

**Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
«Научно-исследовательский институт медицины
труда» имени академика Измерова Н.Ф.
Федерального агентства научных организаций**



Автоматизация общего анализа крови Гематологические анализаторы

к.м.н. Цидильковская Э.С.

Гематология – раздел медицины, изучающий строение и функции системы крови:

- самой крови
- органов кроветворения
- органов кроверазрушения

Гематология изучает причины и механизмы развития болезней крови и разрабатывает методы их распознавания, лечения и профилактики.

Назначение гематологических анализаторов

Гематологические анализаторы применяются для диагностики болезней, как кроветворной системы, так и всего организма человека, и предназначены для скринингового анализа в клинико-диагностических лабораториях.



Автоматические методы

За последние годы созданы высокотехнологичные системы анализа крови, которые вытесняют ручные и полуавтоматические методы исследования.

Автоматические методы измерения сделали возможным ввести ряд дополнительных параметров.

Автоматизация в гематологии предлагает новый подход к дифференцированию лейкоцитов. В зависимости от используемого метода достигается трехкомпонентное или пятикомпонентное разделение лейкоцитов.

В большинстве случаев отклонения лейкоцитарной формулы от нормального распределения требуют дополнительного исследования мазок крови под микроскопом.

На основе анализа тысяч клеток гематологические анализаторы способны представлять данные в виде гистограмм – распределений клеток по размерам. Большинство анализаторов представляет в виде гистограмм распределения по размерам тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов. На распечатках результатов помещаются комментарии, описывающую возможную патологию

Диагностические возможности гематологических анализаторов:

- оценка состояния гемопоэза;
- диагностика и дифференциальная диагностика анемий;
- диагностика воспалительных заболеваний;
- оценка эффективности проводимой терапии;
- мониторинг за мобилизацией стволовых клеток из костного мозга.

Несмотря на все достоинства, даже самые современные гематологические анализаторы обладают некоторыми ограничениями, которые касаются точной морфологической оценки патологических клеток (например, при лейкозах), и не в состоянии полностью заменить световую микроскопию.

Гематологические анализаторы имеют систему обозначения - флаги или "сигналы тревоги" - указывающую на отклонение параметров от установленных границ.

Они могут касаться как увеличения или уменьшения количества тех или иных клеток, так и изменения их функционального состояния, которое отражается на характеристиках измеряемых прибором клеток.

Во всех этих случаях необходим строгий визуальный контроль окрашенных препаратов с соответствующими комментариями.

Автоматические методы

Преимущества автоматического анализа крови:

- высокая производительность (30–100 и более проб в час)
- высокая точность исследования (подсчет многих тысяч клеток вместо сотни)
- небольшой объем крови (25–100 мкл)
- большое количество показателей (12–25 параметров) вместо 10-12 при обычном анализе
- графическое представление распределения клеток (гистограммы)
- повышение объективности исследований (минимум вмешательства оператора)

Автоматические методы

Преимущества автоматического анализа крови:

- облегчение труда лаборантов, устранение монотонных рутинных операций
- скрининговый анализ в клинико-диагностических лабораториях
- ведение контроля качества (расчет среднего, SD, %CV, построение контрольных карт)
- хранение результатов и формирование отчета
- ведение статистики измерений
- автоматический контроль основных функций анализатора, тест самопроверки

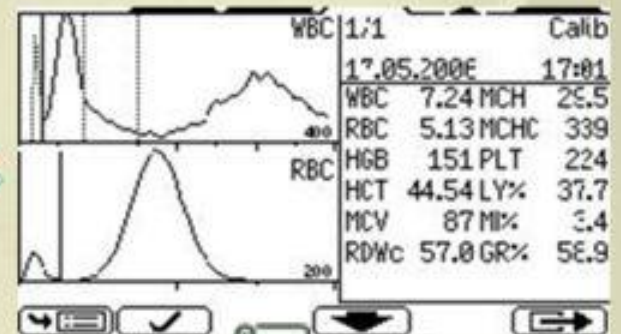
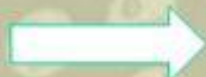
Автоматизированное исследование крови необходимо проводить в промежутке 0-5 мин. или через 1 час и позже после взятия крови. В промежутке 5 мин. - 1 час происходит временная агрегация тромбоцитов, что может привести к их ложному снижению в пробе крови.

Общие проблемы

- ◆ Пробоподготовка (взятие пробы, соответствующий антикоагулянт)
- ◆ Время между измерением и взятием пробы
- ◆ Окружение (электромагнитные шумы, пыль)
- ◆ Электричество (хорошее заземление, отсутствие электрических шумов)
- ◆ Реагенты (качество, правильный тип)
- ◆ Контрольная кровь (использование и правильное обращение)
- ◆ Закупорка апертуры (причины, как избежать)

Порядок работы

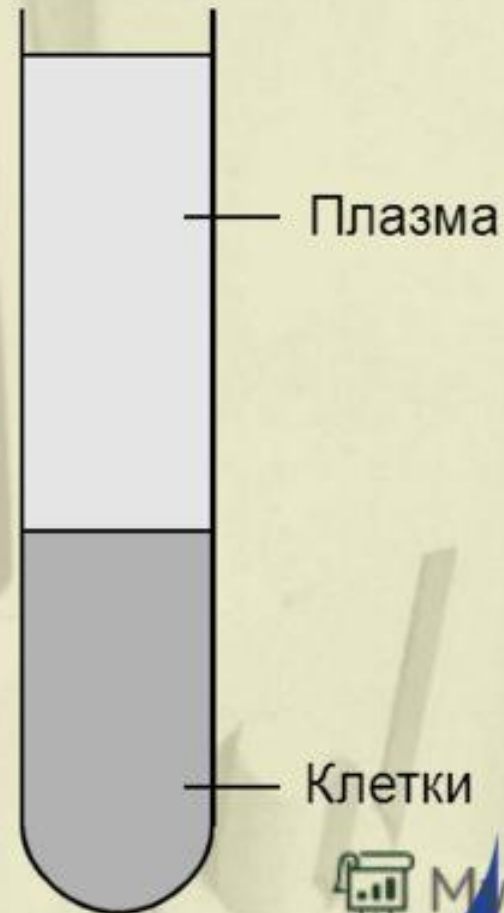
1. Забор крови и смешивание крови с соответствующим антикоагулянтом (ЭДТА).
2. Включение анализатора (выполнение автоматических процедур перед началом работы: проверка, заполнение реагентами, измерение бланка).
3. Установка пробирки с кровью в анализатор.
4. Запуск измерения (кнопка START).
5. Автоматический анализ пробы и выдача результатов на дисплей или принтер.



Пробы крови

Без антикоагулянта

С антикоагулянтом ЭДТА



Автоматические счетчики крови оценивают размеры, структурные, цитохимические и другие характеристики клеток.

Они анализируют около 10000 клеток в одном образце и имеют несколько различных каналов подсчета клеточных популяций и концентрации гемоглобина.

На основании количества определяемых параметров и степени сложности их можно условно разделить на **3 основных класса**:

I класс - автоматические гематологические анализаторы, определяющие до 20 параметров, включая расчетные показатели красной крови и тромбоцитов, гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, а так же частичную дифференцировку лейкоцитов на три популяции - лимфоциты, моноциты и гранулоциты.

Анализаторы I класса: MEK-6400J/K фирмы Nihon Kohden (Япония), Адвия 60 фирмы Bayer (Германия), COULTER Ac*Т фирмы Beckman Coulter (Франция).

В основе работы анализаторов I-го класса лежит кондуктометрический метод.

II класс - высокотехнологичные гематологические анализаторы, позволяющие проводить:

- развернутый анализ крови, в том числе полную дифференцировку лейкоцитов по 5-ти параметрам (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты),
- гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, скатерограммы (Pentra-60, Cell-Dyn 3700, МЕК-8222).

III класс - сложные аналитические системы,
выполняющие не только развернутый анализ крови с
дифференцировкой лейкоцитов по 5 параметрам,
но и подсчет и анализ ретикулоцитов, некоторых
субпопуляций лимфоцитов;
при необходимости комплектуются блоком для
автоматического приготовления и окраски мазков из
заданных образцов крови (Sysmex ХЕ-2100, Coulter LH750,
Advia 2120, Pentra 120).

Анализаторы II и III-го классов используют в своей
работе комбинации разных методов.

Метод измерения

Работа практически всех современных гематологических анализаторов основана на кондуктометрическом методе, разработанном братьями Coulter еще в 1949 г. С тех пор он значительно усовершенствовался.

В последующих модификациях приборов добавлены специальные дифференцирующие гемолитики, лазерное светорассеяние, цитохимия и т.д.

Метод (также может называться – волюметрический метод импеданса) позволяет подсчитать количество клеток и охарактеризовать объем клетки.

Принцип кондуктометрического метода

Проба разводится дилуентом (изотонический раствор), который может проводить электрический ток.

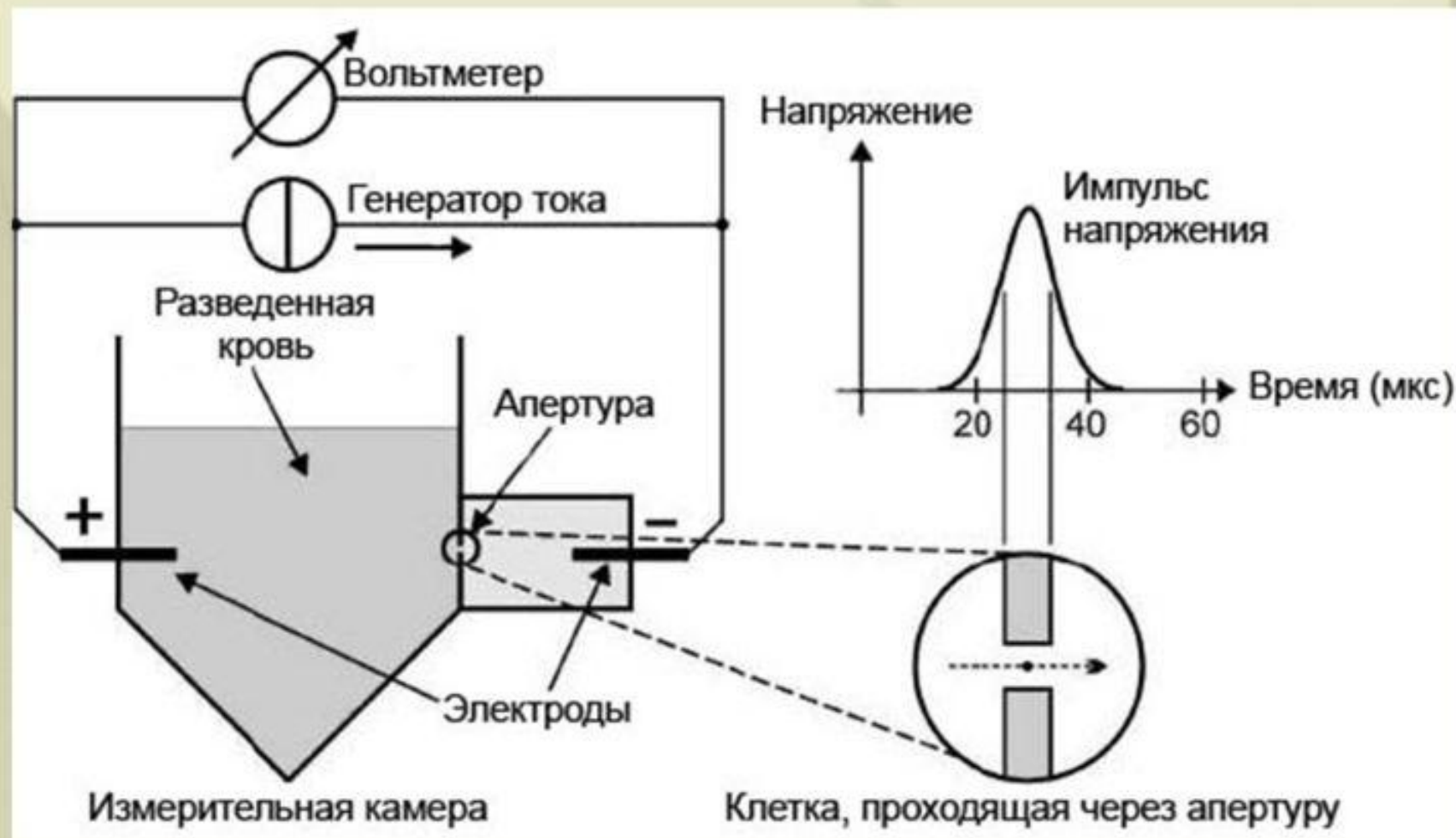
Измерительная камера сделана из диэлектрика, в ней расположены два электрода, разделенные перегородкой с малой апертурой (обычно 80 или 100 мкм). Между электродами подается электрический ток.

Включается насос, проба крови прокачивается через апертуру. При прохождении клетки через апертуру появляется электрический импульс.

Количество импульсов соответствует количеству клеток в заданном объеме.

Амплитуда импульсов пропорциональна размеру клеток.

Принцип кондуктометрического метода



Если в один и тот же момент в канале находятся две клетки, они регистрируются в виде одного импульса, что приведет к ошибке подсчета клеток. Во избежание этого, проба крови разводится до такой концентрации, при которой в канале датчика всегда будет не больше одной клетки.

Апертуро-импедансный метод позволяет определять большинство эритроцитарных и тромбоцитарных показателей, связанных с объемом клеток (HCT, MCV, MCH, MCHC, MPV), а также является основой для дифференцировки лейкоцитов по трем параметрам.

Подсчет эритроцитов и тромбоцитов

Разделение эритроцитов и тромбоцитов в современных анализаторах проводится по измерению амплитуды электрического сигнала: тромбоциты (небольшие по размеру клетки) при прохождении измерительного канала генерируют электрические импульсы низкой амплитуды, а сравнительно большие клетки - эритроциты и лейкоциты - импульсы высокой амплитуды.

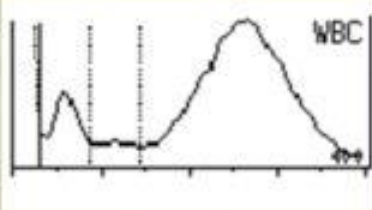
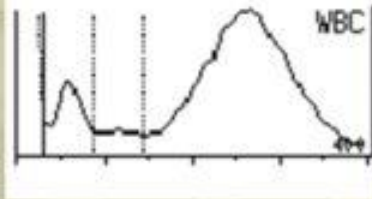
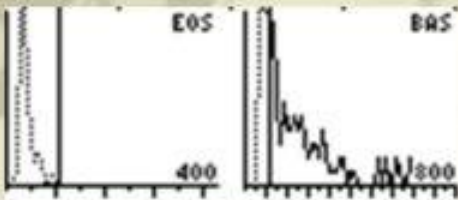
После лизиса эритроцитов в суспензии остаются лейкоциты. Из первого счета импульсов высокой амплитуды вычитают импульсы высокой амплитуды второго счета (лейкоциты). Разница импульсов высокой амплитуды до и после лизиса соответствует количеству эритроцитов.

Расчет величины гематокрита, эритроцитарных и тромбоцитарных индексов

Устройство, которое разделяет импульсы по величине амплитуды, называется дискриминатор. В современных анализаторах применяются многоканальные дискриминаторы, позволяющие получить детальную информацию о размерах клеток в виде гистограмм, поскольку каждый канал соответствует определенному объему клеток. При суммировании амплитуд импульсов, получаемых при подсчете количества эритроцитов, получается величина, отражающая общий объем, занимаемый эритроцитами, то есть гематокрит Hct. Разделив гематокритную величину на концентрацию эритроцитов, получается средний объем эритроцитов - MCV.

Модельный ряд

Анализатор	Параметры	Производительность	
Abacus Junior B		8 параметров	25-30 тестов в час
Abacus Junior B		12 параметров	25-30 тестов в час
Abacus Junior		18 параметров (с дифференцировкой лейкоцитов на 3 части)	35-40 тестов в час
Abacus Junior 5		22 параметра (с дифференцировкой лейкоцитов на 5 частей)	30 тестов в час (5) 45 тестов в час (3)
Abacus		18 параметров (с дифференцировкой лейкоцитов на 3 части)	60-70 тестов в час
Abacus +		20 параметров (с дифф. лейкоцитов на 3 части) + 11 параметров мочи	60-70 тестов в час + 60 тестов мочи в час
Abacus Junior Vet		18 параметров (с дифференцировкой лейкоцитов на 3 части)	22-25 тестов в час
Abacus Junior Eo		20 параметров (с дифференцировкой лейкоцитов на 4 части)	20 тестов в час (4) 28 тестов в час (3)
Abacus 5		22 параметра (с дифференцировкой лейкоцитов на 5 частей)	60-70 тестов в час

<p>Лейкоциты – WBC (клеток/л, клеток/мкл)</p>	<p>Количество лейкоцитов. $WBC = WBC_{cal} \times$ (клеток/л или клеток/мкл)</p>
<p>Дифференцировка лейкоцитов на 3 части:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. LYM, LY%: лимфоциты 2. MID, MID%: моноциты и некоторые эозинофилы 3. GRA, GR%: нейтрофилы, эозинофилы и базофилы 	<p>Абсолютные значения подсчитываются по каналам, заданным по трем дискриминаторам лейкоцитов (WBC): Проценты рассчитываются по абсолютным значениям WBC.</p>  <ol style="list-style-type: none"> 1.: RBC-LYM discriminator 2.: LYM-MID discriminator 3.: MID-GRA discriminator
<p>Дифференцировка лейкоцитов на 5 частей:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. LYM, LYM%: лимфоциты 2. MON, MON%: моноциты и некоторые эозинофилы 3. NEU, NEU% нейтрофилы 	<p>Абсолютные значения подсчитываются по каналам, заданным по трем дискриминаторам лейкоцитов (WBC): Проценты рассчитываются по абсолютным значениям WBC.</p>  <ol style="list-style-type: none"> 1.: RBC-LYM discriminator 2.: LYM-MID discriminator 3.: MID-GRA discriminator
<ol style="list-style-type: none"> 4. BAS, BAS% базофилы 5. EOS, EOS% эозинофилы 	<p>Каждая кривая распределения представляет данную популяцию лейкоцитов.</p> 

Определяемые параметры

Эритроциты – RBC
(клеток/л, клеток/мкл)

Количество эритроцитов.
 $RBC = RBC_{cal} \times (\text{клеток/л или клеток/мкл})$

Клинико-диагностическое значение

Увеличение

Реактивные эритроцитозы, вызванные недостатком O₂ в тканях:

- Врожденные и приобретенные пороки сердца
 - Легочное сердце
 - Эмфизема легких
- Пребывание на значительных высотах

Реактивные эритроцитозы, вызванные повышенным образованием эритропоэтинов:

- Поликистоз почек
 - Водянка почечных лоханок
- Новообразования (гемангиобластома, гепатома, феохроцитомы)
 - Влияние кортикостероидов
- Болезнь и синдром Кушинга
 - Лечение стероидами

Эритремия

- Дегидратация

Уменьшение

- Анемии
 - Острая кровопотеря
- Поздние сроки беременности
 - Гипергидратация

Определяемые параметры

Концентрация гемоглобина –
HGB (г/дл, г/л, ммоль/л)

Фотометрическое измерение при 540 нм; в каждом цикле выполняется измерение бланка по реагенту.
 $HGB = HGB_{cal} \times (HGB_{пробы} - HGB_{blank})$

Клинико-диагностическое значение

Повышение концентрации

- Первичные и вторичные эритремии
- Обезвоживание

Снижение концентрации

- Анемии
- Гипергидратация

Внимание!

1. Анемии определяются как снижение общего количества гемоглобина. При диагностике анемий всегда следует соотносить значение показателя с возрастом и полом пациента. Диагностика типа анемии требует проведения дополнительных биохимических и гематологических анализов.
2. У больных, у которых гемоглобин выше 75 г/л, препараты железа могут вызвать в течение 10 дней рост гемоглобина на 20-30 г/л (это не означает компенсацию дефицита железа!).
3. Переливание 500 мл крови (или 1 единицы эритроцитарной массы – около 300 мл) больному с массой тела 70 кг вызывает увеличение гемоглобина на 12 г/л.

**Средний объем эритроцитов
– MCV** (фл)

Средний объем эритроцитов определяется по RBC-гистограмме.

Значения, находящиеся в пределах 80-100 фл, характеризуют эритроцит как нормоцит, ниже 80 фл – как микроцит, а выше 100 фл – как макроцит. MCV используется главным образом для характеристики типа анемии.

Клинико-диагностическое значение

MCV < 80 фл	MCV > 80 фл и < 100 фл	MCV > 100 фл
Микроцитарные анемии Железодефицитные анемии Талассемии Сидеробластические анемии Анемии, которые могут сопровождаться микроцитозом Гемолитические анемии Гемоглобинопатии	Нормоцитарные анемии Апластические анемии Гемолитические анемии Гемоглобинопатии Анемии после кровотечений Анемии, которые могут сопровождаться нормоцитозом Регенераторная фаза железодефицитной анемии Миелодиспластические синдромы	Макроцитарные и мегалобластные анемии Дефицит витамина B12, фолиевоедефицитной кислоты Анемии, которые могут сопровождаться макроцитозом Миелодиспластические синдромы Гемолитические анемии Болезни печени

Внимание!

1. Изменения MCV могут служить для определения нарушений водно-электролитного обмена. Повышение значений MCV будет свидетельствовать о гипотоническом нарушении, тогда как понижение значений MCV – о гипертоническом нарушении.
2. При оценки нарушений водно-электролитной системы можно пользоваться вычисленным MCV (формула дана выше). В этом случае не следует пользоваться значениями MCV, полученными с помощью гематологических счетчиков, так как они измеряют эритроциты в искусственной изоосмотической среде.

Определяемые параметры

Среднее содержание
гемоглобина в эритроците –
MCH (пг, фмоль)

Среднее содержание гемоглобина в эритроците
рассчитывается по значениям RBC и HGB.
 $MCH = HGB / RBC$

В современных гематологических анализаторах этот показатель определяется автоматически. MCH должен коррелировать со значениями MCV (средний объем эритроцитов) и MCHC (средняя концентрация гемоглобина в эритроците). MCH используется для характеристики анемии.

Клинико-диагностическое значение

Повышение (> 33 пг)

- Гиперхромные анемии
- Мегалобластные
- Сопровождающие цирроз печени

Снижение (< 27 пг)

- Гипохромные анемии
- Анемии при злокачественных опухолях

Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах – МСНС (г/дл, г/л, ммоль/л)

Рассчитывается по значениям HGB и HCT.

$МСНС = HGB / HCT$ (абсолют.)

Единицы измерения отражаются в соответствии с выбором единиц для результатов HGB (г/дл, г/л или ммоль/л)

МСНС определяет насыщенность эритроцитов. **МСНС** должен коррелировать с показателями MCV и MCH.

Клинико-диагностическое значение

Повышение

- Гиперхромные анемии – сфероцитоз, овалоцитоз
- Гипертонические нарушения водно-электролитной системы

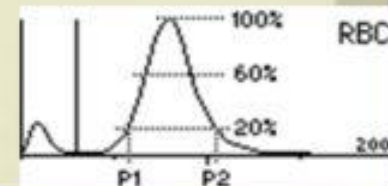
Снижение до уровня < 31 г/дл

- Гипохромные анемии
- Гипотонические нарушения водно-электролитной системы

Внимание!

1. Верхняя граница растворимости HGB в воде составляет 37 г/дл, поэтому повышение, выходящее за рамки нормальных значений МСНС, отмечается чрезвычайно редко.
2. Результаты выше 37 г/дл являются четким указанием повторить анализ.
3. для определений нарушений в водно-электролитной системе следует анализировать изменения значений МСНС, а не их абсолютные величины.
4. при оценки нарушений водно-электролитной системы можно пользоваться вычисленным МСНС (формула дана выше). В этом случае не следует пользоваться значениями МСНС. Полученными с помощью гематологических счетчиков, так как они измеряют эритроциты в искусственной изоосмотической среде.

Определяемые параметры

<p>Широта распределения эритроцитов – RDW-SD (фл) и Широта распределения эритроцитов – RDW-CV (%)</p>	<p>Широта распределения популяции эритроцитов и тромбоцитов определяется по гистограмме по 20% ликам $x\text{DW-SD} = \text{RDW cal} \times (P2 - P1)$ (фл), $x\text{DW-CV} = \text{RDW cal} \times 0.56 \times (P2 - P1) / (P2 + P1)$ CV корректируется по фактору 0,56 к 60% выборке</p>	
---	--	---

RDW является мерой различия эритроцитов по объему (анизоцитоза). Аналогичную функцию выполняет кривая Прайс-Джонса, подсчет которой вручную чрезвычайно утомителен. Высокое значение RDW означает гетерогенность популяции эритроцитов при наличии в пробе крови нескольких популяций эритроцитов (например, после переливания крови). RDW вместе с MCV служит для дифференциации микроцитарных анемий. RDW следует анализировать вместе с гистограммой эритроцитов, которую представляют большинство современных гематологических анализаторов.

Клинико-диагностическое значение

Значение MCV > 80 фл, RDW в норме:

- Анемии при хронических заболеваниях
- Талассемия

Значение MCV > 80 фл, RDW высокое:

- Железодефицитные анемии
- Сидеробластические анемии

Повышенное RDW отмечается при:

- Макроцитарных анемиях
- Миелодиспластических синдромах
- Костно-мозговой метаплазии
- Метастазах новообразований в костный мозг

Анизоцитоз

- улавливается прибором значительно быстрее, чем при визуальном просмотре мазка крови, так как прибор измеряет непосредственно объем клеток, а морфолог под микроскопом видит клетку в плоскости и может пропустить начальные изменения объема.
- оценка степени анизоцитоза под микроскопом сопровождается целым рядом ошибок. При высыхании в мазках диаметр эритроцитов уменьшается на 10-20%. В толстых препаратах он меньше, чем в тонких.

Показатель RDW характеризует колебания объема клеток внутри популяции и не связан с абсолютной величиной объема эритроцитов:

- При наличии в крови популяции эритроцитов с измененным, но достаточно однородным размером (например, микроциты), значения RDW могут быть в пределах нормы (11,5-14,5%).
- При выраженном анизоцитозе эритроцитов показатель MCV, характеризующий средний объем всей клеточной популяции, является нормальным, а RDW будет повышенным.
- Сочетанное использование двух параметров - RDW и MCV - позволяет точнее характеризовать изменения в периферическом звене эритрона.

Определяемые параметры

Гематокрит – HCT
(%, абсолютное значение)

Рассчитывается по значениям RBC и MCV.

$HCT (\%) = RBC \times MCV \times 100$, $HCT (\text{абсолют.}) = RBC \times MCV$

Гематокрит представляет собой объемную фракцию эритроцитов в цельной крови и зависит от их количества и объема.

Клинико-диагностическое значение

Повышение гематокритной величины

- Эритроцитозы
- Хронические заболевания легких
- Нахождение на больших высотах
- Новообразования почек, сопровождающиеся усиленным образованием эритропоэтина
- Поликистоз почек
- Состояния уменьшения объема циркулирующей плазмы
- Ожоговая болезнь
- Перитонит
- Дегидратация
- Профузный понос
- Неукротимая рвота
- Диабет
- Чрезмерное потоотделение

Снижение гематокритной величины

- Анемии
- Состояния увеличенного объема циркулирующей плазмы
- Беременность (особенно вторая половина)
- Гиперпротеинемии
- Гипергидратация

Определяемые параметры

Тромбоциты – PLT (клеток/л, клеток/мкл)	Количество тромбоцитов $PLT = PLT_{cal} \times$ (клеток/л, клеток/мкл)
Средний объем тромбоцитов – MPV (фл)	Определяется по PLT-гистограмме.
Тромбокрит – PCT (%, абсолютное значение)	Рассчитывается по значениям PLT и MPV. $PCT (\%) = PLT \times MPV \times 100,$ $PCT (\text{абсолют.}) = PLT \times MPV$

Тромбоциты – это безъядерные клетки диаметром 2-4 мкм. Их образуют мегакариоциты костного мозга. Основная роль тромбоцитов в организме – участие в первичном гемостазе. Физиологические изменения количества тромбоцитов в течение суток составляют около 10%. У женщин во время менструаций количество тромбоцитов может уменьшиться на 25-50%.

Внимание!

В результате неправильного взятия крови (плохое размешивание, взятие крови стеклянным шприцем) могут возникнуть микротромбы и произойти значительное уменьшение количества тромбоцитов.

Ручные методы определения количества тромбоцитов имеют ошибку от 10 до 25%.

Автоматизированные методы подсчета тромбоцитов в зависимости от аппаратуры дают ошибку в 1-5%.

Тромбоциты (PLT). Клинико-диагностическое значение

Увеличение

- Миелопролиферативные синдромы (эритремия, миелофиброз)
- Хронические воспалительные заболевания (ревматоидное воспаление суставов, туберкулез, цирроз печени)
- Злокачественные новообразования
- Кровотечения
- Период выздоровления от мегалобластических анемий
- Лечение кортикостероидами
- Состояние после спленэктомии
- Острый гемолиз
- Физическое перенапряжение

Снижение

• Тромбоцитопении, вызванные снижением образования тромбоцитов:

- Наследственные
- Синдром Франкони
- Врожденная тромбоцитопения
- Краснуха новорожденных
- Гистиоцитоз
- Приобретенные
- Апластическая анемия
- Метастазы новообразований в костный мозг
- Лейкозы
- Ионизирующее облучение, миелодепрессивные препараты
- Циклическая тромбоцитопения
- Дефицит витамина В12 и фолиевой кислоты
- Вирусные инфекции
- Пароксизмальная ночная гемоглобинурия
- Почечная недостаточность

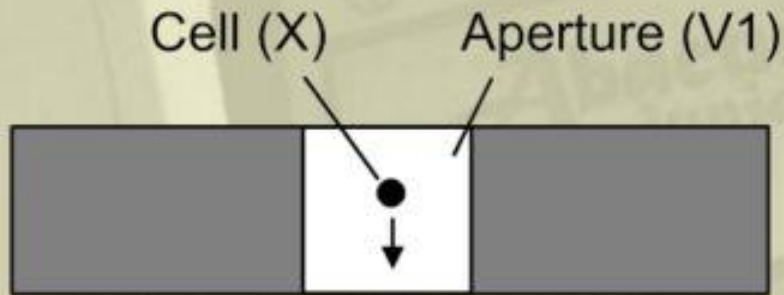
Тромбоциты (PLT). Клинико-диагностическое значение

Снижение

- Тромбоцитопении, вызванные повышенным разрушением тромбоцитов
 - Инфекции
 - Эклампсия беременных
 - Гемолитико-уремический синдром
 - ВИЧ-инфекция
- Тромбоцитопении, вызванные секвестрацией тромбоцитов
 - Тромбоцитопеническая пурпура
 - Гиперспленизм
 - ДВС-синдром
 - Кровотечения
 - Гемодиализ

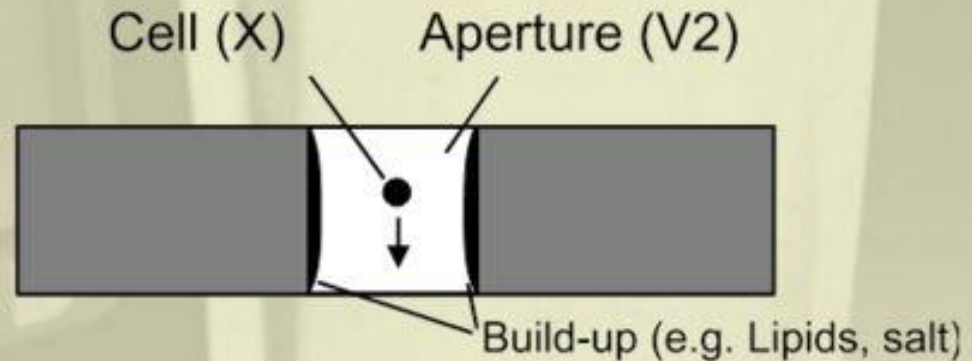
Эффект засора апертуры

Clean aperture



$$MCV1 \sim \frac{X}{V1}$$

Partially clogged aperture



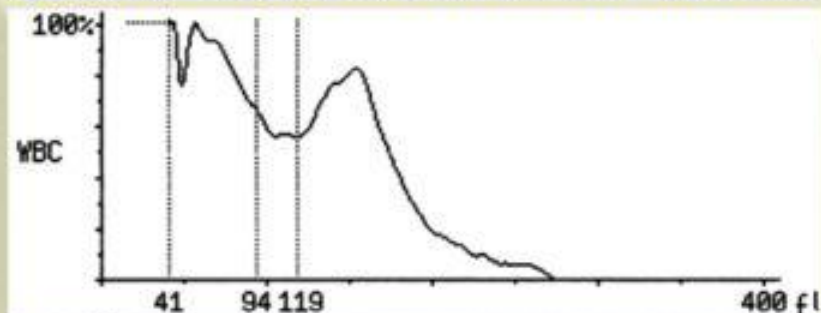
$$MCV2 \sim \frac{X}{V2}$$

$$V2 < V1 \longrightarrow MCV2 > MCV1$$

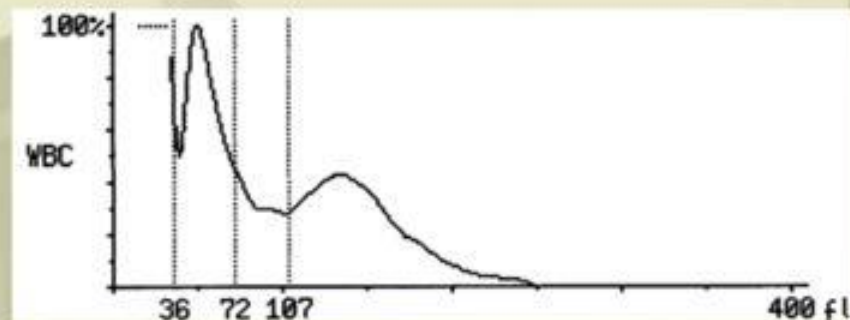
Эффекты количества гемолитика при дифференцировке WBC на 3 части



Пример «недолизированной» пробы:

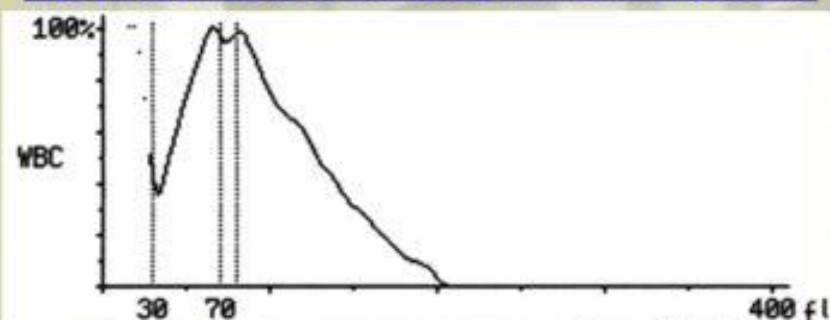


В недостаточно лизированных пробах некоторое количество эритроцитов RBC подсчитывается как лейкоциты WBC
WBC=16.9 больше референсного, LYM% высокий

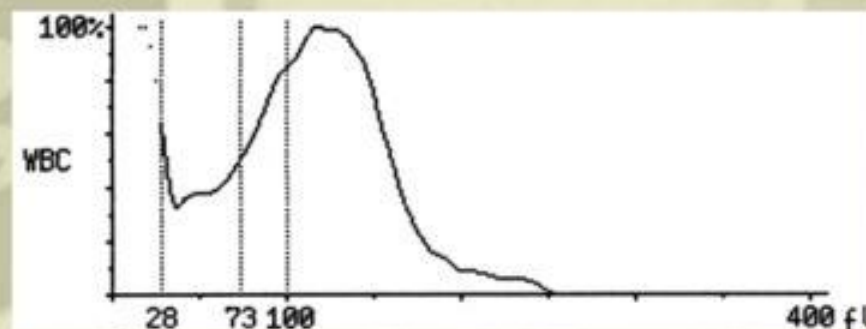


Та же проба с увеличением гемолитика (+0.1 мл)
WBC = 13.7, корректный результат, хорошая дифференцировка на 3 части

Пример «перелизированной» пробы:



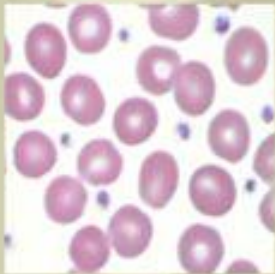
В чрезмерно лизированных пробах LYM и GRA перекрывают друг друга
WBC = 20.6 корректный результат, плохая дифференцировка на 3 части



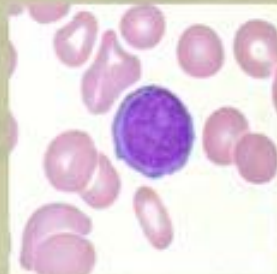
Та же проба с уменьшением гемолитика (-0.1 мл)
WBC = 21.0 корректный результат, хорошая дифференцировка на 3 части

Процесс дифференциального лизиса (1)

PLT & RBC



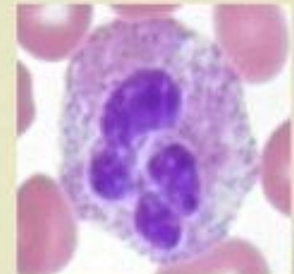
LYM



MID

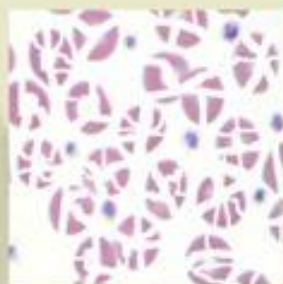


GRN



+ Лизирующий реагент для дифференцировки

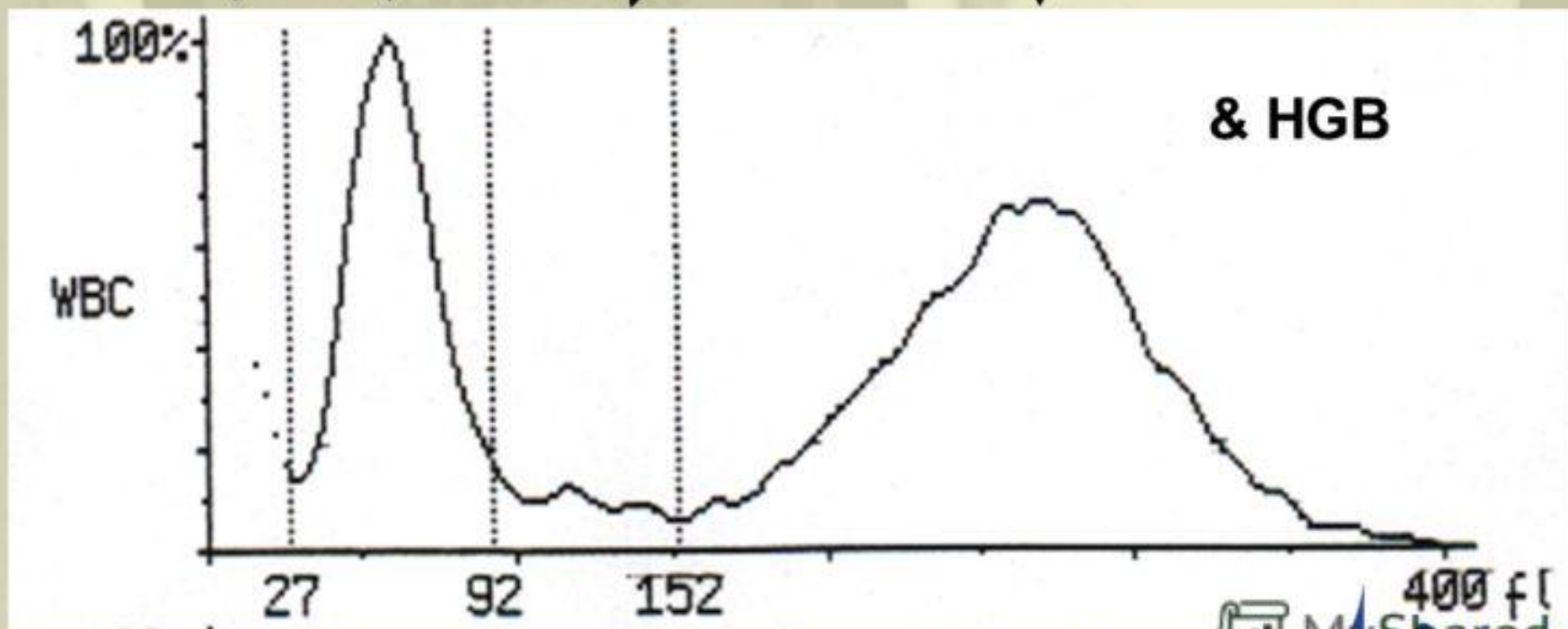
Процесс дифференциального лизиса (2)



LYM

MID

GRA



Проточная цитометрия

Метод оптического измерения параметров клетки, ее органелл и происходящих в ней процессов.

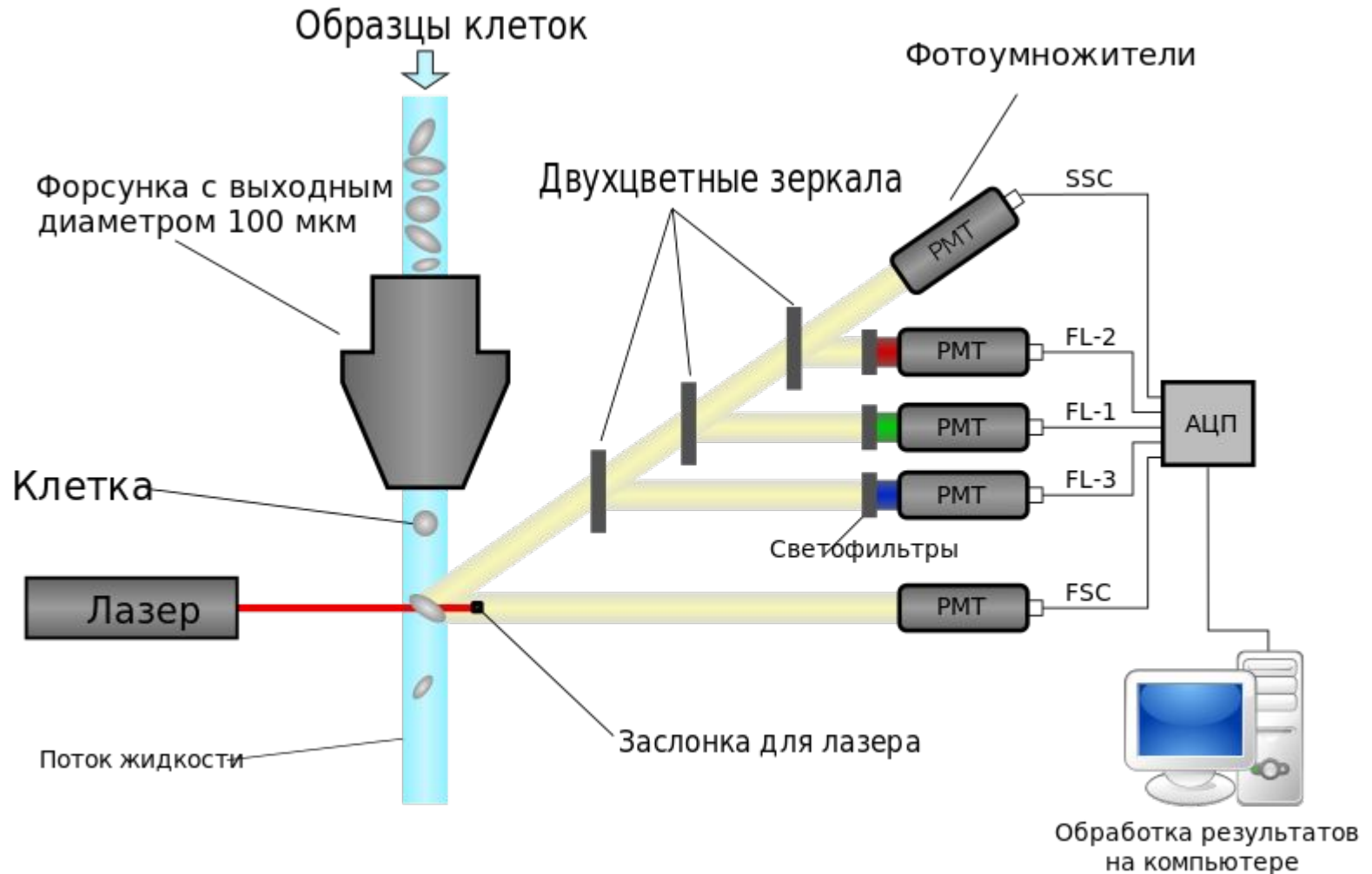
Методика заключается в выявлении рассеяния света лазерного луча при прохождении через него клетки в струе жидкости, причём, степень световой дисперсии позволяет получить представление о размерах и структуре клетки.

Клеточная суспензия, предварительно меченная флюоресцирующими моноклональными антителами или флуоресцентными красителями, попадает в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку. Условия подобраны таким образом, что клетки выстраиваются друг за другом за счет т. н. гидродинамического фокусирования струи в струе.

В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют:

- рассеяние света под малыми углами (от 1° до 10°) (данная характеристика используется для определения размеров клеток).
- рассеяние света под углом 90° (позволяет судить о соотношении ядро/цитоплазма, а также о неоднородности и гранулярности клеток).
- интенсивность флуоресценции по нескольким каналам флуоресцентности (от 2 до 18-20)- позволяет определить субпопуляционный состав клеточной суспензии и др.

Принцип проточной цитометрии



Рассеивание клетками лазерного пучка

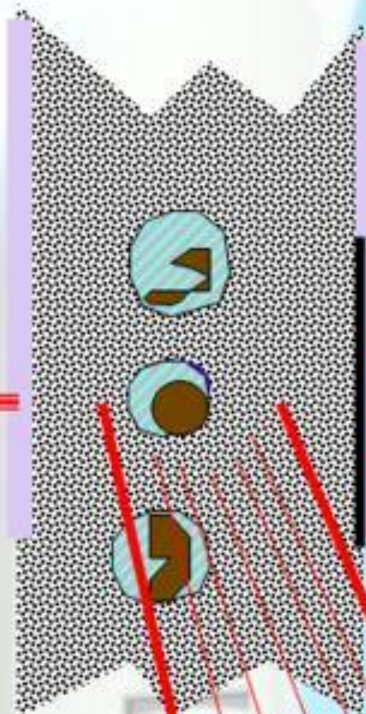
Лазер



Abacus5

Diatron

Abacus5

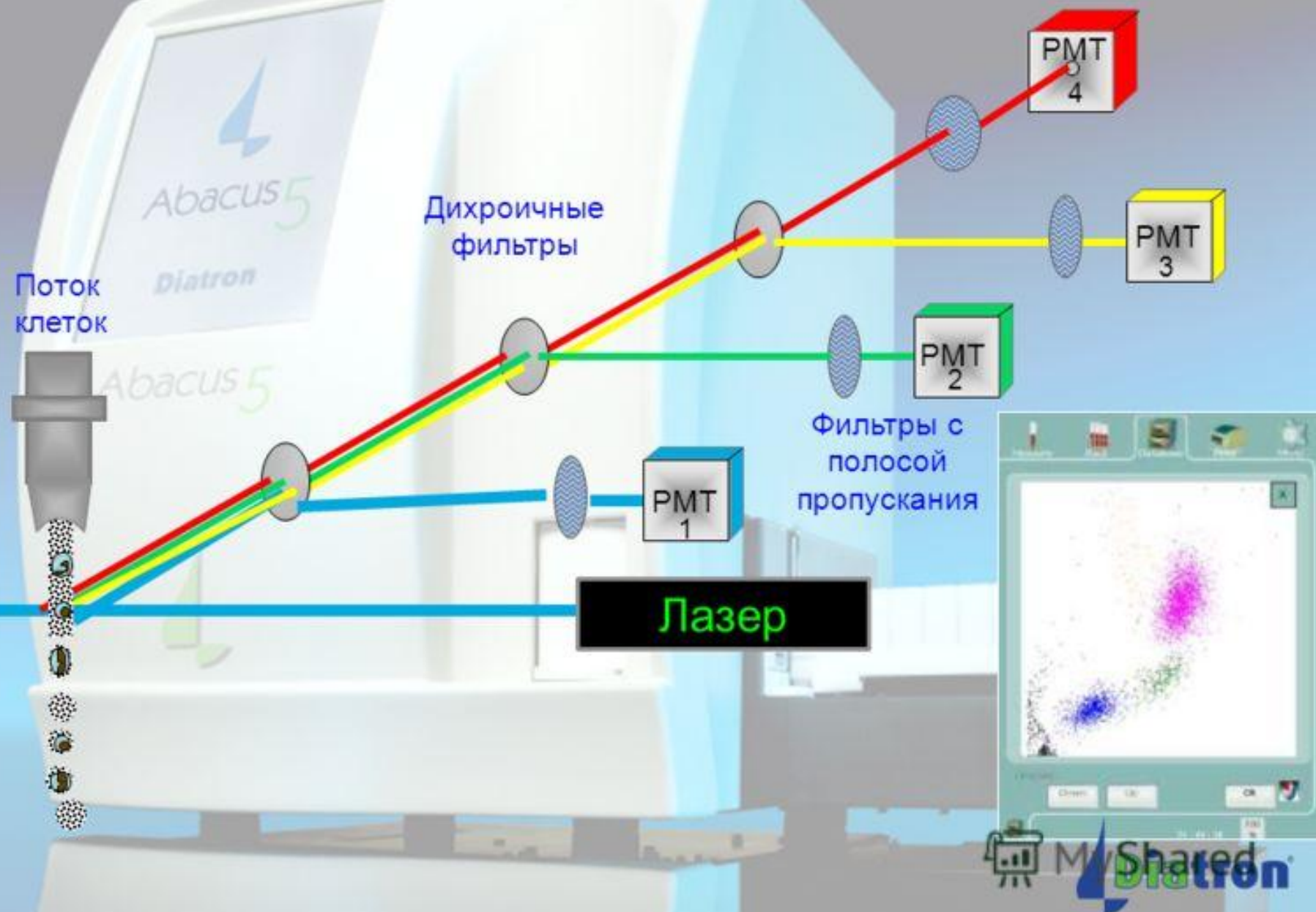


Сенсор
прямого
излучения



90° сенсор излучения

Схема лазерной проточной цитометрии



Пробоподготовка крови

Так как между сбором проб и их анализом обычно проходит какое-то время, необходимо предупредить свертывание крови с помощью антикоагулянта для предотвращения образования больших групп клеток в сгустках и закупорку такими сгустками апертуры камеры измерения.

Выбор антикоагулянта очень важен, так как некоторые антикоагулянты влияют на форму и размер клеток крови. Обычно только один антикоагулянт рекомендуется для использования с гематологическими анализаторами – это **EDTA (ЭДТА, трилон Б)**, предпочтительнее соль натрия или калия.

Следует соблюдать осторожность при использовании самостоятельно приготовленных контейнеров с ЭДТА. Если контейнер не наполнен до нужного уровня, отношение EDTA к цельной крови будет слишком большим, вследствие чего из-за повышения осмотического давления происходит сжатие эритроцитов (RBC).

Пробы крови

Обычно мы рекомендуем использование пробирок для проб с необходимым количеством ЭДТА, произведенных фабричным способом, также необходимо наполнять их кровью до указанного на них уровня.

Отношение ЭДТА к цельной крови не должно превышать 3 мг/мл.

Концентрация ЭДТА: 2,0 мг на 1 мл цельной крови
(допустимый разброс: 1,5–3,0 мг/мл).

Пример соотношения:

Капиллярная кровь: 100 мкл крови + 10 мкл 2% раствора ЭДТА

Венозная кровь: 10 мл крови + 100 мкл 20% раствора ЭДТА

Сразу перемешать!

Стабильность проб:

- при комнатной температуре – 4 часа
- при 2-8°C – сутки

Клетки крови

Название	RBC, Red Blood Cell	WBC, White Blood Cell	PLT, Platelet
Другие названия	Эритроциты	Лейкоциты	Тромбоциты
Ядра	Зрелые клетки не имеют ядер	Ядерные	Неядерные фрагменты
Популяция	4,5-5,5 млн/мкл	5-10.000/мкл	150-300.000/мкл
Субпопуляции	RBC, NRBC (эритроциты и ядерные эритроциты)	Полиморфноядерные клетки (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы) Лимфоциты Моноциты	
Средний диаметр	7-8 мкм толщина \approx 1,8-2,0 мкм	NEU \approx 13 мкм EOS \approx 16 мкм BAS \approx 14 мкм LYM \approx 8-15 мкм MON \approx 15-25 мкм	2-4 мкм
Средний объем	\approx 90 фл	различный	\approx 12 фл

Границы норм (человек)



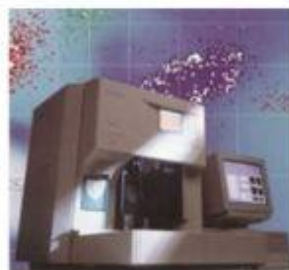
ПАРАМЕТРЫ	Neonate новорожден ный	Baby младенец 3 месяца	Toddler ребенок 1 год	дети 1-6 лет	Child дети 6-14 лет	Male мужчина	Female женщина
WBC 10 ⁹ /л	9-30	5-19	5-19	5-19	4.8-10.8	5-10	4-10
RBC 10 ¹² /л	4-6	3.8-4.8	3.9-5.3	3.9-5.3	4-5.2	4.5-5.5	4-5
HGB г/л	145-245	100-173	95-140	95-140	103-140	120-165	115-150
HCT %	44-64	35-49	36-44	30-42	32-42	45-52	36-48
MCV фл	98-110	83-97	70-84	70-84	73-87	84-96	76-96
MCH пг	34-40	27-33	23-31	23-29	32-36	30-35	30-35
MCHC г/дл	33-37	31-35	30-35	31-35	30-35	31.5-36	31.5-36
RDW-CV %	<16	<16	<16	<16	<16	<16	<16
PLT 10 ⁹ /л	140-300	150-450	150-450	150-450	150-450	150-400	150-400
MPV фл	8-15		8-15		8-15	8-15	8-15
NEU% %	40-80	20-46	18-44	18-44	37-65	50-68	50-68
EOS% %	0-4	0-3	0-3	0-3	0-3	1-3	1-3
BAS% %	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1
LYM% %	26-68	42-72	46-72	46-76	27-57	25-40	25-40
MON% %	0-9	0-6	0-6	0-5	0-5		

Концепция X-класса

- ▶ Все анализаторы имеют **одинаковые** функции, черты, технологию, реагенты и систему флагов
- ▶ **Отличия** заключаются только в числе каналов, скорости и способе загрузки проб



XE-5000



XE-2100



XT-2000i & XT-1800i



XS-1000i & XS-800i

Линейка анализаторов Sysmex' X-класса: Гематология сегодня – это проточная цитофлюориметрия



XE-5000:

- ▶ **Case Manager**
- ▶ **76** параметров, 8 скатерограмм, 2 гистограммы (вкл. NRBC, расширенное меню для RET, IG, HPC, IPF)
- ▶ Отдельный режим для анализа **жидкостей тела**
- ▶ Самая быстрая система в мире: 150 проб/час.



XE-2100:

- ▶ **45** параметров, 7 скатерограмм, 2 гистограмм (вкл. NRBC, расширенное меню RET, IG, HPC, IPF)
- ▶ Самая быстрая система в мире: 150 проб/час.

Линейка анализаторов Sysmex' X-класса: Гематология сегодня – это проточная цитофлюориметрия



XT-2000i и XT-1800i:

- ▶ 33 или 26 параметров (вкл. расширенное меню RET, IG)
- ▶ 5 или 2 скатерограммы, 2 гистограммы
- ▶ Производительность 80 проб/час в любом выбранном режиме в т.ч. RET



XS-1000i и XS-800i:

- ▶ 24 параметра (+ IG#, IG%)
- ▶ 1 скатерограмма, 3 гистограммы
- ▶ 60 проб/час.



В гематологических анализаторах серии ХТ и ХЕ фирмы Sysmex применяется метод проточной цитофлюориметрии с использованием флюоресцентного красителя **полиметина**.

Этот флюоресцентный краситель связывается с ДНК и РНК неизмененных клеток, что позволяет использовать его как для дифференцировки лейкоцитов по 5-ти параметрам (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты), так и для подсчета ретикулоцитов.

Анализ клеток происходит в проточной кювете при пересечении луча лазера длиной 633 нм.

После контакта лазерного луча с окрашенной клеткой происходит рассеивание последнего под большим и малым углами и возбуждение флюоресцентного красителя.

Данные сигналы улавливаются фотоумножителями и регистрируются в виде трех параметров

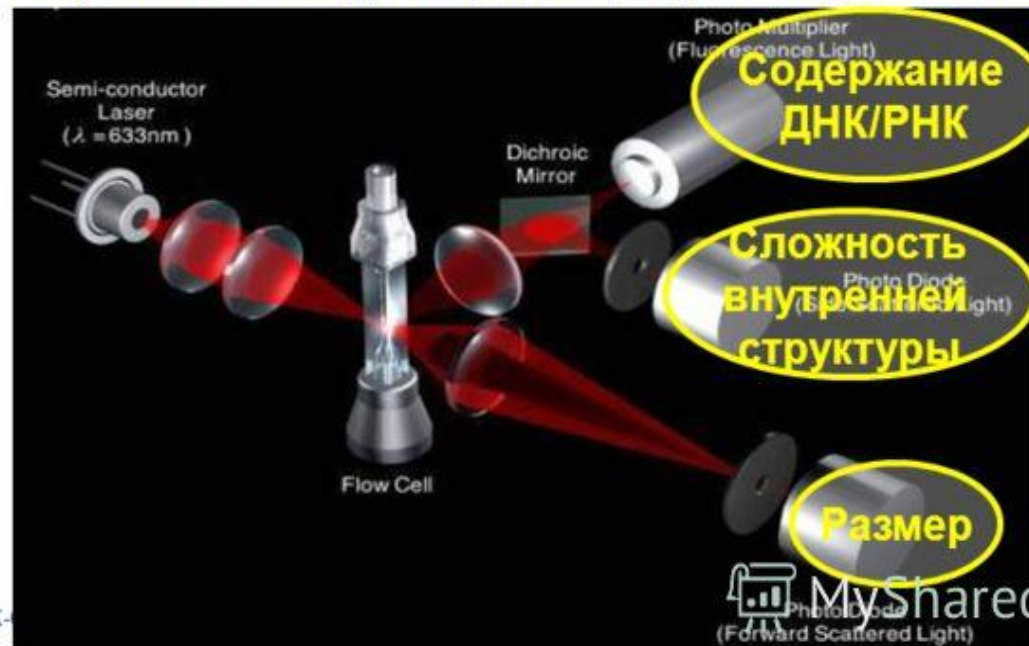
В гематологических анализаторах серии ХТ и ХЕ фирмы Sysmex применяется метод проточной цитофлюориметрии с использованием флюоресцентного красителя **полиметина**.

Этот флюоресцентный краситель связывается с ДНК и РНК неизмененных клеток, что позволяет использовать его как для дифференцировки лейкоцитов по 5-ти параметрам (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты), так и для подсчета ретикулоцитов.

1. Светорассеивание под малым углом (FSC) - отклонение лазерного луча под малым (до 10 град.) углом, которое зависит от размера (объема, только при условии сферической формы частицы) и формы клетки;
2. Боковое светорассеивание (SSC) - рассеивание под углом до 90 град. зависит от рефрактерного индекса (или плотности) клетки и характеризует сложность внутриклеточных структур;
3. Детекция специфического флюоресцентного сигнала (SFL), которая регистрируется также как боковое светорассеивание под углом 90 град. и позволяет судить о содержании РНК/ДНК в клетках.

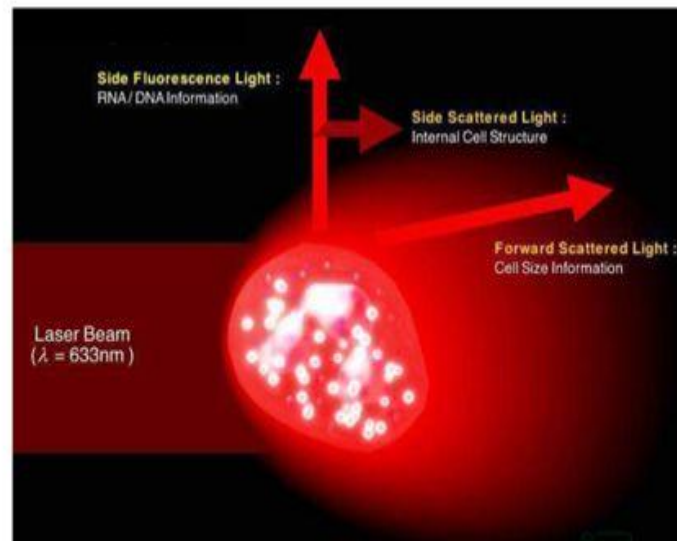
Высокие технологии – проточная цитофлуориметрия

- ▶ Уникальная технология: дифференцировка лейкоцитов посредством определения концентрации **нуклеиновых кислот**.
- ▶ 1999
- ▶ 3 различных вида информации для каждой клетки:



Дифференцировка лейкоцитов методом проточной цитофлюориметрии: Что особенного?

- ▶ Мы получаем много информации о ядре и гранулярности клетки, используя прямое, боковое светорассеивание лазерного луча и импедансный метод.
- ▶ Почему мы определяем содержание нуклеиновых кислот в клетке?



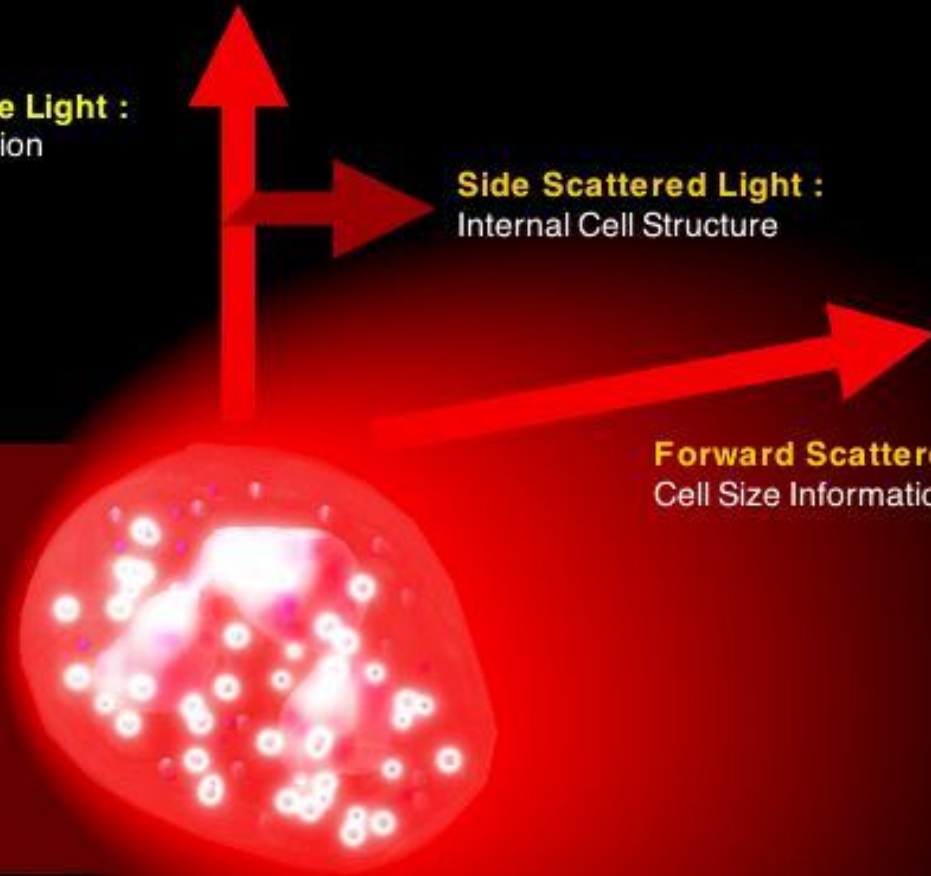
Laser Flow Cytometry

Side Fluorescence Light :
RNA / DNA Information

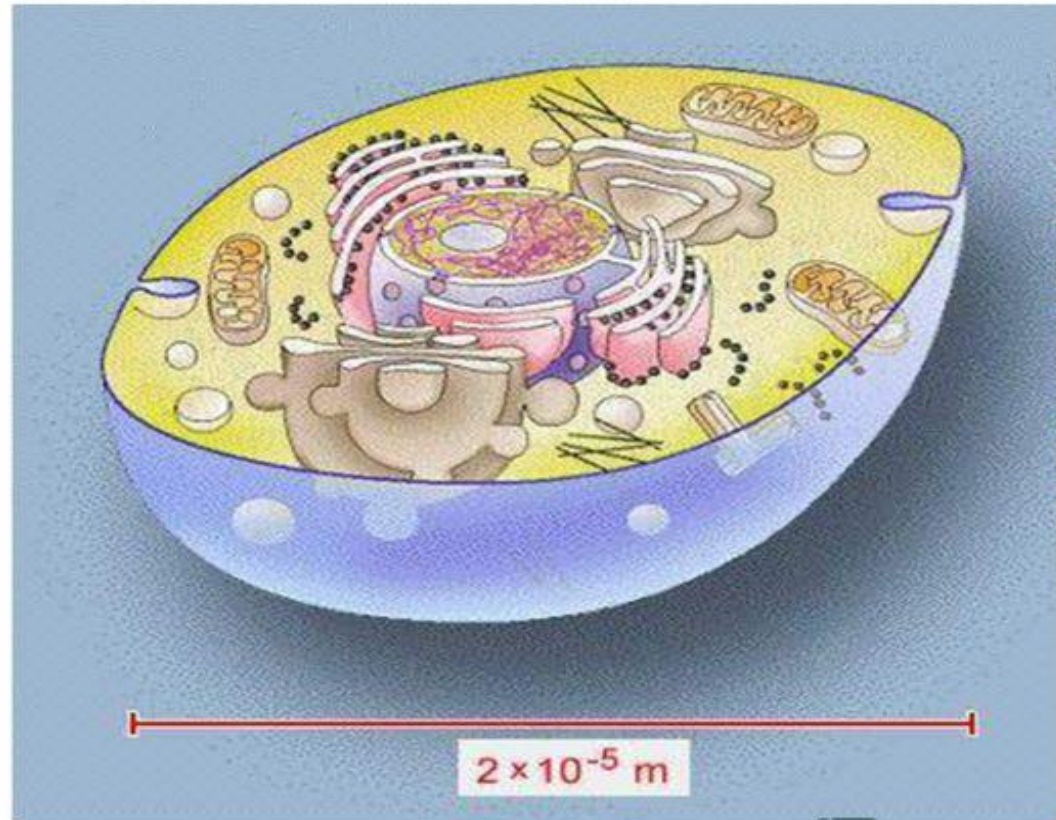
Side Scattered Light :
Internal Cell Structure

Forward Scattered Light :
Cell Size Information

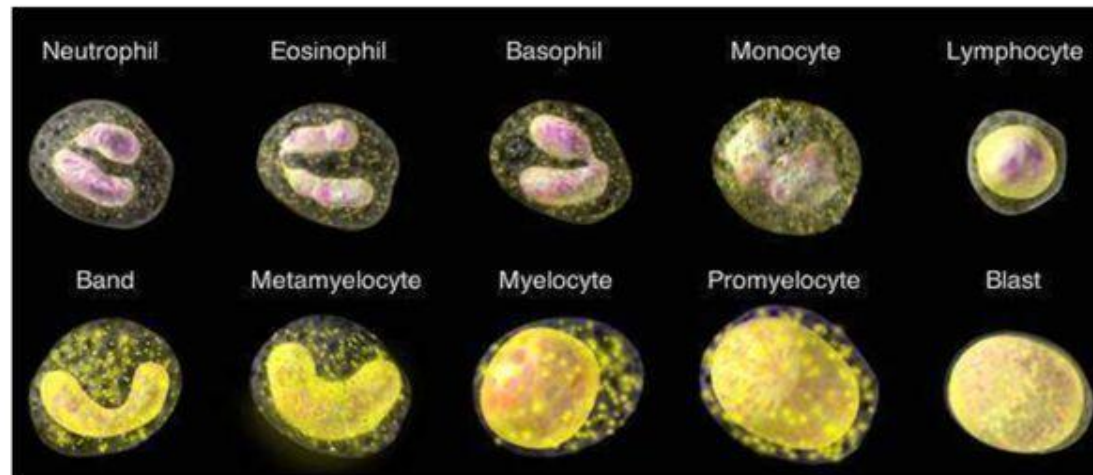
Laser Beam
($\lambda = 633\text{nm}$)



Для корректной дифференцировки
требуется взгляд внутрь клетки.....

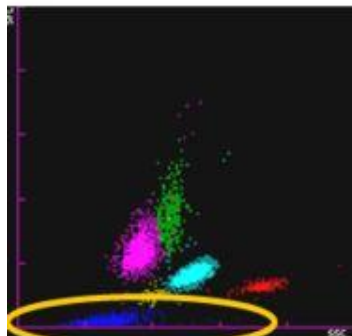


Почему флюоресценция в приборах X-класса?



- ▶ Повышенное содержание нуклеиновых кислот в клетке (ДНК или РНК) эквивалентно повышенному флюоресцентному сигналу.

Преимущества флюоресценции



Фрагменты
клеток

- ▶ Размер клеток не имеет значения в relevant DIFF канале.
- ▶ Нет интерференции фрагментами клеток :
 - ▷ Клетки, не содержащие нуклеиновые кислоты, такие как зрелые эритроциты **не окрашиваются**
 - ▷ **НЕТ** интерференции при наличии эритроцитов, устойчивых к лизису
 - ▷ Неклеточные структуры, например пузырьки воздуха **не определяются**
- ▶ **Фоновый счет** всегда очень низкий
 - ▷ Это особенно важно при анализе ликвора

РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ SYSMEX

Название реагента	Сокращение
CELLPACK	ERK
STROMATOLYSER – 4 DL	FFD
STROMATOLYSER – 4 DS	FFS
SULFOLYSER	SLS
STROMATOLYSER – FB	FBA
RET-SEARCH (красящий раствор и разбавитель)	RED

РЕАГЕНТЫ ДЛЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ SYSMEX

Название реагента	Назначение
CELLPACK	Разбавитель
STROMATOLYSER – 4 DL	Разведение части образца цельной крови 1:50 перед окрашиванием лейкоцитов
STROMATOLYSER – 4 DS	Окрашивание лейкоцитов для определения 4 компонентов лейкоцитарной формулы (Lymph, Mono, Eo, Neut+Baso)
SULFOLYSER	Реагент без цианидов, используемый для определения гемоглобина. Лизирует эритроциты и действует на глобин гемоглобина, образуя стабильный гемохром.
STROMATOLYSER – FB	Анализ лейкоцитов и базофилов
RET-SEARCH (красящий раствор и	Разбавление образца в процессе одновременного окрашивания

Нормобласты (NRBC)

Большинство гематологических анализаторов подсчитывает все ядросодержащие клетки, поэтому при наличии нормобластов в периферической крови они определяются как лейкоциты и могут быть причиной увеличения WBC и лимфоцитов, т.к. нормобласты имеют размер малого лимфоцита. В этих случаях необходим строгий визуальный контроль и коррекция истинного количества лейкоцитов.

В анализаторах фирмы Sysmex (XE-2100, XT-2000i) и Bayer (ADVIA 2120) при наличии нормобластов в крови коррекция лейкоцитов проводится автоматически.

Порог чувствительности определения нормобластов в анализаторе Sysmex XE-2100 составляет менее 20/мкл, что с помощью микроскопического исследования определить представляется невозможным.

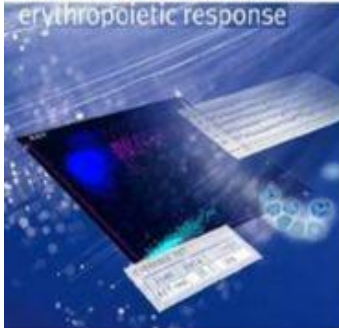
Нормобласты появляются в периферической крови при:

- Онкогематологических заболеваниях, анемиях (гемолитические, В12- и фолиеводефицитные), тяжелых септических состояниях и интоксикациях.
- Появление нормобластов в послеоперационном периоде является плохим прогностическим признаком, предсказывающим возможный летальный исход.
- Наличие в крови нормобластов может расцениваться как маркер гипоксии и воспаления.

Расширение аналитических возможностей с помощью дополнительных программ для ХЕ-2100 и ХТ-2000i

XE-RET MASTER

The first to know about erythropoietic response



XT-2000i RET MASTER

The first to know about erythropoietic activity



- ▶ Доступно только при наличии RET-канала
- ▶ **RET Мастер:** новый параметр **RET-He** (Эквивалент гемоглобина ретикулоцитов)
 - ▷ Для оценки **гемоглобинизации** ретикулоцитов
 - ▷ RET-He = «**качество**» эритропоэза
 - ▷ RET# и RET% = «**количество**» эритропоэза

Показатели характеризующие степень зрелости ретикулоцитов

1. LFR% - популяция малых зрелых RET (87-99%);
2. MFR% - популяция средних RET (2-12%);
3. HFR% (1-2%) - популяция больших незрелых RET.

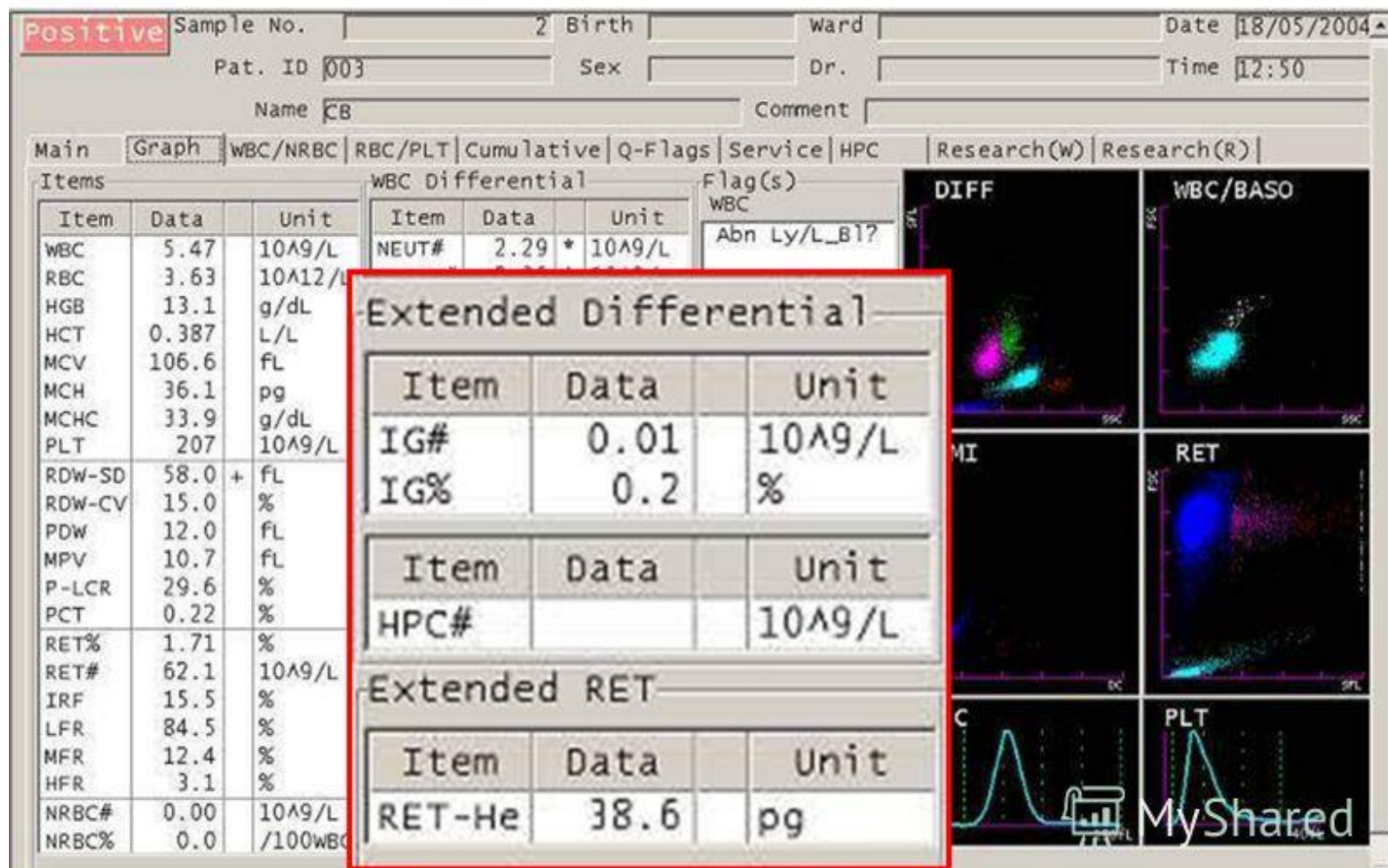
MFR+HFR определяется как фракция незрелых ретикулоцитов - IRF (Immature Reticulocyte Fraction) (2-14%).

Фракция незрелых ретикулоцитов может служить индикатором активности эритропоэза.

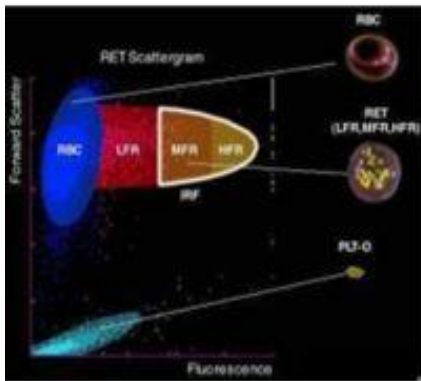
Увеличение фракции незрелых ретикулоцитов свидетельствует об ускоренном выбросе незрелых клеток из костного мозга.

Фракция незрелых ретикулоцитов повышается значительно раньше (как правило, на 2 дня) RET% и может служить наиболее чувствительным маркером в мониторинге за состоянием эритропоэтической активности костного мозга и эффективности лечения витамином В12, фолиевой кислотой препаратами железа и ЭПО.

Параметр RET-He

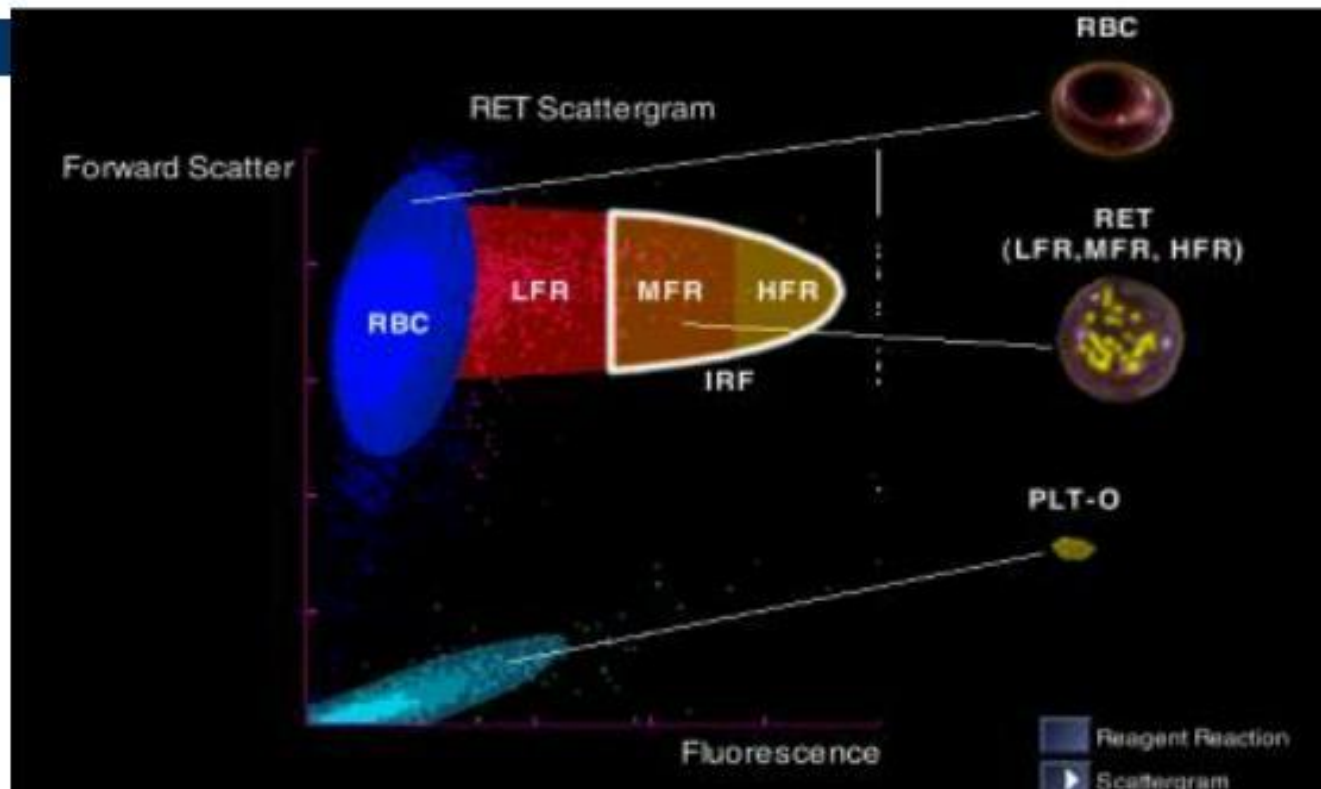


Уровни автоматической детекции эритропоэза в RET- канале



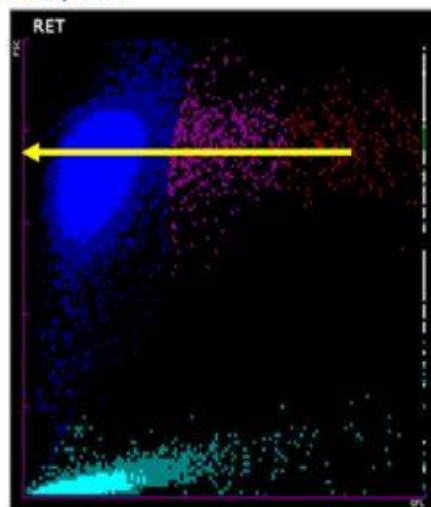
- ▶ Первый уровень: **Зрелые эритроциты**
 - ▷ Параметры: RBC / HCT / MCV / MCH / MCHC
 - ▷ Мониторинг: «история» концентрации гемоглобина за последние 120 дней
- ▶ Второй уровень: **Ретикулоциты**
 - ▷ Параметры: RET#, RET%, IRF
 - ▷ Мониторинг: активность эритропоэза путем оценки **абсолютного количества** развивающихся эритроцитов
- ▶ Третий уровень: **Информация о функции эритроцитов**
 - ▷ Параметр: RET-H_e (**гемоглобинизация ретикулоцитов** в пг)
 - ▷ Мониторинг: активность эритропоэза путем оценки содержания гемоглобина в развивающихся эритроцитах

Therefore the RETIC Scattergram ...



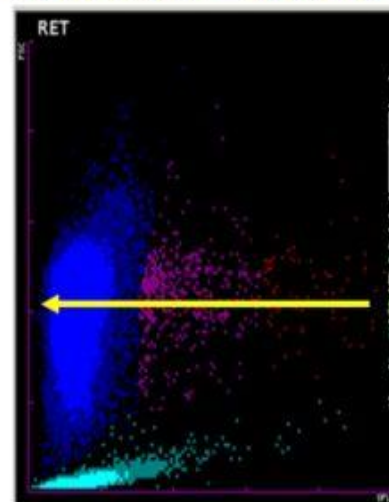
Информация о функции RBC в RET-канале

Норма



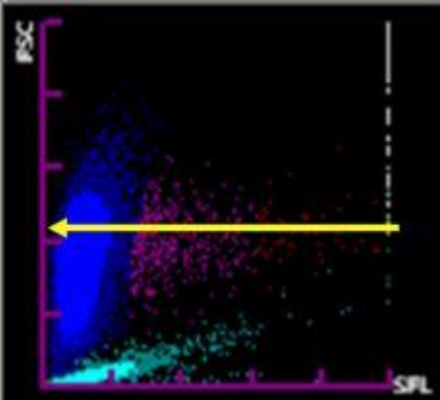
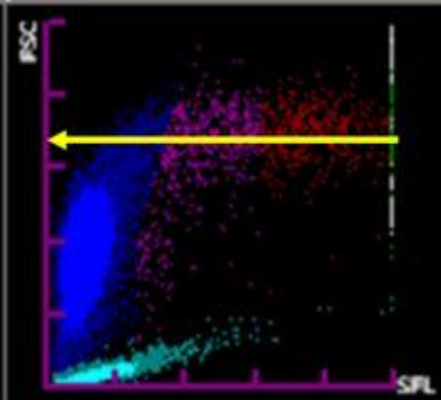
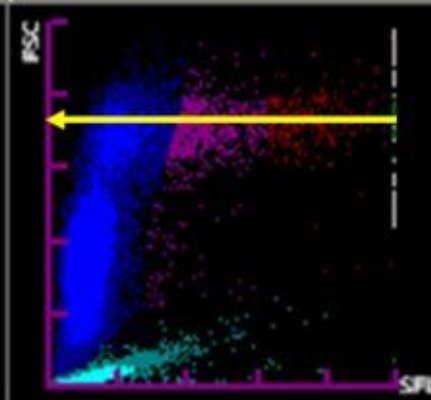
RET-He
около 35 пг

Аномалия – анемия



RET-He
около 22 пг

Успешное лечение функционального железодефицита

Date	03/16	03/19	03/22
Time	12:32	15:52	11:54
RET			

RET-He
21.9 пг

RET-He
29.6 пг

RET-He
31.3 пг

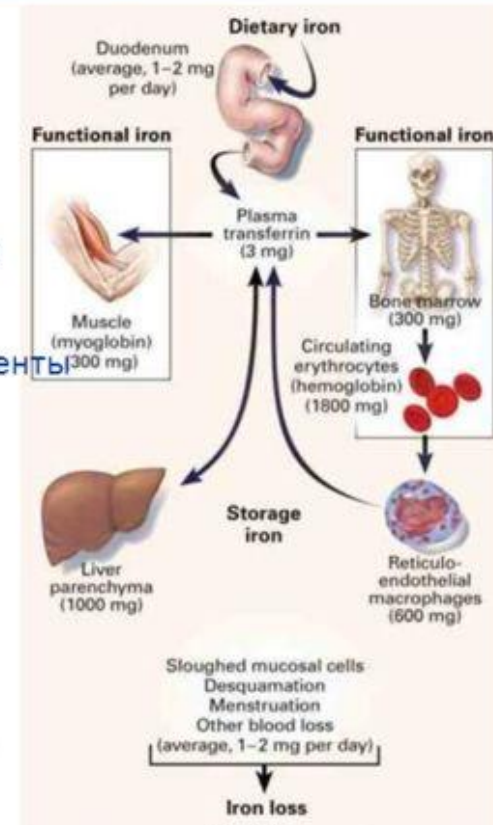
RET-He – единственный параметр, который позволяет убедиться в эффективности терапии железодефицита уже через 3 дня, т.к. отражает появление ретикулоцитов с нормальным содержанием гемоглобина.

Функциональный железодефицит

- ▶ Ретикулоцитарные параметры помогают определить железодефицит, когда использование классических биохимических тестов не приемлемо

Распределение Fe в организме

- ▶ **Всего:**
4.2 г (мужчины)
3.5 г (женщины)
- только связанное с белком
- ▶ **Функциональное железо:**
65 % Гем
5 % Миоглобин
0.2 % гем-содержащие ферменты
10 % негемовое железо
80 % от общего количества
- ▶ **Запасы Fe:**
Ферритин, гемосидерин
20 % от общего количества
(у мужчин)
- ▶ **Транспортное Fe:**
Трансферрин (=“Fe в дороге”)
0.1 % от общего количества



Andrews N: *New Engl J Med* 1998; 341: 4986, modified

5 причин железодефицита

- ▶ Потребление в низком количестве:
мальнутриция (вегетарианцы, пожилые люди)
- ▶ Мальнутриция:
Хронические гастриты, частичная резекция желудка, синдром Крона, кальций, танины (в чае или кофе)
- ▶ Увеличенная потребность:
беременные, новорожденные, дети
- ▶ Потеря крови:
Менструации, хирургические вмешательства, роды, язва, etc...

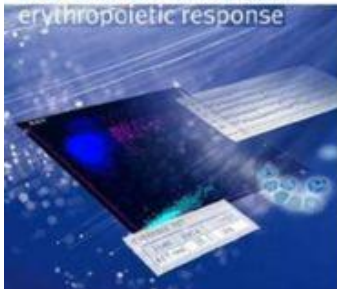
- ▶ **Функциональный железодефицит:**
Потребность эритропоэза в железе превышает способность организма освобождать Fe из запасов.
(*Cavill I: Blood 1993; 82: 1377*)

Биохимические тесты

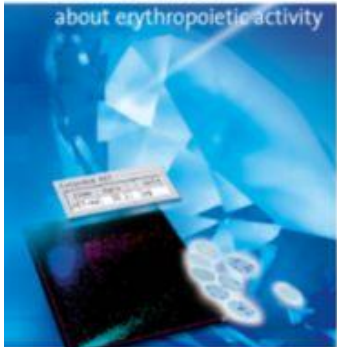


- ▶ Железо
- ▶ Ферритин
 - ▷ Является очень специфическим тестом при низких значениях. Повышенные значения не специфичны для оценки запасов железа, т.к. могут наблюдаться в острой фазе **воспаления**
- ▶ Трансферрин
 - ▷ Нельзя использовать при **воспалении**
- ▶ Насыщение трансферрина
 - ▷ Не достаточно специфичен при **воспалении**
- ▶ Растворимый рецептор трансферрина (sTfR)
 - ▷ Высокоспецифичен и инертен при воспалении, но **не является чувствительным** параметром
- ▶ sTfR – log ферритин индекс
 - ▷ Индекс отражает статус железа лучше, чем все другие параметры

XE-RET MASTER
The first to know about
erythropoietic response



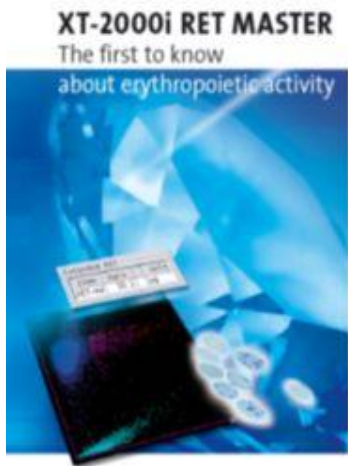
XT-2000i RET MASTER
The first to know
about erythropoietic activity



Заключение

- ▶ Все RBC-параметры, включая MCV, MCH, гипохромные RBC дают нам **историческую** информацию об анемии хронических заболеваний
- ▶ **RET%**: информация о **количестве** вновь образованных RBC
- ▶ **RET-He**: информация о **качестве** вновь образованных RBC
- ▶ **RET-He**: первый параметр, который указывает на выздоровление при железодефиците
- ▶ **RET-He = 28 пг** может рассматриваться как критерий решения (cut-off) при лечении анемии хронических заболеваний

Заключение



- ▶ С параметром **RET-He** возможен **прогноз** развития анемии:
 - ▷ Улучшение состояния и выздоровление
 - ▷ Улучшение состояния без полного выздоровления
 - ▷ Развитие анемии у здоровых людей
 - ▷ Ухудшение состояния у пациентов, страдающих анемией