

Historie laboratorní hematologie

J. Šebek

V širším pojetí historie laboratorní hematologie sahá do období sestrojení prvního mikroskopu. Antony van Leeuwenhoek nizozemské národnosti jich za svého života vyrobil ke dvěstěpadesáti a v roce 1674 jako první upozoroval buněčné elementy krve. Nicméně skutečné poznatky bezprostředně se týkající hematologie potažmo diagnostiky přišly až o mnoho let později. Ke konci sedmdesátých let 19. století Paul Ehrlich vyvinul metodu k vizualizaci buněk krevního nátěru, a tak dokázal klasifikovat základní subtypy leukocytů. Používal triacidové barvení, což byl roztok s methylenovou zelení, kyselým fuchsinem a pigmentem oranže G. Na počátku 20. století pak Artur Pappenheim techniku barvení změnil do podoby, jakou bez větších modifikací používáme dodnes. Ve stejném období ruský hematolog Michail Innokentěvič Arinkin poprvé provedl odběr a odečet kostní dřene prostřednictvím sternální punkce. Na začátku dvacátého století se konečně objevily první hemocytometry s již dostatečně přesně vybroušenými mikročtverci, v nichž se krvinky, které byly dilutované v roztoku síranu sodného, počítaly. Za nejrozšířenější můžeme označit Bürkerovu komůrku.

Bezesporu dalším milníkem bylo objevení účinku chelatačních látek respektive antikoagulačního působení citrátů sodného. Citrát poprvé použil Američan Richard Lewisohn okolo roku 1914. Avšak traduje se, že nezávisle na sobě objev též uskutečnil belgický chirurg Albert Hustin a Luis Agote z Argentiny. To v podstatě umožnilo podrobněji studovat krevní buňky. Například Maxwell Wintrobe ke konci dvacátých let zavedl měření hematokritu či středního objemu erytrocytů (MCV). Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) pro morfologická vyšetření našla uplatnění až později. Ve třicátých letech David Drabkin a Herold Austin rozpracovali metodu k přesnému určení hladiny hemoglobinu. Jednalo se o spektrofotometrickou metodu, kdy se hemoglobin měřil ve formě kyanohemoglobinu při 540 nm. Bezkyanidové detergentní metody například s lauryl sulfátem přišly o patnáct let déle. Zhruba v letech od 1958 do 1976 se několik týmů intenzivně zabývalo cytochemickými metodami, které se v rámci diferenciální diagnostiky hemoblastóz zdály být velmi slibné. Na problematice pracoval Frank Hayhoe, Dennis Quaglino, Daniel Catovsky a Stanley Bennett. Díky jejich úsilí v roce 1976

vznikla „legendární“ FAB (French-American-British) klasifikace akutních leukémií. Zohledňovala nejen morfologická kritéria, ale právě i cytochemii krevních buněk.

Protisrážlivý efekt citrátů také umožnil prozkoumat hemokoagulaci. K jejímu laboratornímu sledování byly vyvinuty dva základní dodnes používané testy. Vše začalo experimenty s tkáňovými extrakty a plazmatickými proteiny zejména izolovaným fibrinogenem, kterým se věnoval na začátku dvacátého století Paul Morawitz. Nicméně teprve v roce 1935 Armand James Quick vypracoval metodu protrombinového času (PT), při níž koagulační děje až po vznik fibrinu aktivoval za přítomnosti kalcia tkáňový faktor taktéž tromboplastin. Byl izolován z mozkové tkáně a následně purifikován. Metodu dodnes označujeme jako Quickův test. Jelikož řadu krvácivých poruch nedokázal odhalit, nastala potřeba jej modifikovat, aby odhalil deficity i ostatních koagulačních faktorů. Proto v roce 1953 Robert Wagner, Robert Lardell společně s Kenethem Brinkhousem přišli s aktivovaným parciálním tromboplastinovým časem (APTT). Jakožto hlavní složka reagentie sloužil fosfolipid kefalín a také kaolin. Zhruba o deset let později bylo možné vyšetřit primární hemostázu, přesněji řečeno trombocyty ve smyslu jejich funkčnosti. Šlo o agregometrii a o její zavedení do praxe se zasloužili Britové John O'Brien, Gustav Born. Co se týče novějších poznatků, tak roku 1965 Olav Egeberg z Norska poprvé identifikoval nedostatek antitrombinu jako příčinu trombofiliního stavu. Určitě za zmínku stojí objev D-dimerů včetně jejich významu, který se uskutečnil v roce 1973, nebo popsání rezistence na aktivovaný protein C (APC-R). Na problematice APC rezistence pracovali na začátku devadesátých let Peter Clark a Björn Dahlbäck ze Švédska. Dahlbäck pak své poznatky publikoval v roce 1993.

Situace, kdy narůstaly počty rutinně prováděných laboratorních vyšetření, vyústila do stavu, kdy se kladly neustále vyšší nároky na vybavení hematologického provozu respektive na jeho automatizaci a též pochopitelně docílení optimální přesnosti i správnosti měření. O takové inovace se zasloužily a stále ještě zasluhují společnosti pocházející především ze Spojených států či Japonska. Díky fotometrické detekci hemoglobinu byl umožněn vznik hemoglobinometrů, jež sloužily k jeho měření. Příkladem může být model 231 od firmy Instrumentation Laboratory (USA) z konce padesátých let (obr. 1) či Linson 3 švédské výroby. V roce 1956 byl představen poloautomatický analyzátor krevních buněk pod označením Coulter Counter model A americkým výrobcem dnes známým



Just add blood... and read Hb in 15 seconds

Just present the undiluted whole blood sample... the rest is automatic.
 The H. Hemoglobinometer is a new and significantly improved instrument for hemoglobin analysis. It combines an automatic sample handling system, a high precision spectrophotometer and a built-in analog to digital computer. It can process a "stat" sample in less than a minute or as many as 150 specimens in an hour.
 Standardization is quick, and the Model 231 automatically flushes clean 30 seconds after the last sample presentation. Duplicate assays

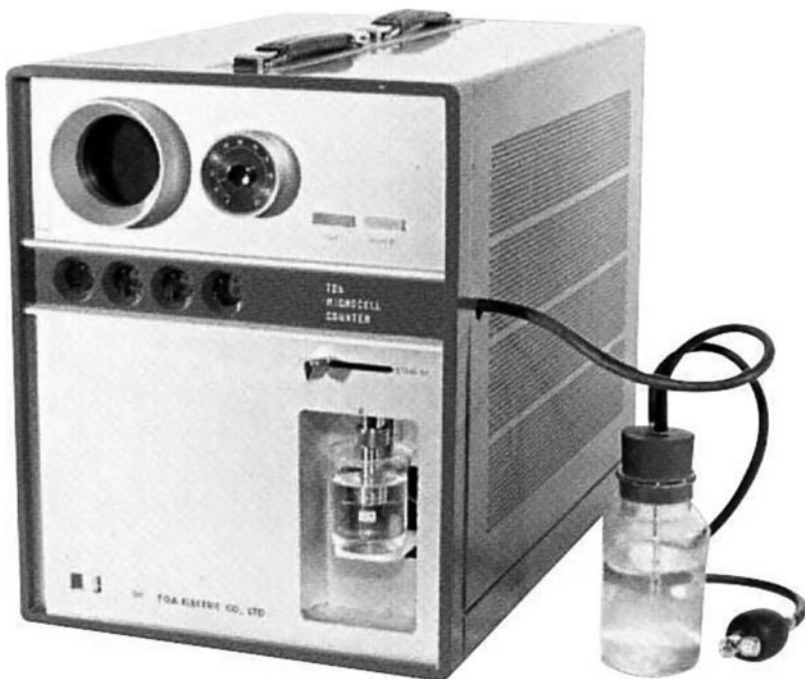
repeat within ± 0.1 grams and results correlate with other methods of analysis.
 Contact your local H. representative and let him show you how fast and easy hemoglobin analysis can be. Or send for Data 231.

INSTRUMENTATION LABORATORY INC.
 113 BARTWELL AVE. LEXINGTON, MASS 02173
 Distributed in U.S.A. by New Scientific, Div. of Bioscience, Fisher Scientific and Scientific Products, Div. of American Hospital Supply. In Canada by Fisher Scientific Company Ltd.

Obrázek 1: Hemoglobinometr 231 (Zdroj: www.bloodjournal.org).



Obrázek 2: Coulter Counter model S (Zdroj: www.bloodjournal.org).



Obrázek 3: Sysmex CC-1001 (Zdroj: www.bloodjournal.org).



The great slide race



Hema-Tek™ Slide Stainer wins it every time.

Why settle for the slow pace and tedious labor of manual slide staining, when now you can get a slide a minute...minute after minute...automatically...with Hema-Tek Slide Stainer.

With Hema-Tek Slide Stainer there's no contaminated stain. No stain mess. No wasted time. No ruined slides. Slides advance through the 3 staining cycles automatically, are even dried automatically.

Hema-Tek Stain-Pak, specially designed to be used with Hema-Tek Slide Stainer, releases pre-mixed, laboratory-standardized stain, buffer, and rinse onto each slide as the slides advance. Stain-Pak holds enough solutions for 1,000 slides. When solutions run low, you drop in a fresh Stain-Pak. You never have to handle the solutions, and the stain is built-in to minimize precipitation. Moreover, Hema-Tek Slide Stainer frees the technician for other duties during the automatic process.

For complete information on Hema-Tek Slide Stainer and Stain-Pak, write to: AMES COMPANY
4000 Durham Road, Durham, NC 27704



Obrázek 4: Hema-Tek (Zdroj: www.bloodjournal.org).

jako Beckman Coulter. Pracoval na impedančním principu, ovšem před samotným měřením vyžadoval nařazení vzorku, a to pro každou krevní řadu specifickým diluentem. Dnešním analyzátorům se podobal teprve model S z poloviny šedesátých let (obr. 2). Na technologiích tehdy zapracoval i Technicon Instruments (v současnosti Siemens), přičemž vytvořil analyzátor SMA-7A, a Abbott Laboratories zkonstruoval ADC 500. Oba preferovaly optický princip detekce CBC (kompletní blood count), i když impedanci k vyčíslení některých parametrů taktéž využívaly. Záleželo na typu přístroje. Tento přístup zvolil i japonský Sysmex a vytvořil CC-1001 (obr. 3). Později pak vylepšil konstrukci průtokových kvyet včetně techniky hydrodynamické fokusace. Uvedení výrobci tak vyvinuli své originální metody, které si patentovali.

Z menších přístrojů můžeme zmínit Hema-Tek (obr. 4). Ke konci šedesátých let jej zkonstruovala firma Ames Company jako automat na precizní mytí mikroskopických skel. Později byl upgradován na barvicí automat a ve větších provozech se stal vítaným pomocníkem. Společnosti Chrono-Log nebo General Science se zase věnovaly výrobě agregometrů. Induktorem aktivace trombocytů tehdy nejčastěji bylo ADP. V té době se objevily i první poloautomatické koagulometry. Napřed šlo o Fibro System s mechanickou detekcí a posléze výkonnější Fibrometer System (obr. 5) oba od BBL (divize BioQuestu spolupracující s Becton Dickson). Plně automatický uvedli na trh pod označením CoagLab v roce 1970. Co do počtu vzorku byl výkonnějším analyzátozem Lancer od Sherwood Medical Industries s optickou detekcí koagulace (obr. 6). Sysmex sice ve vývoji koagulometrů částečně zaostal, nicméně později začal nabízet několik analytických systémů s celou řadou inovativních koagulačních testů.

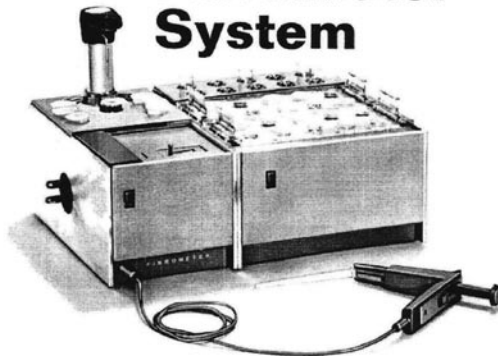
Od sedmdesátých let se výrobci začali orientovat na konstrukci velkokapacitních přístrojů, které by uspokojily i ty největší provozy. Zároveň docházelo

k jejich konsolidaci ve smyslu propojení analyzátozem krevního obrazu s nátérovým, respektive barvicím modulem. Technicon dokonce uvedl na trh HemoLab, o kterém můžeme říci, že představoval zařízení „all in one“. Na jedné platformě se totiž nacházel modul jak pro měření krevního obrazu, tak i pro koagulační vyšetření (obr. 7). Můžeme říci, že od poloviny devadesátých let do současnosti se největší pokroky týkají automatické digitální mikroskopie taktéž ADCM (automated digital cell morphology), kdy zařízení pořizuje mikroskopické snímky standardně obarveného krevního nátéru v digitální podobě. Následně buňky softwarově vyhodnotí dle celé škály přesně definovaných kritérií. Průkopníkem v této oblasti byla firma CellaVision s přístrojem DM 8 a pak DM 96.

Literatura:

- Coller B. Blood at 70: its roots in the history of hematology and its birth. *Blood* 2015; 24: 2548-2559.
- Giangrande P. Historical Review. *British Journal of Hematology* 2003; 121: 703-7012.
- Hoffman R, Benz E. *Hematology: Basic Principles and Practice*. Michigan: Churchill Livingstone 2012.
- Hayhoe F, Quaglini D. *Hematological Cytochemistry*. Michigan: Churchill Livingstone 1994.
- Hrubiško M. *Hematologie a krevní transfuze*. Praha: Avicenum 1983.
- Lehner J, Grave B. *Automation in Hematology*. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2007; 34: 328-339.
- Pecka M. *Praktická hematologie: Laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti Art 2010.
- Robinson J. *Decades of Invention and Discovery*. *Cytometry Part A* 2013; 83: 424-483.

say goodbye to manual coagulation testing with the **Fibrometer[®]** **System**



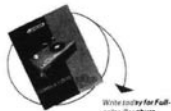
Obrázek 5: Koagulometr Fibrometer System (Zdroj: www.bloodjournal.org).



LANCER[®] COAGULYZER[™]

*THE FULLY AUTOMATIC
COAGULATION ANALYZER
FOR PROTHROMBIN TIMES
WITH SINGLE OR DUAL
REAGENTS, PTT'S, APTT'S,
PROTHROMBIN CONSUMP-
TIONS AND OTHER ASSAYS.*

- **UNATTENDED OPERATION** — Turnable access 1 to 80 reaction cuvettes for automatic testing — less set-up time — more tests.
- **DIGITAL READOUT** — Printed record of each reaction immediately ready for evaluation. Samples identified automatically.
- **HIGHLY ACCURATE — TOTALLY DEPENDABLE** Photo-electric sensor provides reproducible precision within ± 0.2 second. Integrated cuvetry provides reliability. Temperature controlled within $\pm 0.1^\circ\text{C}$.
- **NO CLEANING — NO WASTE REAGENT SYSTEM.** Completely open system eliminates between test cleaning and priming — disposable reagents and pipette tips eliminate cross contamination between runs.



Write today for Full-color Brochure



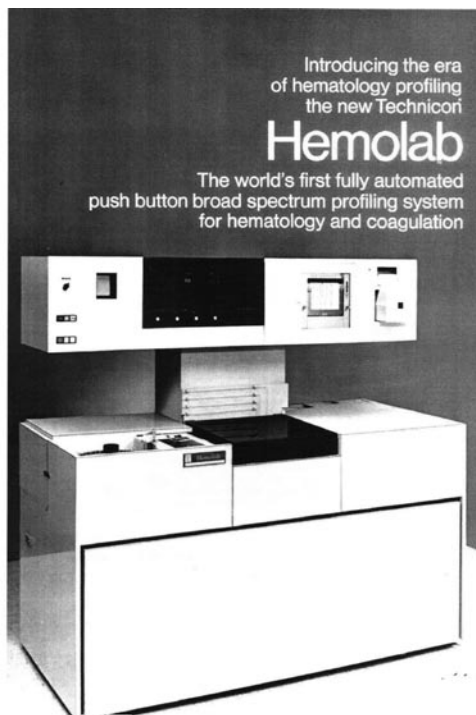
Dual Pipettes With Individual Volume Controls Automate Basic Coagulation Tests



Disposable Accessories Eliminate Cleaning — Prevent Cross Contamination

Sherwood MEDICAL INDUSTRIES INC.
100 N.W. 14th St., Ft. Lauderdale, Florida 33304

Obrázek 6: Optický koagulometr Lancer (Zdroj: www.bloodjournal.org).



Obrázek 7: Analyzátor Hemolab (Zdroj: www.bloodjournal.org).