular) hemoglobin concentration

➤ **Výpočet:**

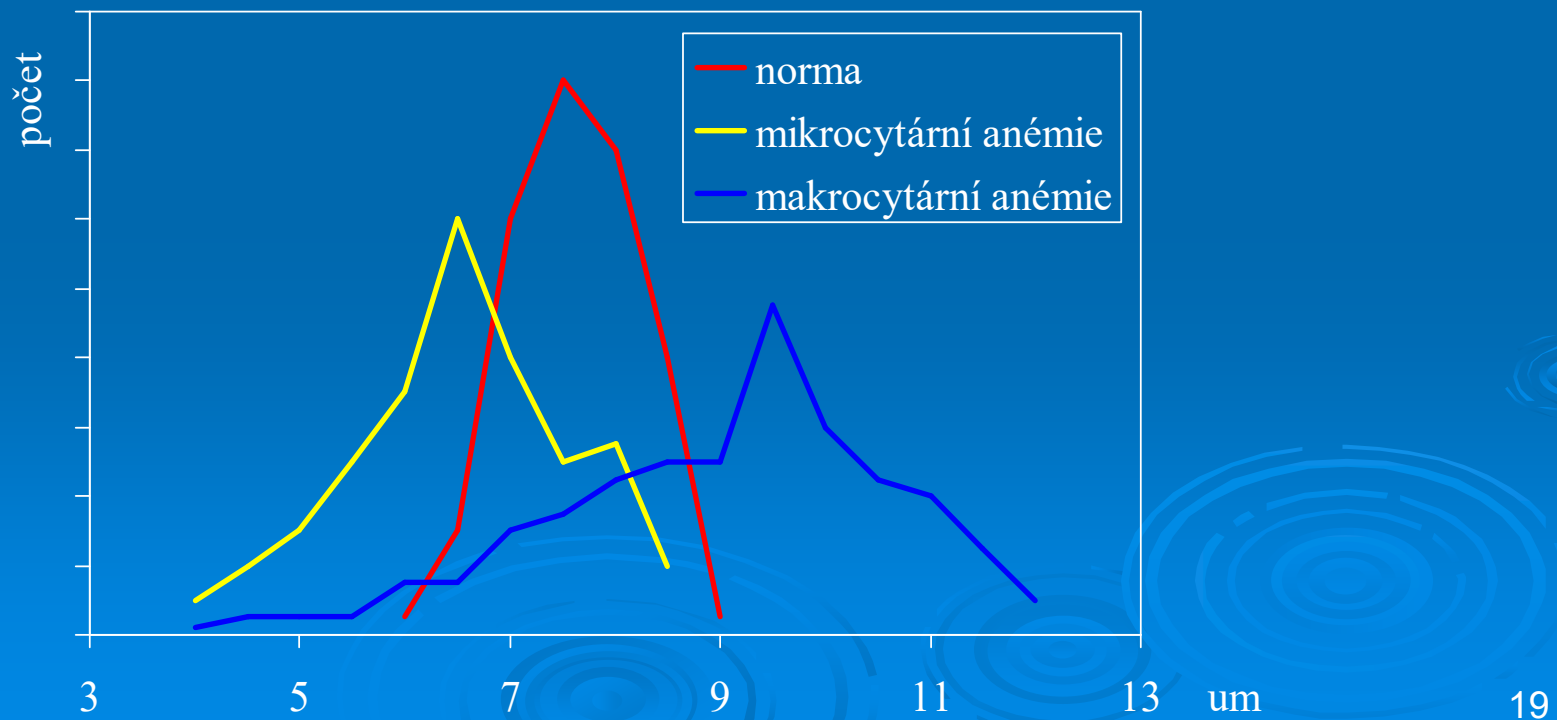
$$MCHC = \frac{\text{hemoglobin}[\text{g} / \text{l}]}{\text{hematorcit}}$$

➤ **Normální hodnota:** 33 - 37 %

➤ Hodnocení obdobné jako u MCH

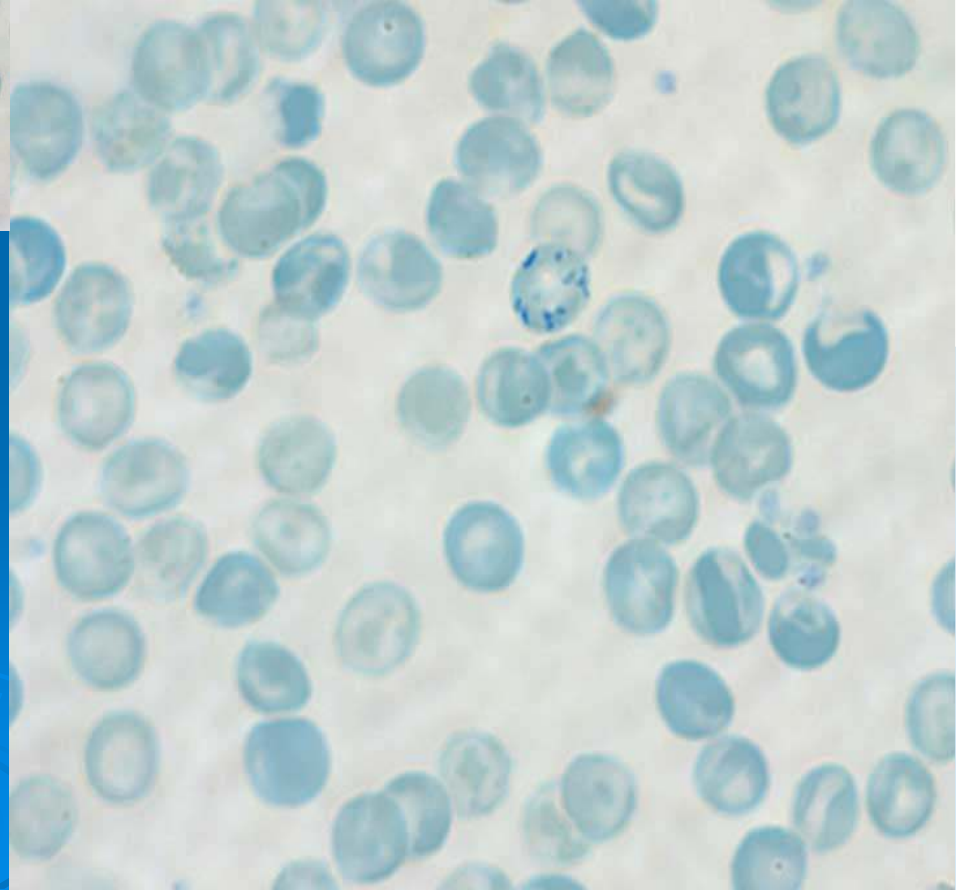
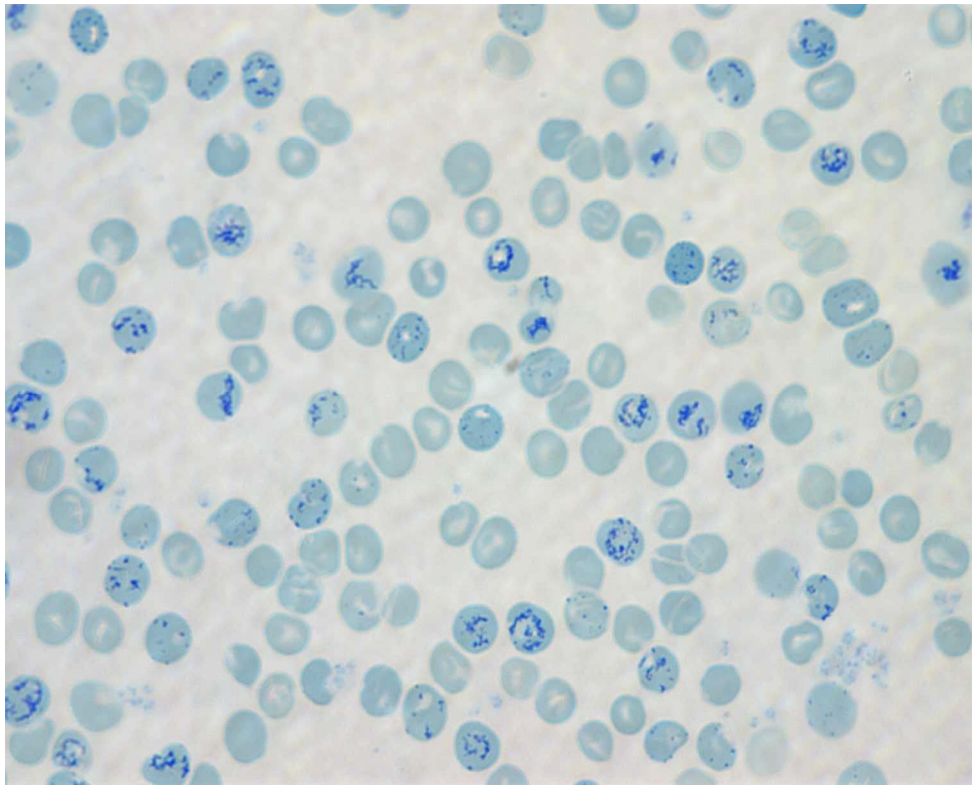
RDW – red cell distribution width

- Analyzátor vytvoří v paměti Priceovu-Jonesovu křivku, RDW je šířka distribuce (obdobně se stanovuje PDW)
(RDW je mírou anizocytózy)



Počet retikulocytů

- Stanovení z **krevního nátěru** obarveného brilantkrezylovou modří (počet / 1000 RBC) (**analyzátozem** – absolutní hodnoty)
- **Normální hodnota:** 0,5 – 1,5 %
- **Zvýšení:** zvýšená tvorba RBC v kostní dřeni (krvácení, hemolýza)
- **Snížení až vymizení:** útlum erythropoézy, útlum dřeně

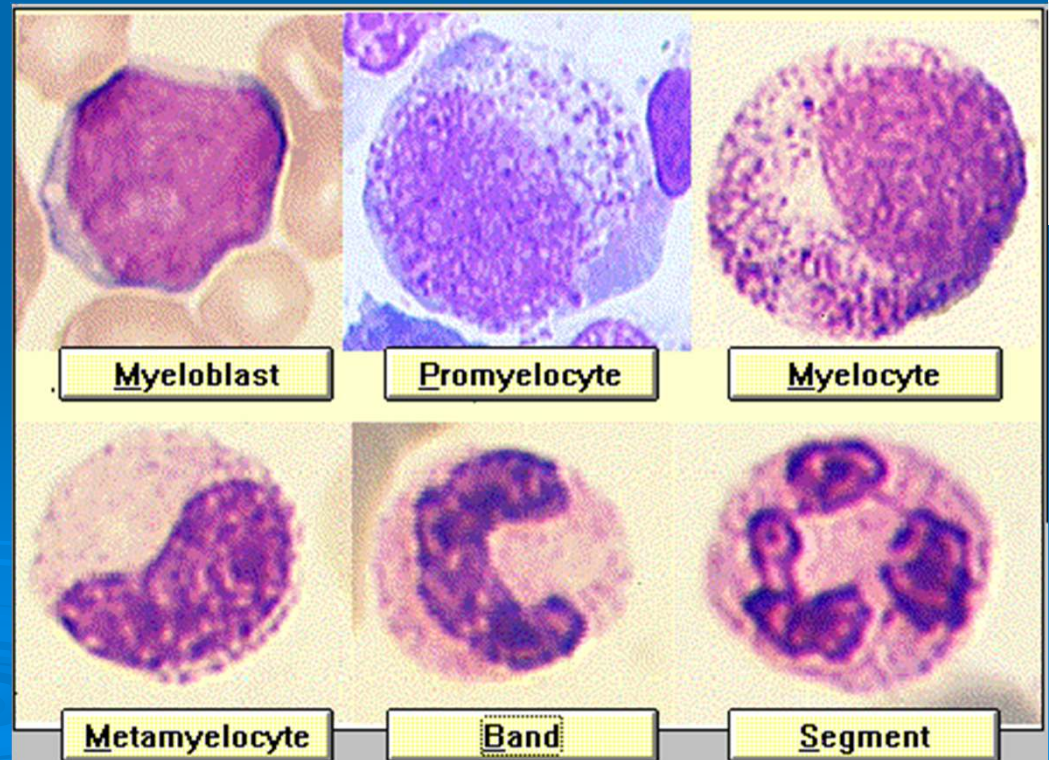


Počet trombocytů

- Udává se v množství $\times 10^9/l$ nebo $\times 10^3/\mu l$
- **Normální hodnoty:** $150 - 450 \times 10^9/l$
- **Zvýšení:** trombocytóza
- **Snížení:** trombocytopenie
- **Funkční porucha:** trombocytopatie

Počet leukocytů

- Udává se v množství $\times 10^9/l$ nebo $\times 10^3/\mu l$
- **Normální hodnoty:** $4 - 10 \times 10^9/l$
- **Zvýšení:** leukocytóza
- **Snížení:** leukopenie



Diferenciální rozpočet leukocytů

- Udává zastoupení jednotlivých druhů leukocytů v krvi
- Vyjadřuje se v **relativním** (%) nebo **absolutním** počtu

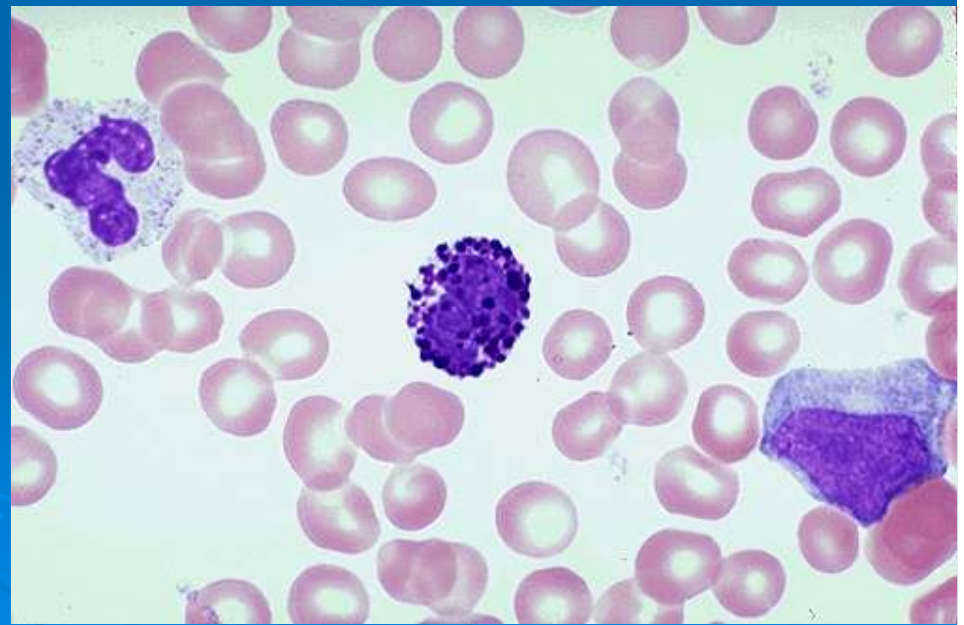
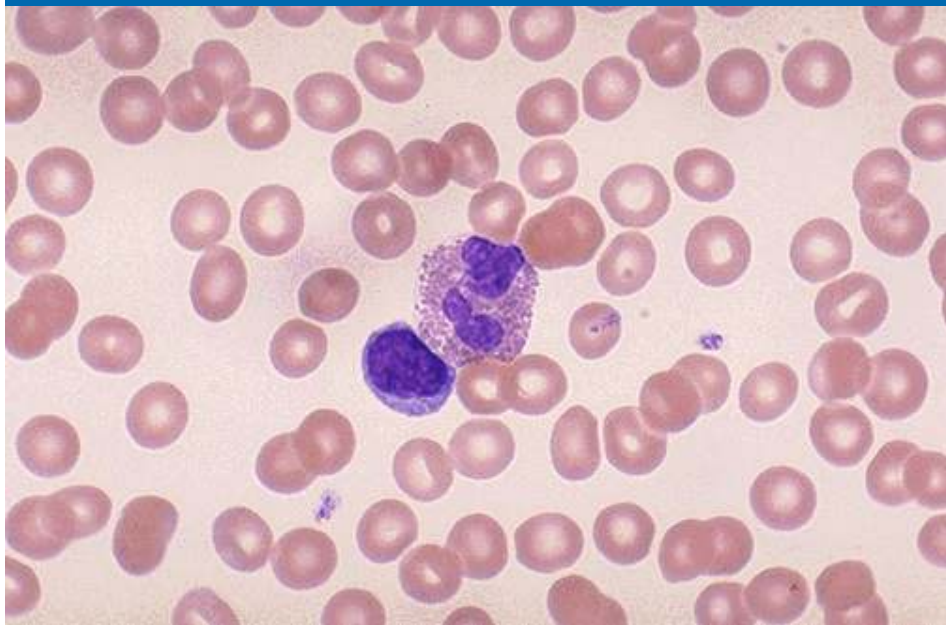
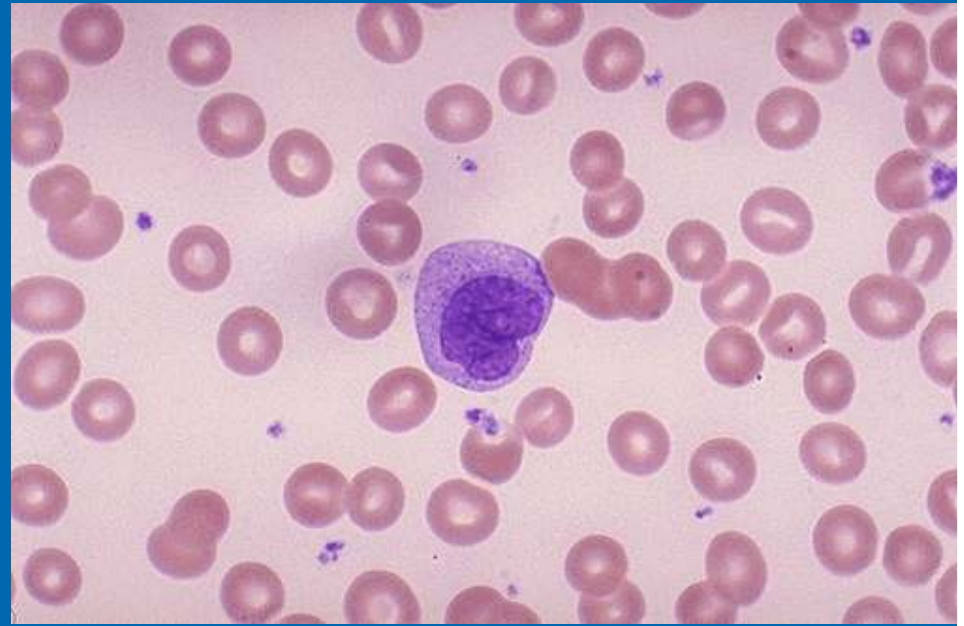
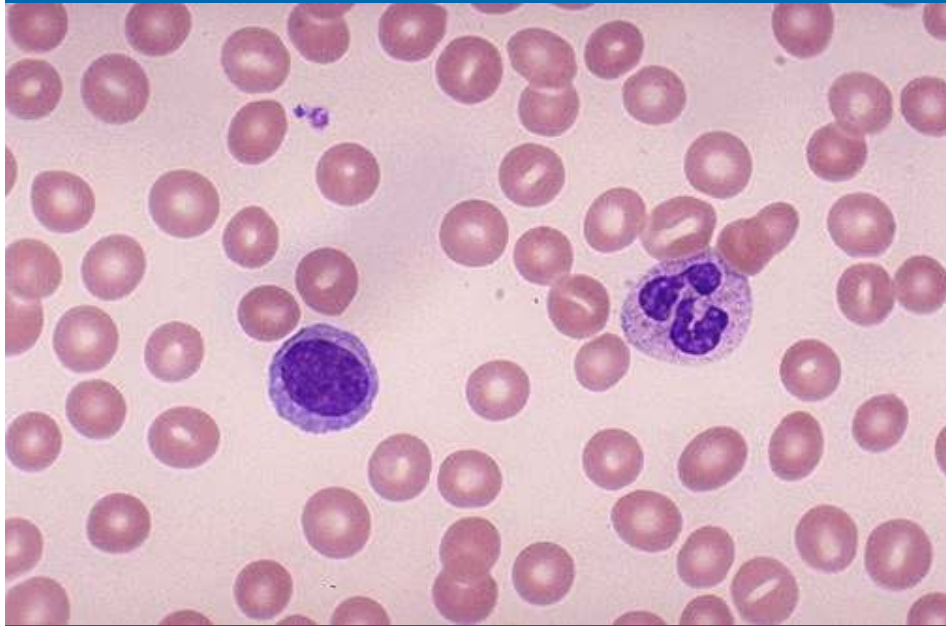
Poruchy:

neutrofilie x neutropenie

eozinofilie x eozinopenie

bazofilie x bazopenie

lymfocytóza x lymfopenie



Anémie

- 35 letá těhotná žena byla vyšetřena pro progredující **únavu** a **zadýchávání** při minimální zátěži. Klinické vyšetření až na **bledé spojivky** v normě.

- Bylo vysloveno podezření na anémii, provedeno vyšetření krevního obrazu

➤	HGB	71 g/l	(120 – 160 g/l)
	HCT	23%	(35 - 46 %)
	RBC	$2,5 \times 10^{12}$	$(3,8 - 5,2 \times 10^{12}/l)$
	MCV	74 fl	(80 – 99 fl)
	MCH	22 pg	(27 – 33 pg)
	RDW	17,1%	(13 – 15 %)
	ret	0,2%	(0,5 – 1,5 %)
	WBC	$5,4 \times 10^9$	$(4 - 10 \times 10^9/l)$
	PLT	450×10^9	$(150 - 450 \times 10^9/l)$

**mikrocytární
hypochromní
s anizocytózou
hypoproliferativní**

- Který parametr krevního obrazu diagnostikuje anémii?
- Proč není anémie definována hodnotami RBC a HCT?
- Jak lze anémii na základě hodnot KO blíže charakterizovat?

Anémie (patofyziologická klasifikace)

hyperproliferativní
(zvýšené ztráty)

krvácení

hemolýza

hypoproliferativní
(nedostatečná tvorba)

nedostatek
erytropoetinu

nedostatek
faktorů
důležitých pro
erytropoezu

porucha
krvetvorné
tkáně

Anémie (morfologická klasifikace)

mikrocytární
(hypochromní)

normocytní
(normochromní)

makrocytní

sideropenická
anémie

anémie
chronických
chorob

talasémie

anémie
chronických
chorob

některé
hemolytické
anémie

krvácení

aplastická
anémie

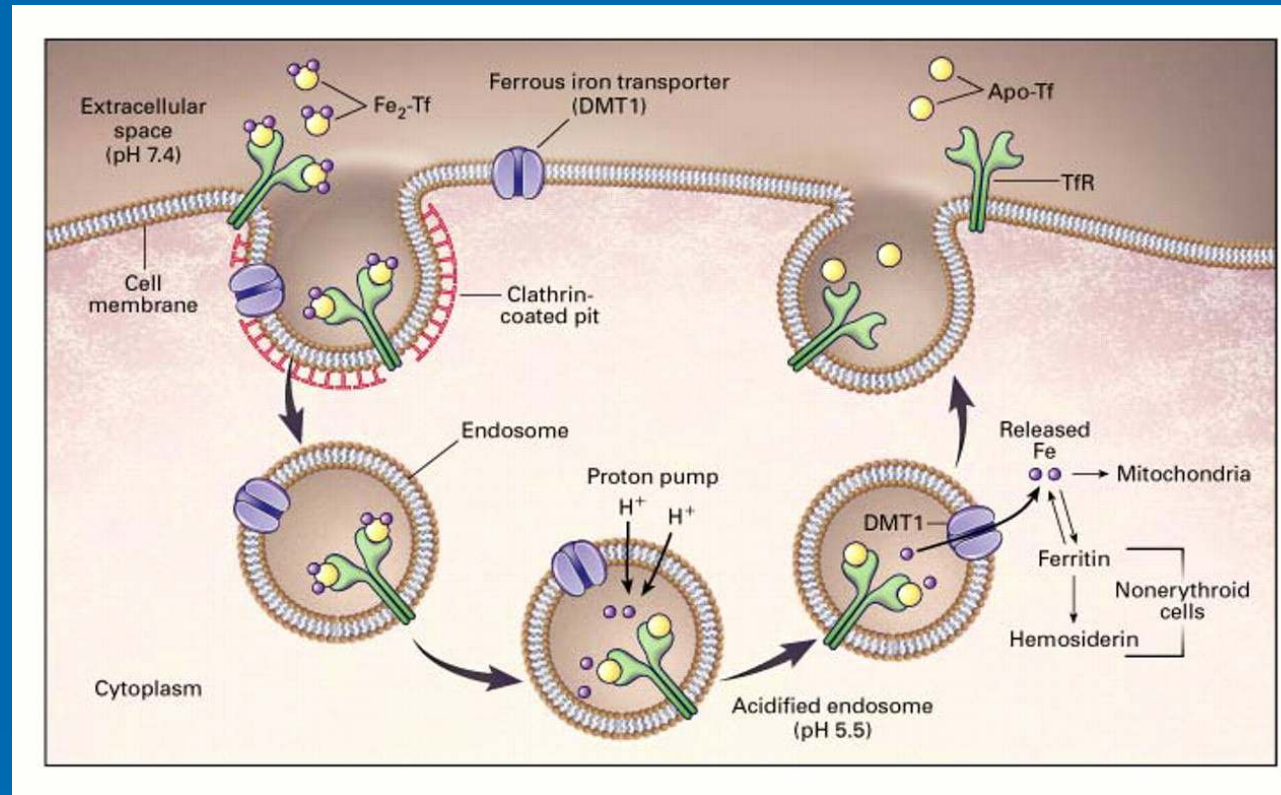
deficit
vitaminu B12

deficit
kyseliny listové

MDS
jaterní choroby
hypotyreóza

Vyšetření metabolismu železa

- S-Fe
- S-ferritin
- S-transferin



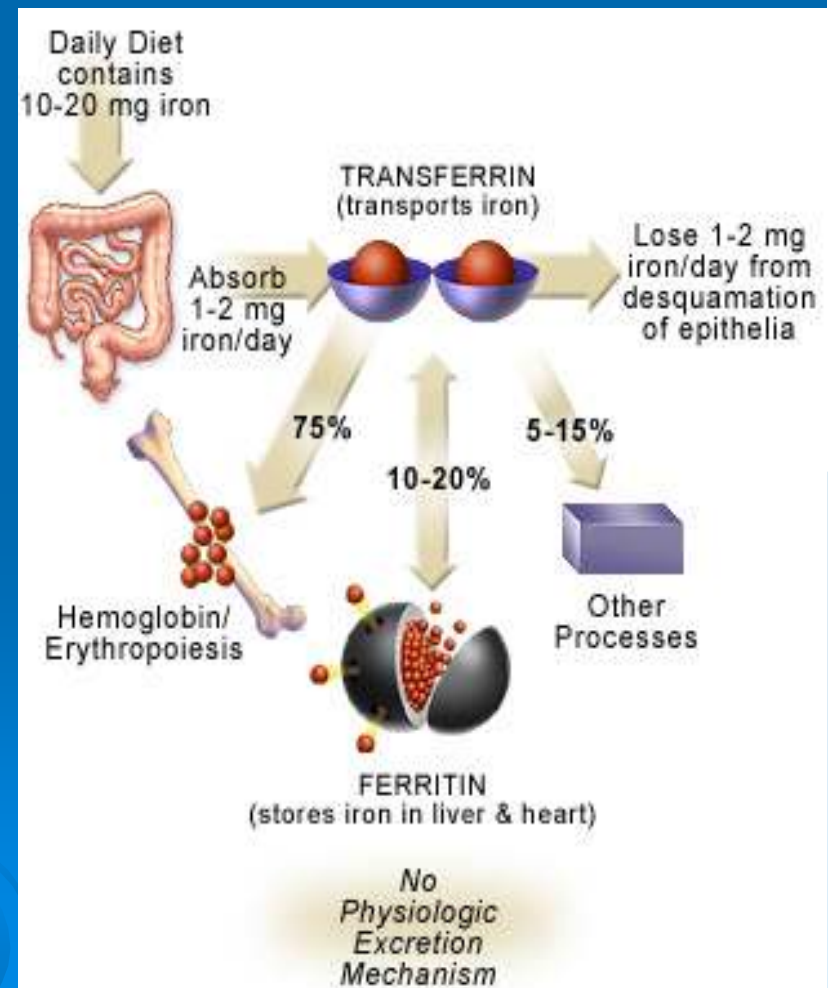
Saturace transferinu

Celková vazebná kapacita transferinu

- (Solubilní transferinový receptor)

Vyšetření metabolismu železa

- Tranzitní pool Fe je stanovován jako **sérové železo** (veškeré železo je vázáno na transferin) a jako **TIBC** (celková vazebná kapacita)
- Pool Fe v zásobárnách je
- stanovován jako **sérový feritin**



Vyšetření metabolismu železa

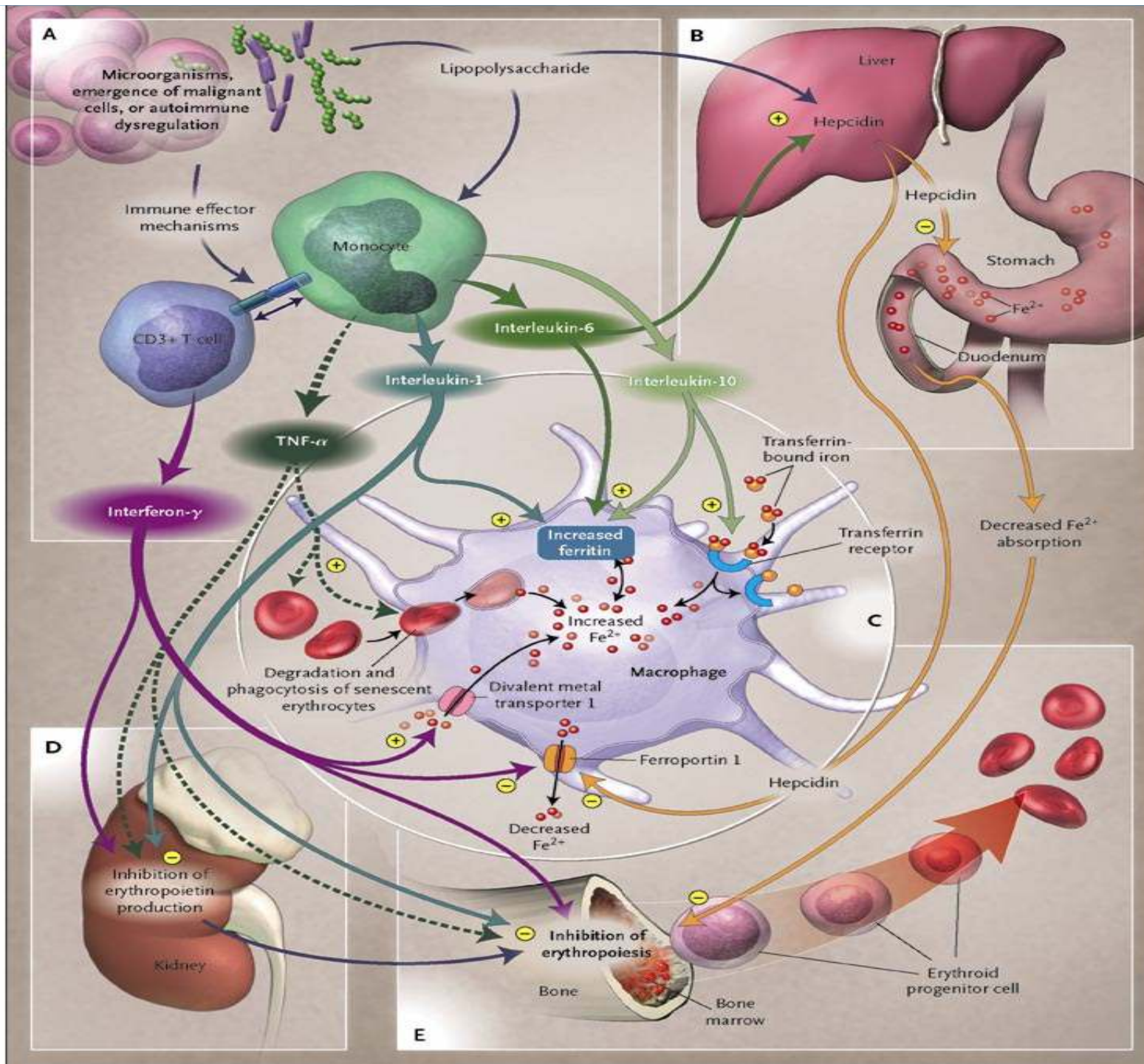
- **TIBC** se zvyšuje při sníženém Fe v séru (více neobsazeného transferinu) a při zvýšení sérového transferinu
 - **Saturace transferinu** je vypočtená jako $S\text{-Fe} / \text{TIBC}$
 - **sTfR** vzniká proteolýzou membránového TfR, je nepřímým ukazatelem exprese TfR v organismu
- => zvýšen u deficitu železa a intenzivní erytropoézy

Table 3. Serum Levels That Differentiate Anemia of Chronic Disease from Iron-Deficiency Anemia.*

Variable	Anemia of Chronic Disease	Iron-Deficiency Anemia	Both Conditions†
Iron	Reduced	Reduced	Reduced
Transferrin	Reduced to normal	Increased	Reduced
Transferrin saturation	Reduced	Reduced	Reduced
Ferritin	Normal to increased	Reduced	Reduced to normal
Soluble transferrin receptor	Normal	Increased	Normal to increased
Ratio of soluble transferrin receptor to log ferritin	Low (<1)	High (>2)	High (>2)
Cytokine levels	Increased	Normal	Increased

* Relative changes are given in relation to the respective normal values.

† Patients with both conditions include those with anemia of chronic disease and true iron deficiency.



Proč je sideropenická
anémie mikrocytární?

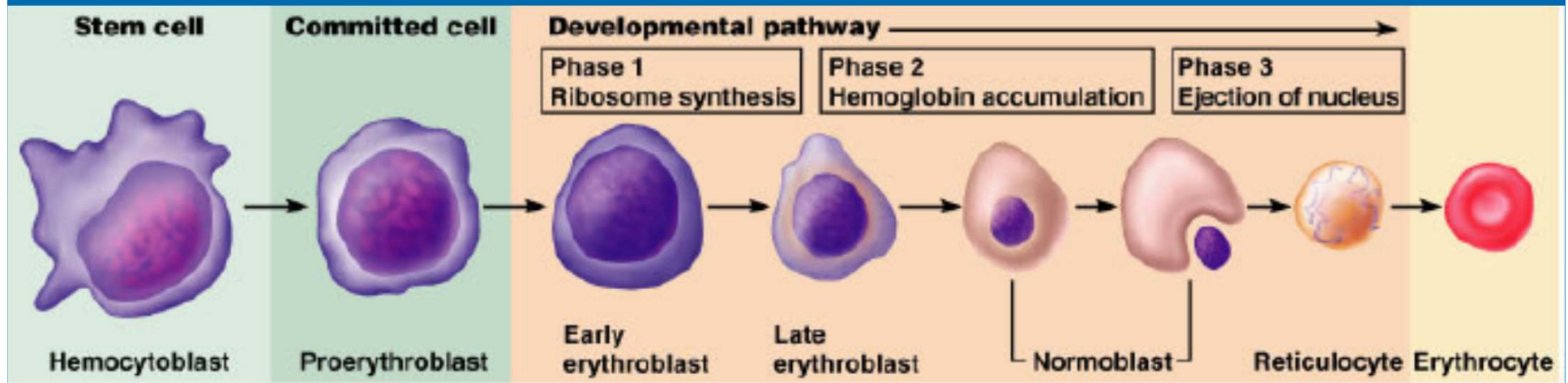
Proč je přítomna
anizocytóza?

mikrocyty

↑
mitózy

↑
prodloužená hemoglobinizace

↑
nedostatek **Fe**



- 50 letá žena přichází pro **zhoršení dechu** v několika posledních týdnech. Také si stěžuje na **mravenčení prstů** na levé noze. Při fyzikálním vyšetření zjišťujeme **žlutě zabarvené skléry**, červený a **vyhlazený jazyk**.

➤ Pro podezření na anémii byl vyšetřen krevní obraz:

➤	HGB	65 g/l	(120 – 160 g/l)
	HCT	19,3%	(35 - 46 %)
	RBC	$1,7 \times 10^{12}$	$(3,8 - 5,2 \times 10^{12}/l)$
	MCV	114 fl	(80 – 99 fl)
	MCH	33 pg	(27 – 33 pg)
	RDW	22 %	(13 – 15 %)
	ret	0,4%	(0,5 – 1,5 %)
	WBC	$2,0 \times 10^9$	$(4 - 10 \times 10^9/l)$
	PLT	140×10^9	$(150 - 450 \times 10^9/l)$

O jaký typ anémie se jedná?

Anémie (morfologická klasifikace)

mikrocytární (hypochromní)

sideropenická
anémie

anémie
chronických
chorob

talasémie

normocytární (normochromní)

anémie
chronických
chorob

některé
hemolytické
anémie

krvácení

aplastická
anémie

makrocytární

deficit
vitaminu B12

deficit
kyseliny listové

MDS
jaterní choroby
hypotyreóza

➤ Vyšetření sérové koncentrace:

vitaminu B12

kyseliny listové

➤ Proč je anémie makrocytární?

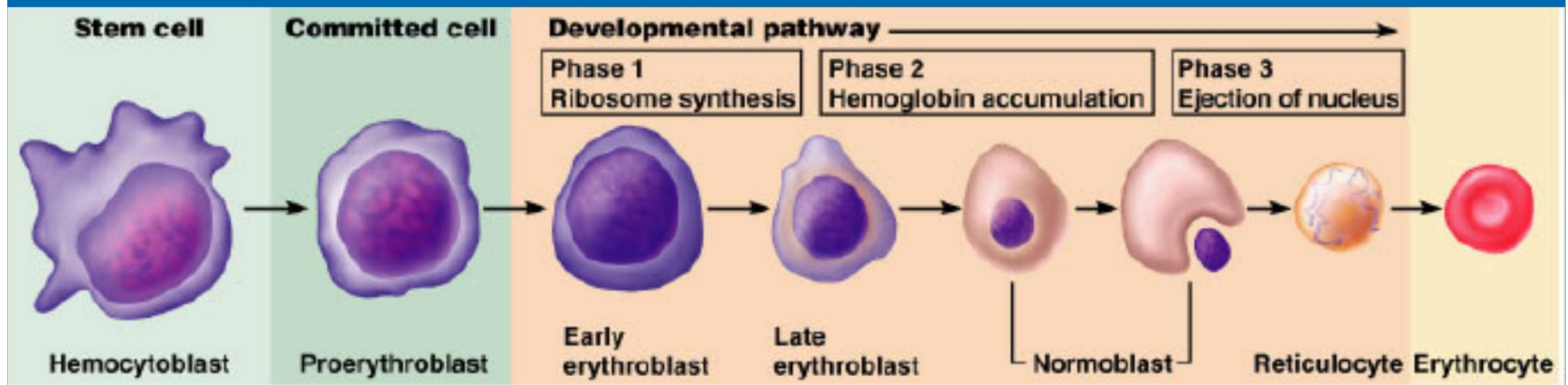
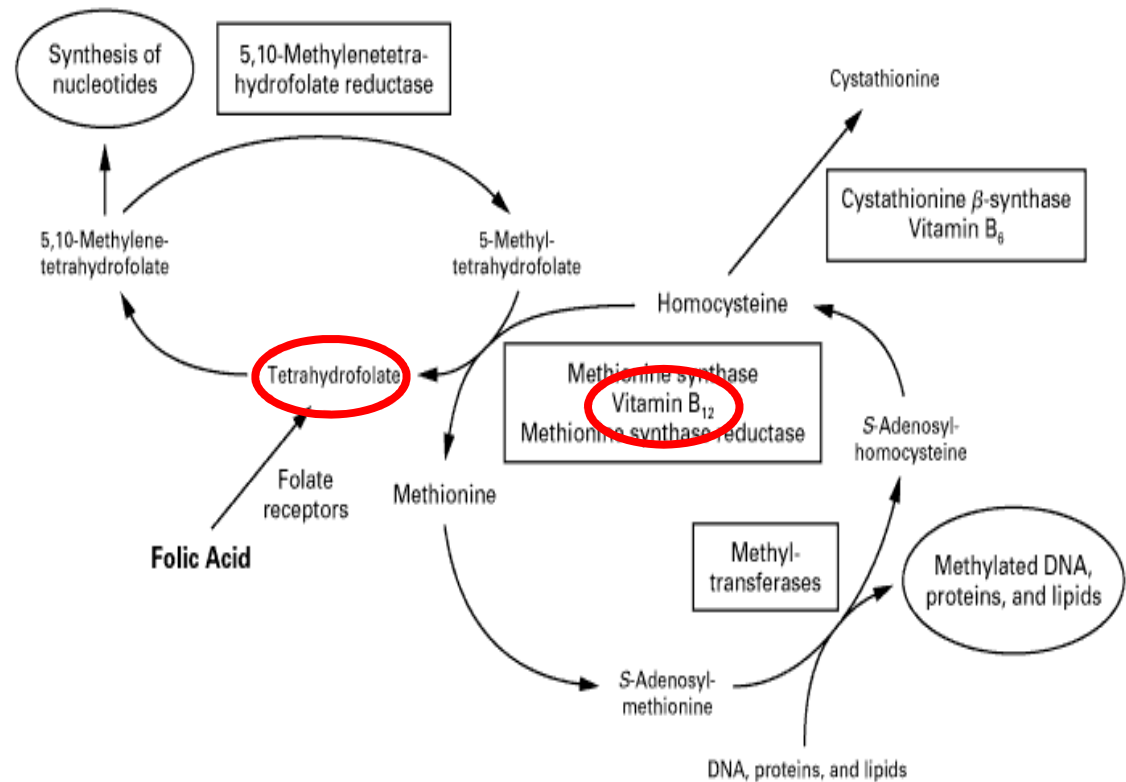
makrocyty



prodloužená doba mezi
bb děleními



nedostatek **kyseliny
listové** a **vitaminu B12**

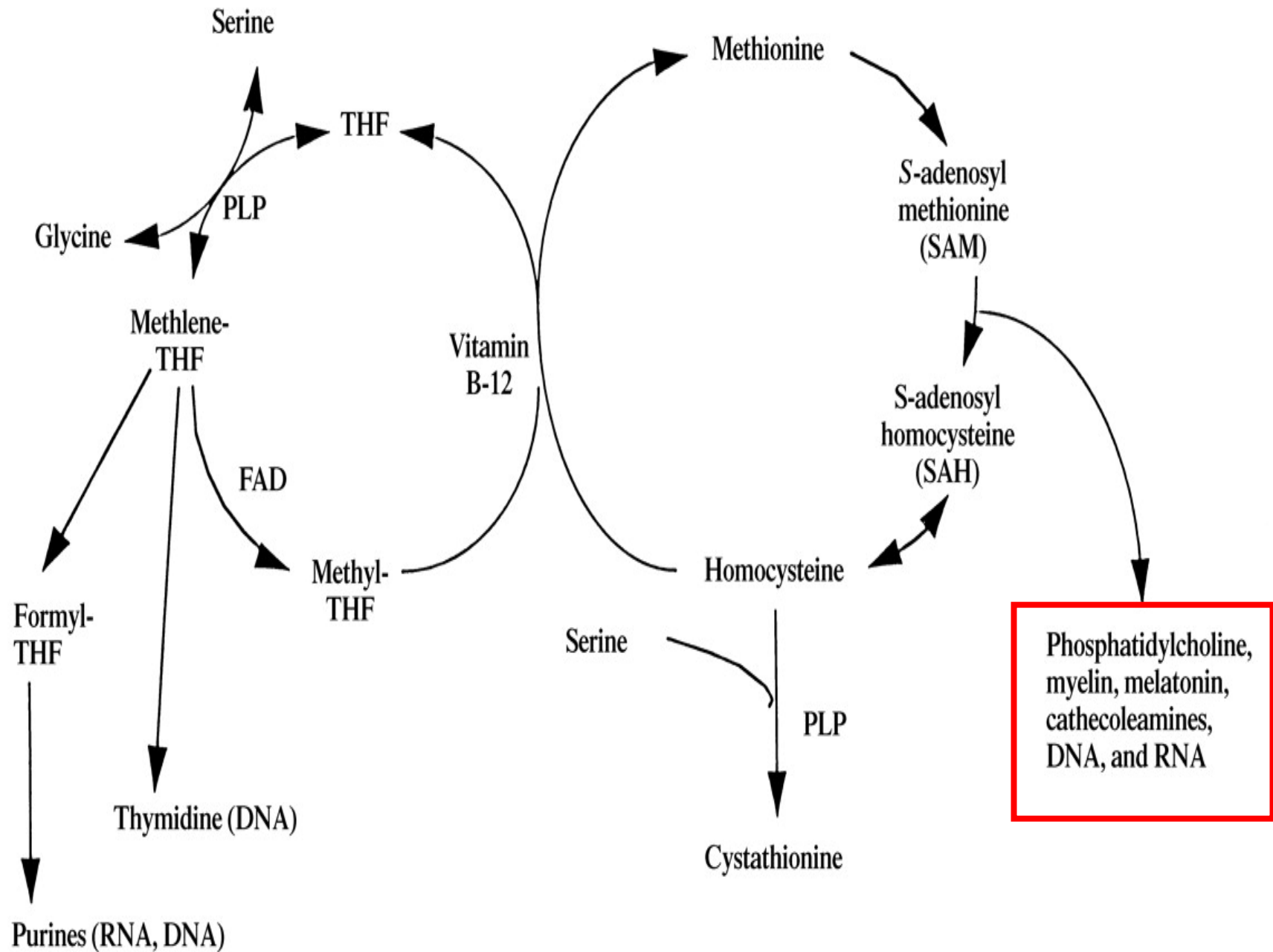


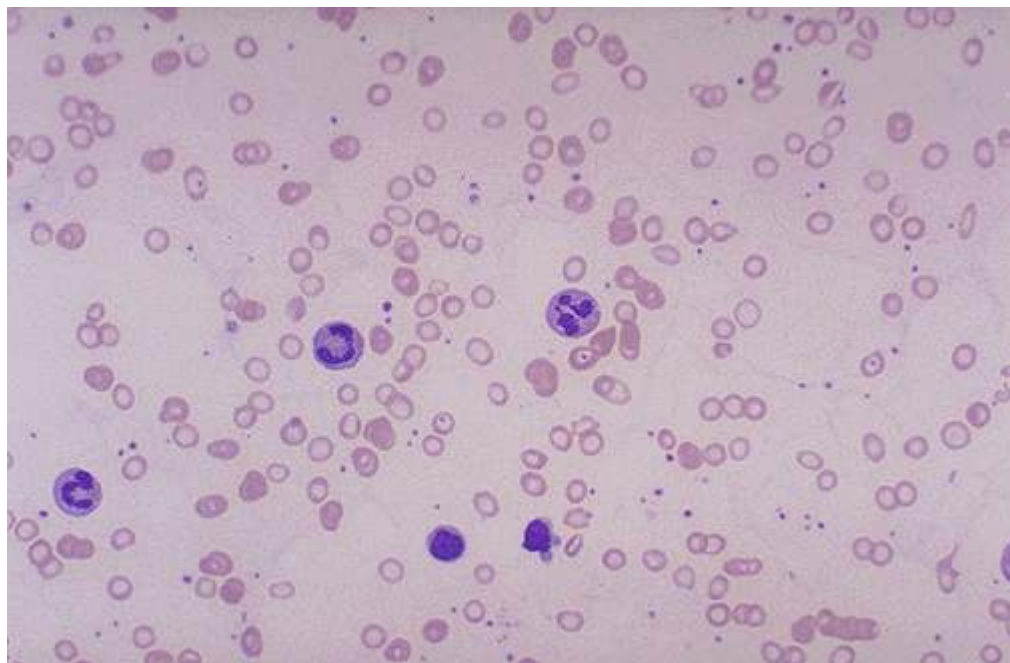
➤

HGB	65 g/l	(120 – 160 g/l)
HCT	19,3%	(35 - 46 %)
RBC	$1,7 \times 10^{12}$	$(3,8 – 5,2 \times 10^{12}/l)$
MCV	114 fl	(80 – 99 fl)
MCH	33 pg	(27 – 33 pg)
RDW	22 %	(13 – 15 %)
ret	0,4%	(0,5 – 1,5 %)
WBC	$2,0 \times 10^9$	$(4 – 10 \times 10^9/l)$
PLT	140×10^9	$(150 – 450 \times 10^9/l)$

➤ Proč má pacientka pancytopenii ?

➤ Proč má pacientka parestézie?



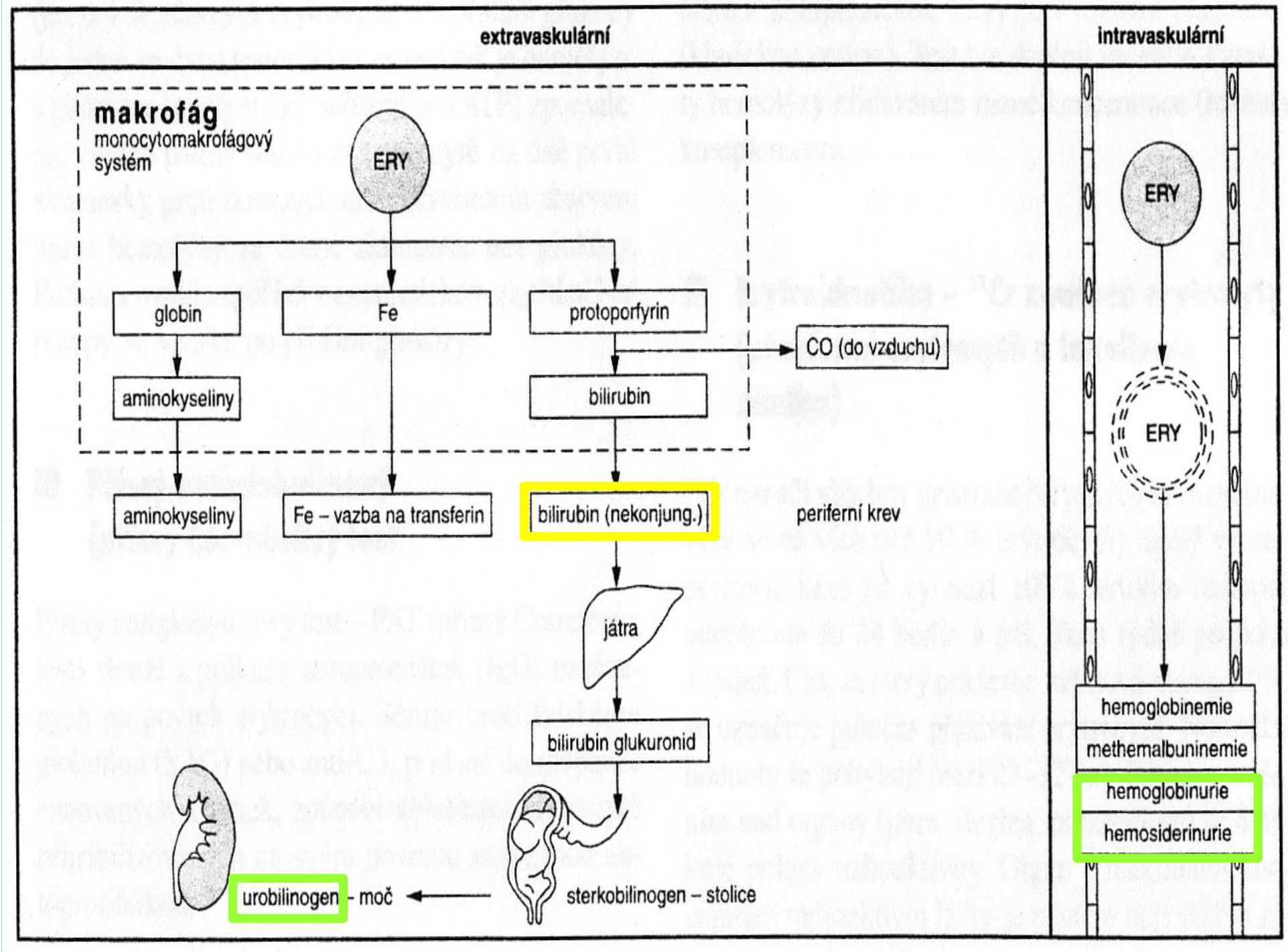


←
hypochromní mikrocytární
anémie

→
makrocytární anémie
hypersegmentovaný neutrofil



Hemolytické anémie



Vyšetření metabolismu hemoglobinu

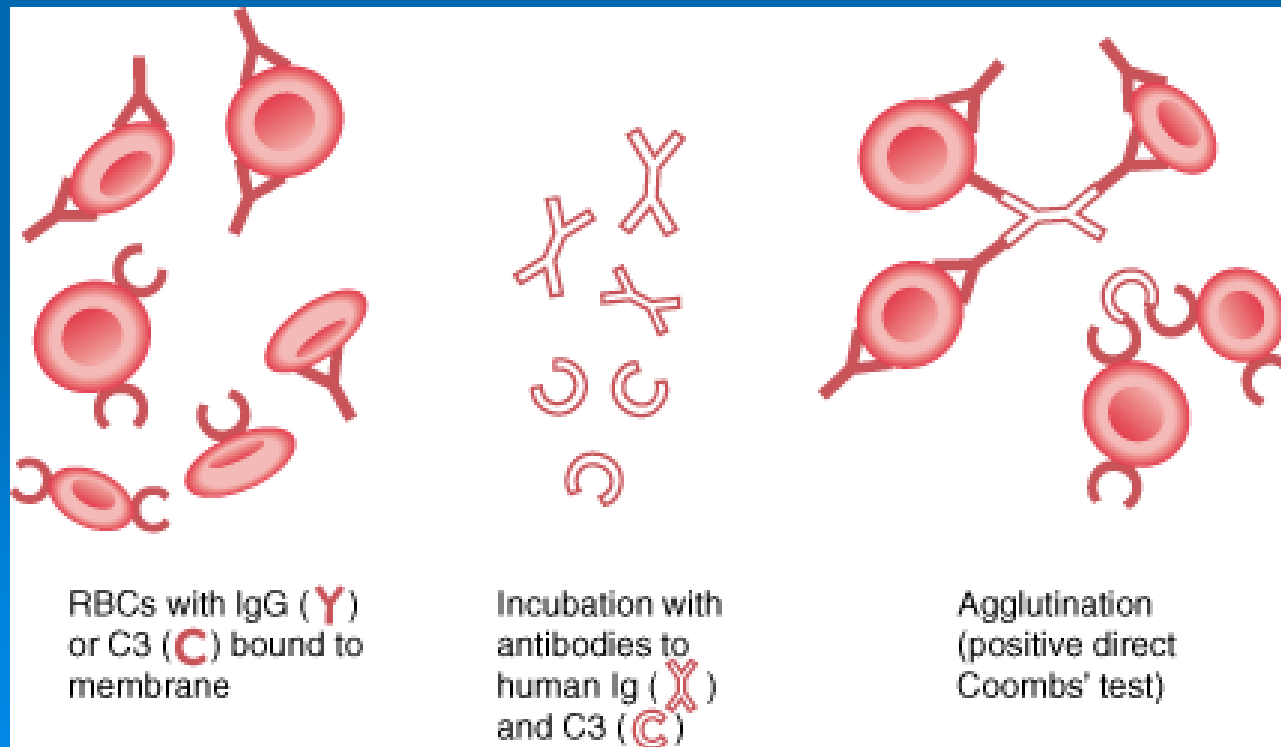
- **S-bilirubin** – koncentrace odráží degradaci hemu (zvýšen u hemolytických anémií)
- **S-haptoglobin** (váže hemoglobin)
- **S-hemopexin** (váže hem)
(sníženy u hemolytických anémií)
- **Elektroforéza hemoglobinu** – zjištění abnormálních hemoglobinů (hemoglobin S)

Vyšetření antierytrocytových protilátek

(→ dg. autoimunitních hemolytických anémií)

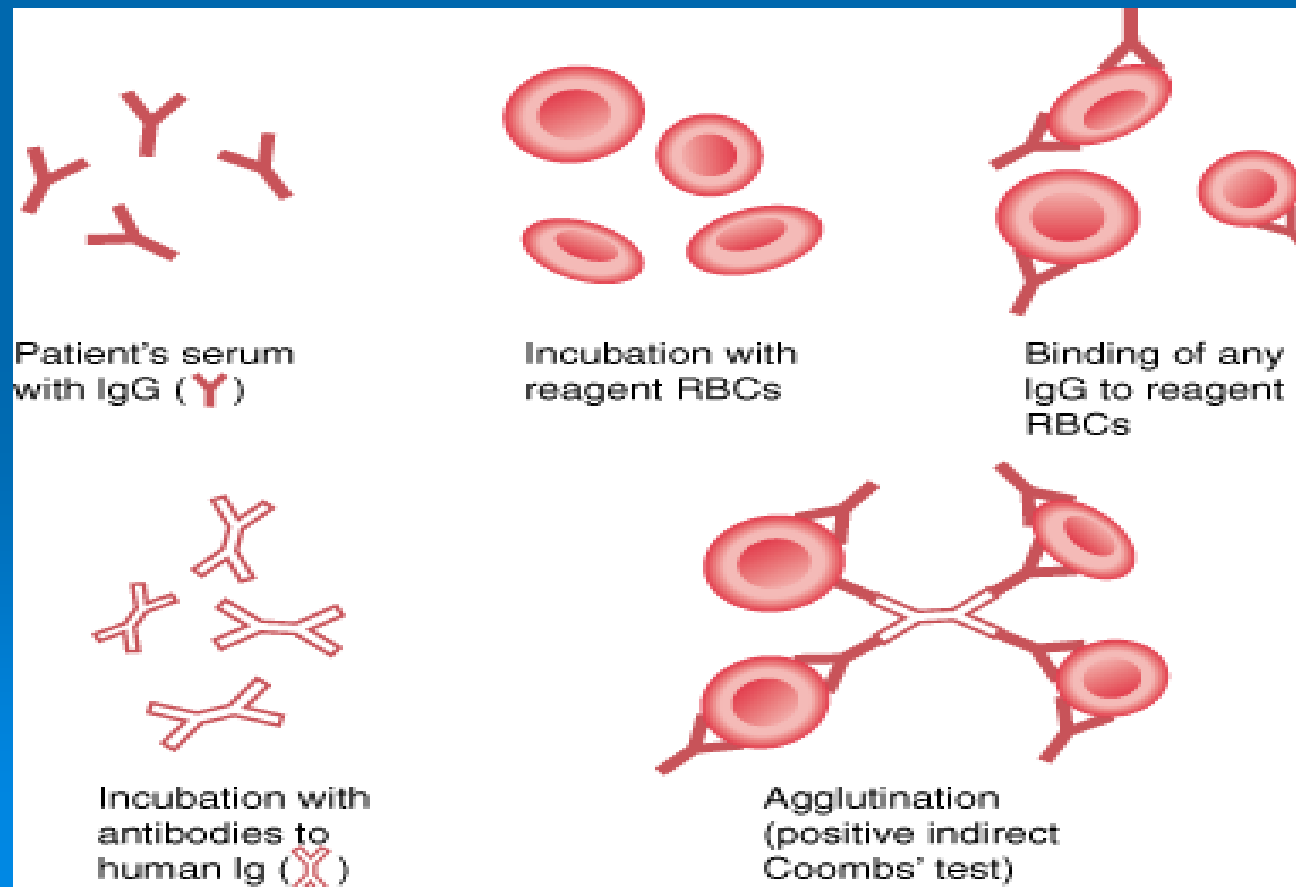
➤ Přímý antiglobulinový test (Coombsův)

- průkaz protilátek na povrchu erytrocytů pomocí antiglobulinového séra



➤ Nepřímý antiglobulinový test

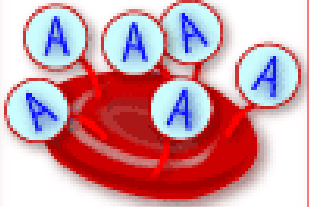
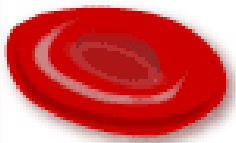
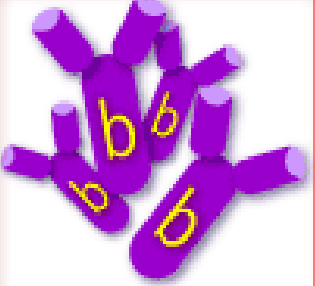
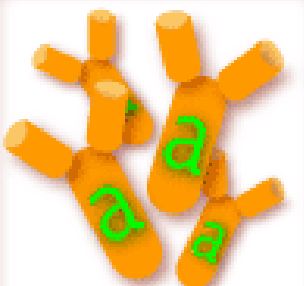
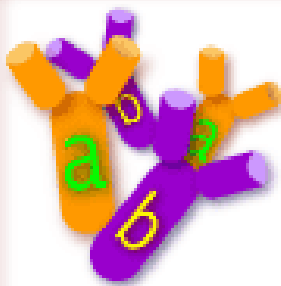
- průkaz volných protilátek v séru (po inkubaci RBC se sérem se přidá antiglobulinové sérum)

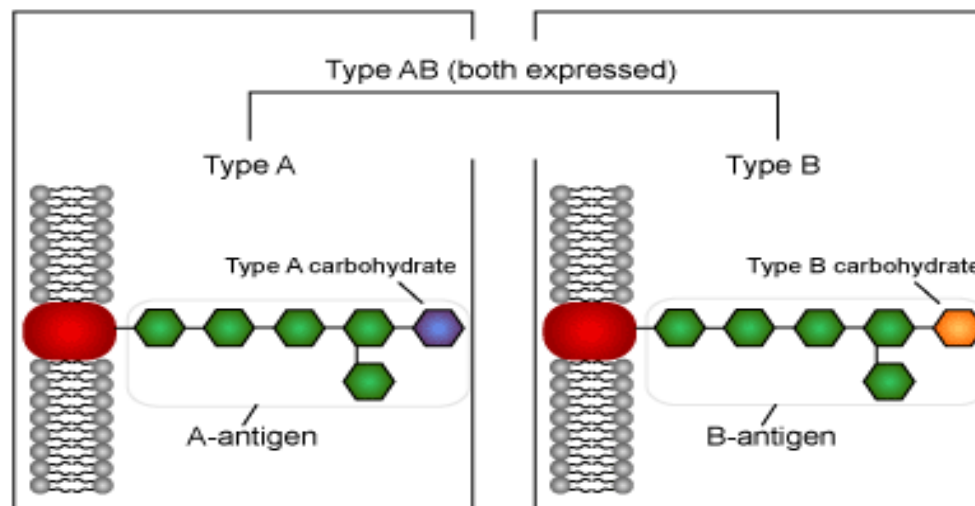
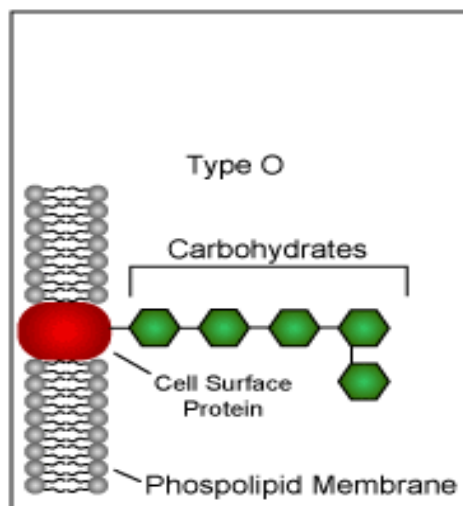


Imunologická vyšetření

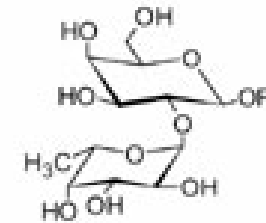
- Vyšetření krevních skupin
- (Přímý antiglobulinový test)
- (Nepřímý antiglobulinový test)

The ABO Blood System

Blood Type (genotype)	Type A (AA, AO)	Type B (BB, BO)	Type AB (AB)	Type O (OO)
Red Blood Cell Surface Proteins (phenotype)	 A agglutinogens only	 B agglutinogens only	 A and B agglutinogens	 No agglutinogens
Plasma Antibodies (phenotype)	 b agglutinin only	 a agglutinin only	NONE. No agglutinin	 a and b agglutinin



R — 



The diagram shows a branched oligosaccharide. It consists of a central glucose unit (top left) linked via its C1 to the C4 of another glucose unit (top right). This second glucose unit is further linked via its C1 to a third glucose unit (bottom). An acetamido group (AcHN-) is attached to the C2 of the top-left glucose unit. An arrow points to this AcHN group. The labels 'HO' and 'OH' indicate the positions of hydroxyl groups on the various carbons of the sugar rings.



The diagram shows a branched oligosaccharide. It consists of a main chain of three pyranose rings. The first ring is a glucose unit with hydroxyl groups at C2, C3, and C6. The second ring is a glucose unit with hydroxyl groups at C2, C3, and C6. The third ring is a glucose unit with hydroxyl groups at C2, C3, and C6. A fourth pyranose ring is attached to the second ring at its C4 position. This fourth ring is a glucose unit with hydroxyl groups at C2, C3, and C6. A methyl group (H₃C) is attached to the C4 position of the fourth ring. An arrow points to the C4 position of the second ring, indicating the site of attachment for the fourth ring.



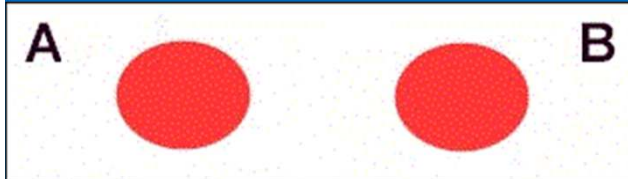
Vyšetření krevních skupin

➤ ABO systém

- vyšetření RBC pomocí diagnostických sér anti-A a anti-B
- vyšetření sérových aglutininů anti-A a anti-B pomocí typových erytrocytů

➤ Rh(D) systém

- vyšetření pomocí anti-Rh(D) séra



PACIENT		Č. CHOR.
KREVŇÍ VZOREK PŘÍJEMCE		výsledná krevní skupina
		
VZOREK KREVŇÍ KONZERVOVY		výsledná krevní skupina
		
ID krevní konzervy:		krevní skupina

bed-side test

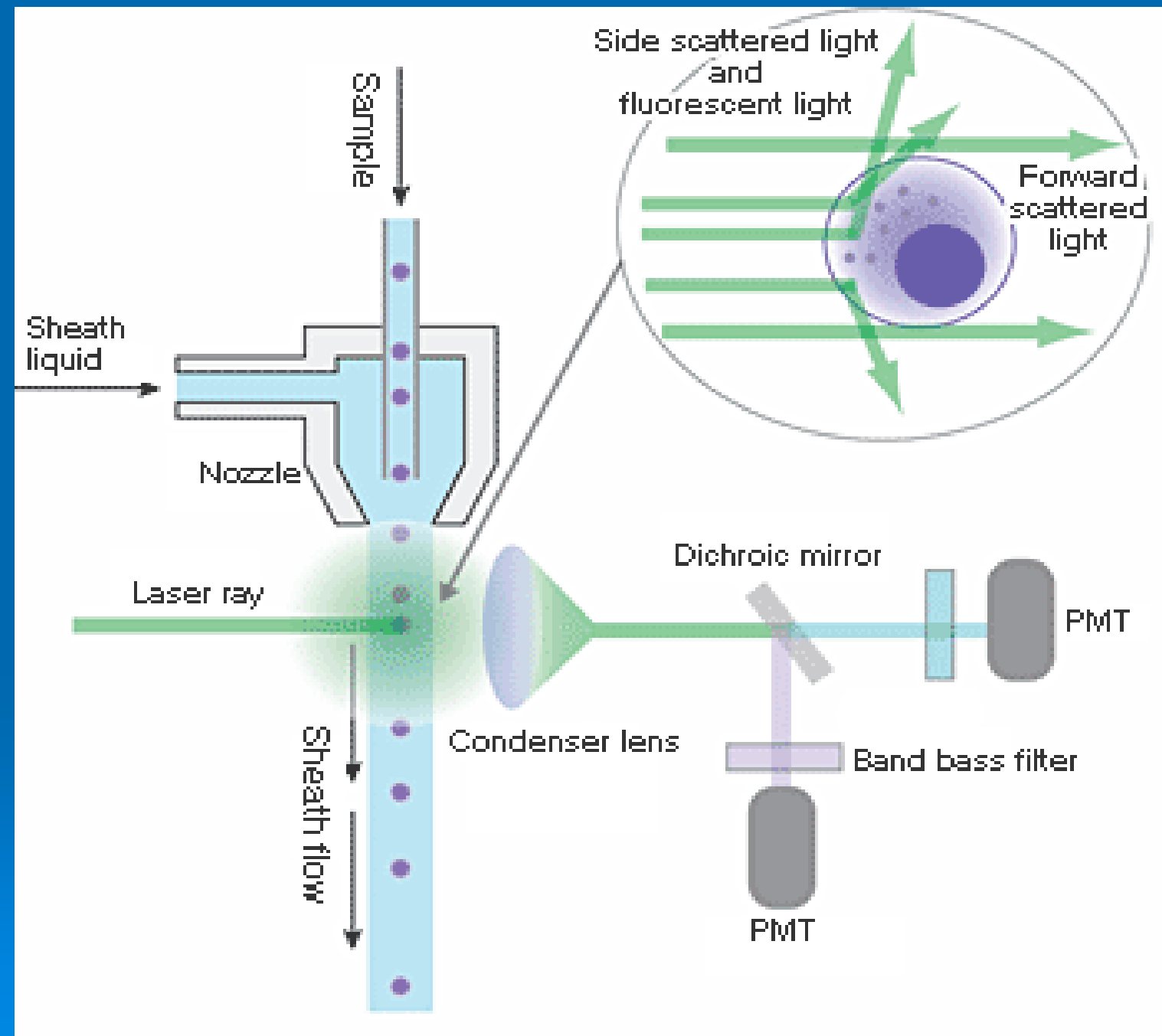
PACIENT		Č. CHOR.
KREVŇÍ VZOREK PŘÍJEMCE		výsledná krevní skupina
		B
VZOREK KREVŇÍ KONZERVOVY		výsledná krevní skupina
		B

Cytochemie

- Průkaz látek v buňkách pomocí chemických reakcí, hodnocení **periferní krve** i **kostní dřeně**
- **Reakce na železo (Perlsova reakce)**
 - průkaz železa v erytroblastech (sideroblasty), erytrocytech (siderocyty) a makrofázích (siderofágy)
- **Vyšetření některých enzymů (ALP, NE)**
 - dg. a dif. dg. hematologických malignit

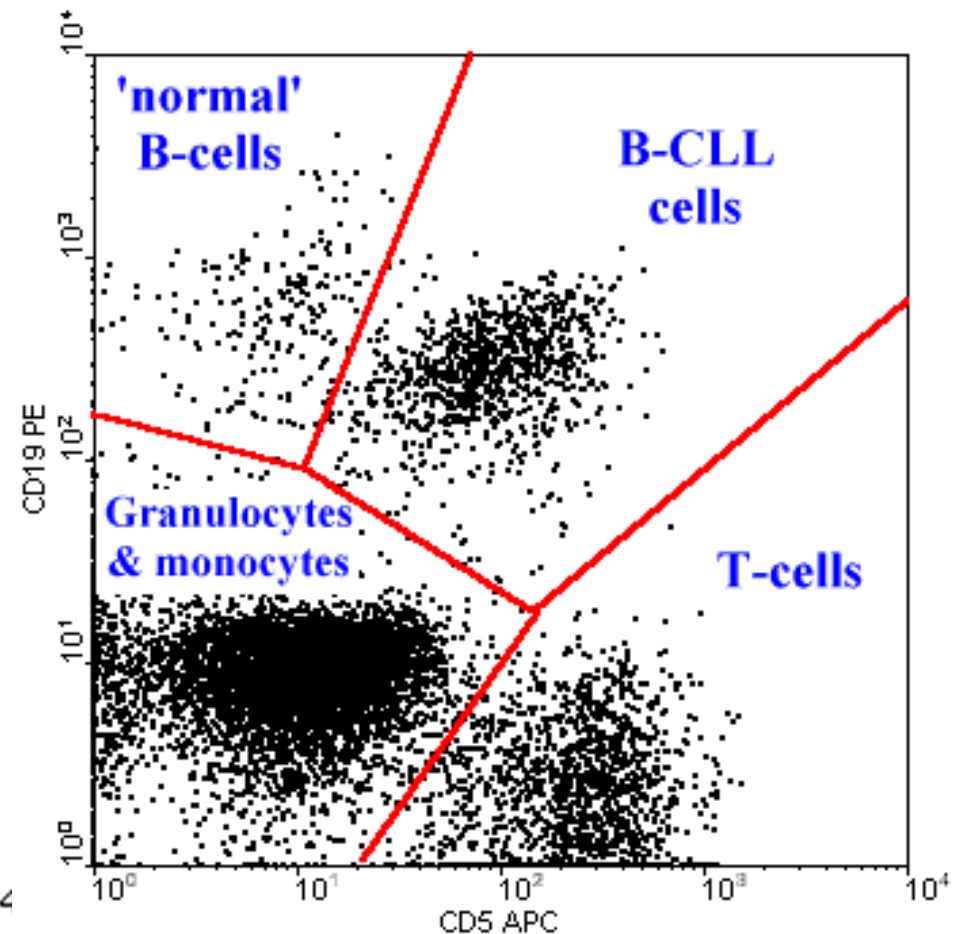
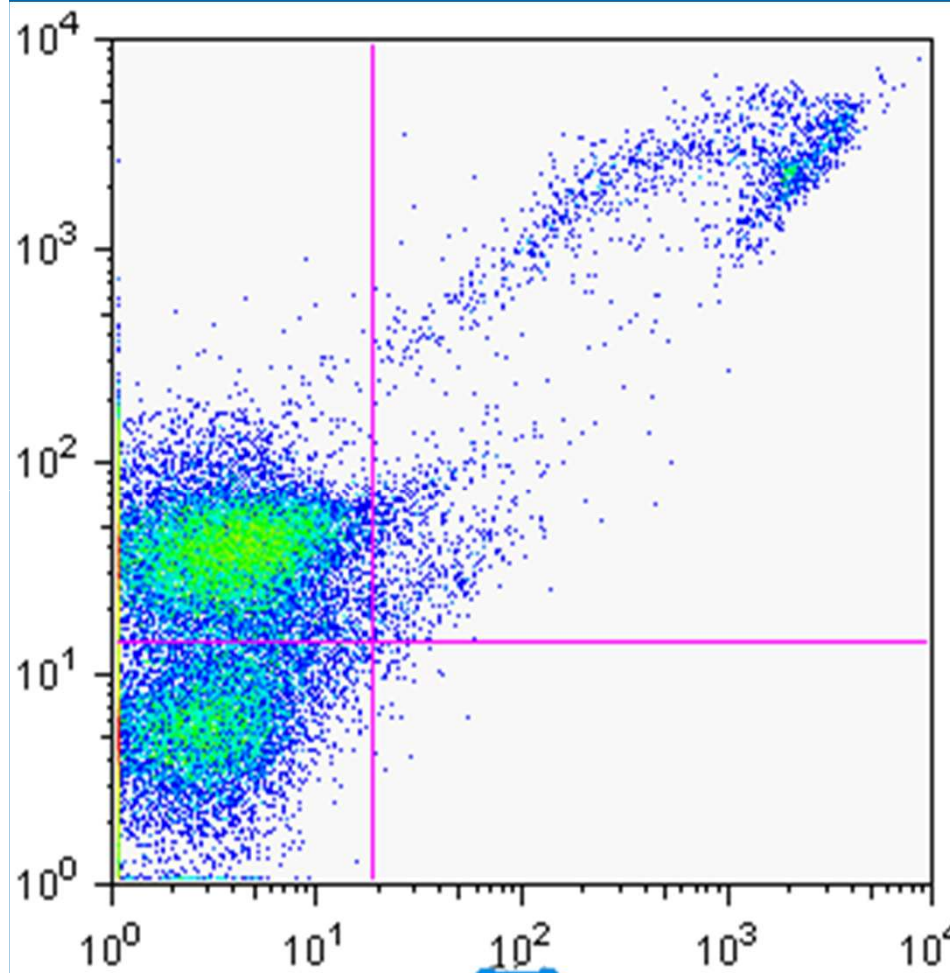
Průtoková cytometrie (flow cytometry)

- technika umožňující kvantitativně i kvalitativně **analyzovat částice – buňky – v suspenzi**. Umožňuje cíleně separovat buňky na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností
- **FACS** (Fluorescence-activated-cell-sorting) - třídění buněčné suspenze dle odlišného rozptylu světla a fluorescenční charakteristiky buňky



➤ Užití v hematologii:

imunofenotypizace myeloproliferací a lymfoproliferací pomocí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek



Souhrn/ Dotazy/ komentáře ?

Děkuji Vám za pozornost

- Toto je v jakékoliv formě
(PDF, PPT, PPTX atd.)
neoficiální výukový materiál
- pro interní potřebu
- nešířit
- pro dotazy kontaktujte:
Petr.Marsalek@LF1.CUNI.CZ