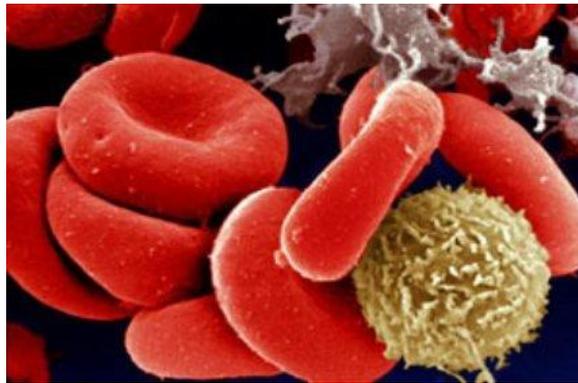
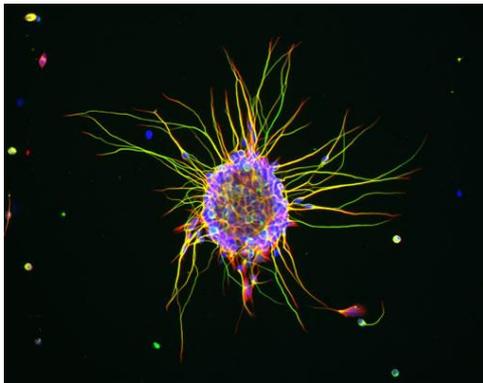


Современные технологии гематологического анализа



**Ассистент кафедры биохимии и
молекулярной биологии с курсом
клинической лабораторной
диагностики,
канд. мед. наук Васильева О.А.**

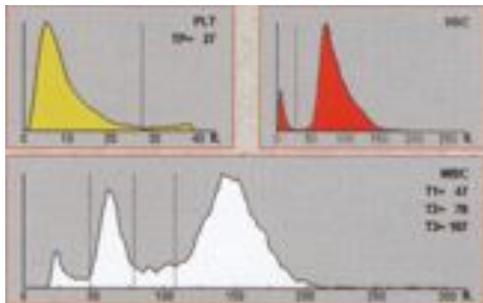
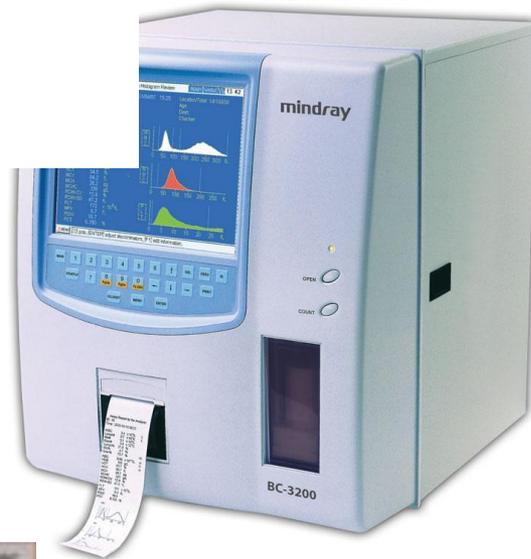
Гематологические анализаторы



Высокая
производительность
Небольшой объем крови для
анализа
Подсчет большого количества
клеток



Высокая точность и
воспроизводимость



1 - класс анализаторов

Анализатор гематологический полуавтомат PCE-90 ERMA (8 параметров)

WBC-количество лейкоцитов

RBC-количество эритроцитов

HGB-концентрация гемоглобина

HCT-величина гематокрита (%)

MCV-средний объём эритроцитов

MCH-среднее содержание гемоглобина в эритроците

MCHC-средняя концентрации гемоглобина в эритроците

PTL-количество тромбоцитов

Эти приборы используют в работе предварительно разведенную кровь, поэтому комплектуются дилюторами. Полуавтоматические дилюторы являются промежуточным вариантом между полностью ручными и автоматическими системами. Не устраняя влияние "человеческого фактора" до конца, они позволяют значительно снизить вероятность ошибок пробоподготовки, увеличить производительность и качество дозирования



2 - класс анализаторов

II класс (3Diff) — автоматические анализаторы, проводящие анализ цельной крови и определяющие до **20 параметров**, включая расчетные показатели красной крови и тромбоцитов, гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, а также проводящие частичную дифференцировку лейкоцитов на **3 популяции** (гранулоциты, лимфоциты и «средние клетки», состоящие преимущественно из моноцитов)

МЕК-6400J/К (Nihon Kohden), Micros 60 (ABX), ADVIA 60 (Bayer), Coulter Ac-T (Beckman Coulter)

**Для анализа используется цельная кровь:
капиллярная и венозная**



3 - класс анализаторов

III класс (5Diff) — высокотехнологические гематологические анализаторы, позволяющие проводить развернутый анализ крови (до 28 параметров), включая полную дифференцировку лейкоцитов по 5 параметрам (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты), гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему.

- **МЕК-8222 (Nihon Kohden), Pentra 60 (ABX), Cell-Dyn 3700 (Abbott)**



4 - класс анализаторов

Сложные аналитические системы (до 40 параметров), 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 XE-2100, Coulter LH750, Advia 2120, Pentra 120)





Wallace at age 3



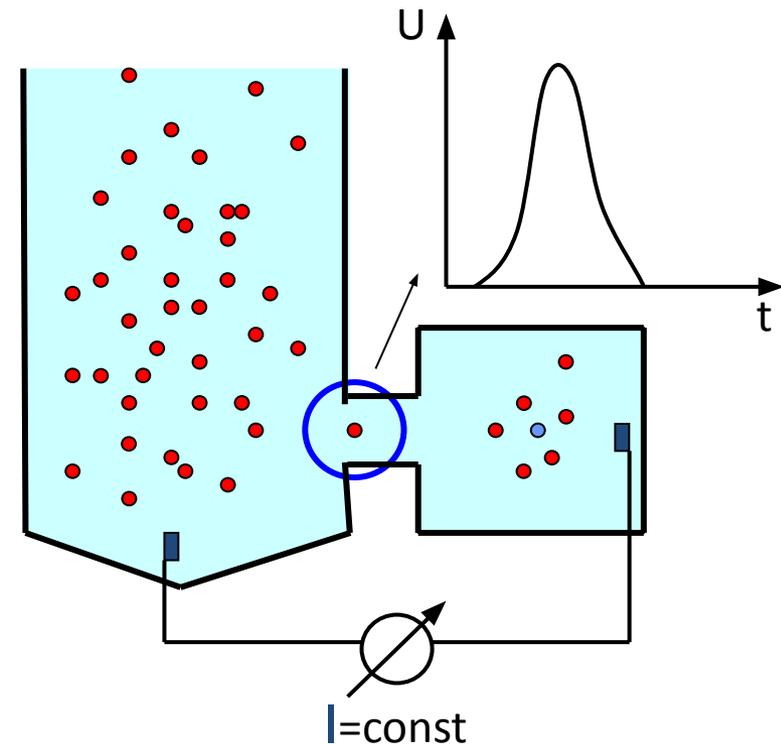
Кондуктометрический метод,

Wallace H. and Joseph R. Coulter, 1953 г.

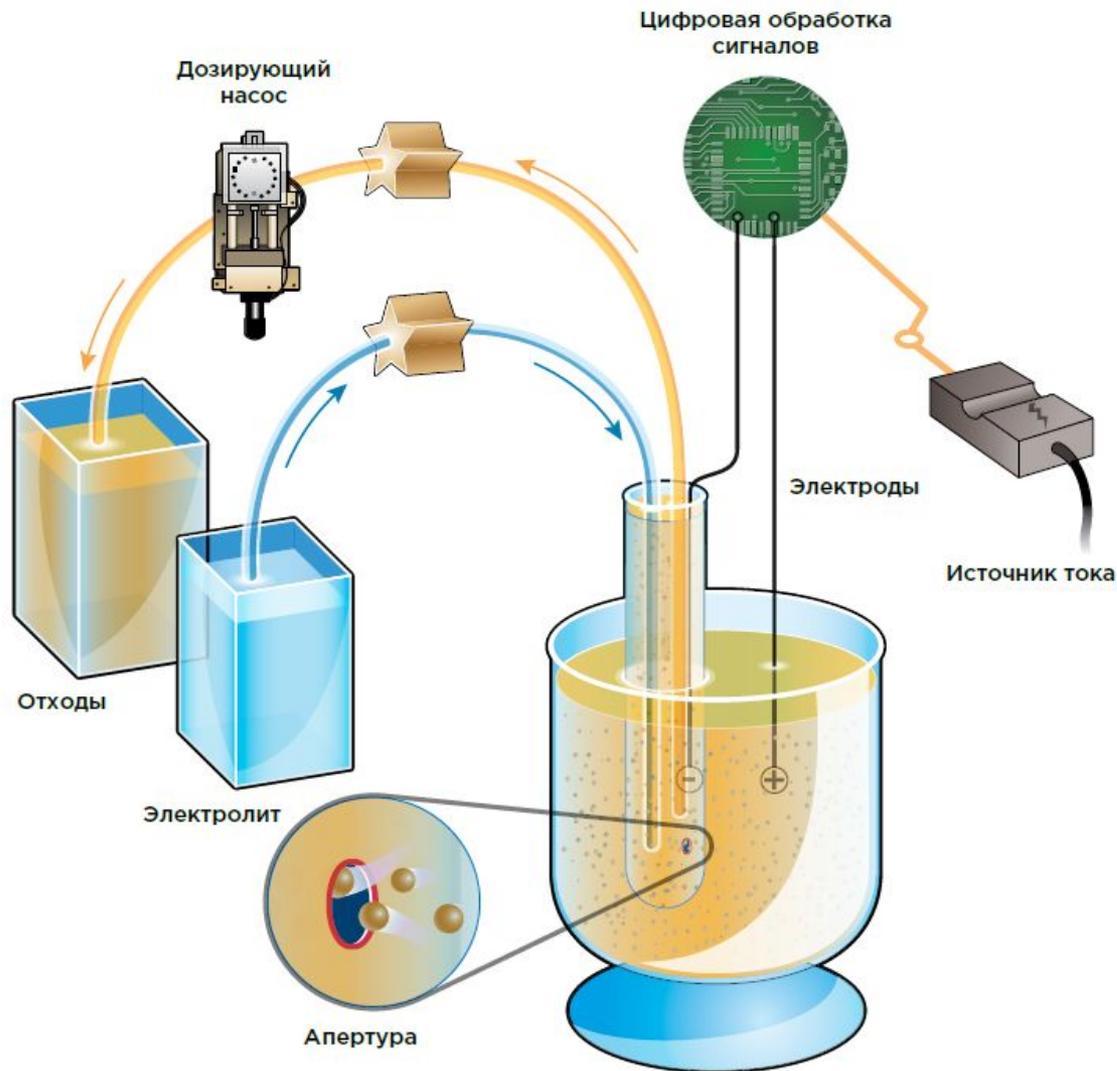
Апертуро-импедансный метод основан на подсчете числа и определении характера импульсов, возникающих при прохождении клеток через отверстие малого диаметра (апертуру), по обе стороны которого расположены два изолированных друг от друга электрода.

Так как, ток между электродами является постоянным, то пропорционально увеличению сопротивления возрастает напряжение между электродами.

Каждое событие -
прохождение клетки через канал,
сопровождается появлением
электрического импульса.
Чтобы определить
концентрацию клеток,
достаточно пропустить
определенный объем пробы
через канал и подсчитать число
электрических импульсов,
которые при этом генерируются.



Принцип кондуктометрического метода



Необходимо разведение крови до такой концентрации, при которой в канале будет **не более одной клетки:** Для эритроцитов – в 40000 -50000 раз!

The Coulter Principle Patent

Patented Oct. 20, 1953

2,656,508

UNITED STATES PATENT OFFICE

2,656,508

MEANS FOR COUNTING PARTICLES
SUSPENDED IN A FLUID

Wallace H. Coulter, Chicago, Ill.

Application August 27, 1949, Serial No. 112,819



Награда за выдающиеся
достижения в гематологии.

United States Patent Office

2,869,078

Patented Jan. 13, 1959

1

2,869,078

FLUID METERING APPARATUS

Wallace H. Coulter and Joseph R. Coulter, Jr., Chicago, Ill., assignors, by direct and mesne assignments, to Coulter Electronics, Inc., Chicago, Ill., a corporation of Illinois

Application May 9, 1956, Serial No. 583,850

18 Claims. (Cl. 324—71)

This invention relates generally to fluid metering apparatus and more particularly is concerned with novel apparatus for metering a constant volume of fluid through a detecting system for ascertaining certain scientific data concerning said fluid.

In the study of particles suspended in a fluid medium,

2

to be tested as it passes the scanning point of a detecting system than heretofore has been realized.

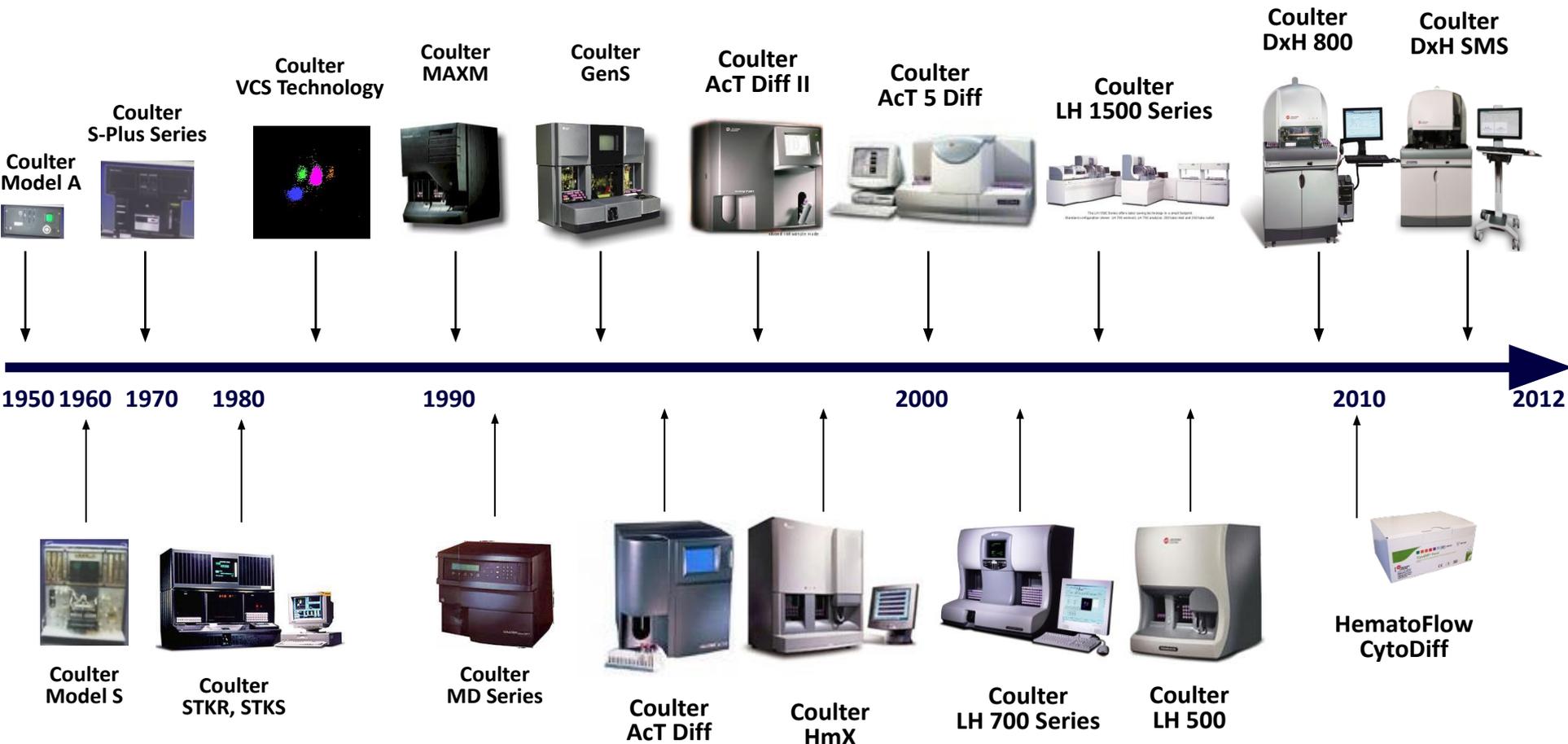
Another object of the invention is to provide a fluid metering device of the character described which includes a novel syphon and manometer system connectable to a low pressure source which enables repeated determinations to be made with substantial elimination or minimizing of effects of debris in parts of the system remote from the scanning point, air bubbles or the like which may be present in the device or adverse effects on such determinations by reason of normal elasticity of the system. An ancillary object is to provide such a syphon and manometer system which by reason of its construction and operation serves to establish an unbalanced, substantially constant pressure system by means of which a high order of repeatability and accuracy of determination is achieved.

Another object of the invention is to provide a metering device of the character described which includes a novel syphon and manometer system having a mercury

Trademark Hat



История инноваций в гематологии



Подсчет количества форменных элементов

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

Разделение клеток в современных анализаторах проводится по измерению амплитуды электрического сигнала:

тромбоциты - импульсы низкой амплитуды

эритроциты и лейкоциты - импульсы высокой амплитуды

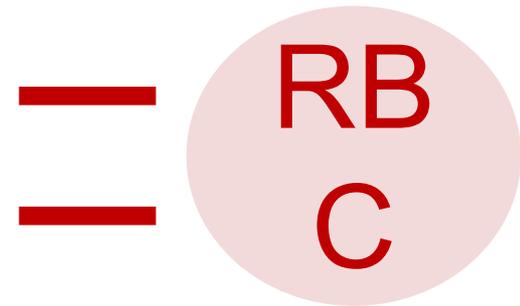
Импульсы
высокой
амплитуды:
RBC+WBC
1-й - подсчет

RBC (Red Blood Cells)

ЛИЗИ
C RBC

Импульсы
высокой
амплитуды:
WBC
2-й - подсчет

WBC (White Blood Cells)



При суммировании амплитуд импульсов, получаемых при подсчете количества эритроцитов, получается величина, отражающая общий объем, занимаемый эритроцитами, то есть **гематокрит** Hct (hematocrit).

Разделив гематокритную величину на концентрацию эритроцитов (RBC), получается полезная характеристика эритроцитов - **средний объем MCV (mean corpuscular volume)**.

$$\text{MCV} = \frac{\text{Hematocrit}}{\text{RBC}}$$

Аналогичные показатели можно получить и для тромбоцитов:

концентрация тромбоцитов - PLT (platelet),

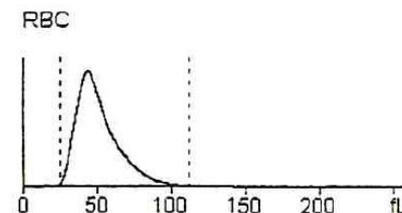
тромбокрит - PCT (platelet crit),

средний объем тромбоцитов - MPV (mean platelet volume).

Эритроцитарные параметры

Показатель	Нормальные значения	
	Мужчины	Женщины
HGB (hemoglobin, гемоглобин), г/л	130,0 - 160,0	120,0 - 140,0
RBC (red blood cells, количество эритроцитов), $\times 10^{12}/л$	4,0 - 5,0	3,9 - 4,7
Ht (hematocrit, гематокрит), %	40 - 48	36 - 42
MCV (mean corpuscular volume, средний объем эритроцита), фл	80,0 - 100,0	
MCH (mean corpuscular hemoglobin, среднее содержание гемоглобина в эритроците), пг	27,0 - 33,0	
MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration, средняя концентрация гемоглобина в эритроците), г/дл (%)	30,0 - 38,0	
RDW (red cell distribution width, ширина распределения эритроцитов по объему), %	11,5 - 14,5	

+ гистограмма распределения эритроцитов по объему

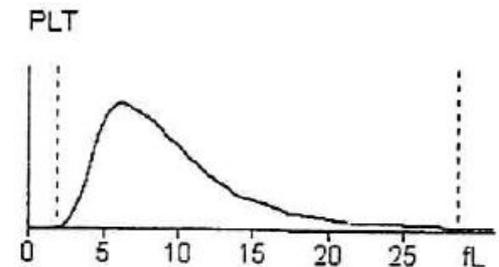


Тромбоцитарные параметры

Показатель	Нормальные значения
PLT (platelets, количество тромбоцитов), $\times 10^9/\text{л}$	150,0 - 350,0
MPV (mean platelet volume, средний объем тромбоцита), фл	7,4 - 10,4
PCT (plateletcrit, тромбокрит), %	0,15 - 0,40
PDW (platelet distribution width, ширина распределения тромбоцитов по объему), %	10 - 20
IPF (immature platelet fraction, фракция незрелых тромбоцитов), %	1,0 - 10,3

+ гистограмма распределения тромбоцитов по объему

Используются для диагностики тромбоцитопений, тромбоцитопатий, миелопролиферативных заболеваний, для оценки активности костномозгового тромбоцитопоэза

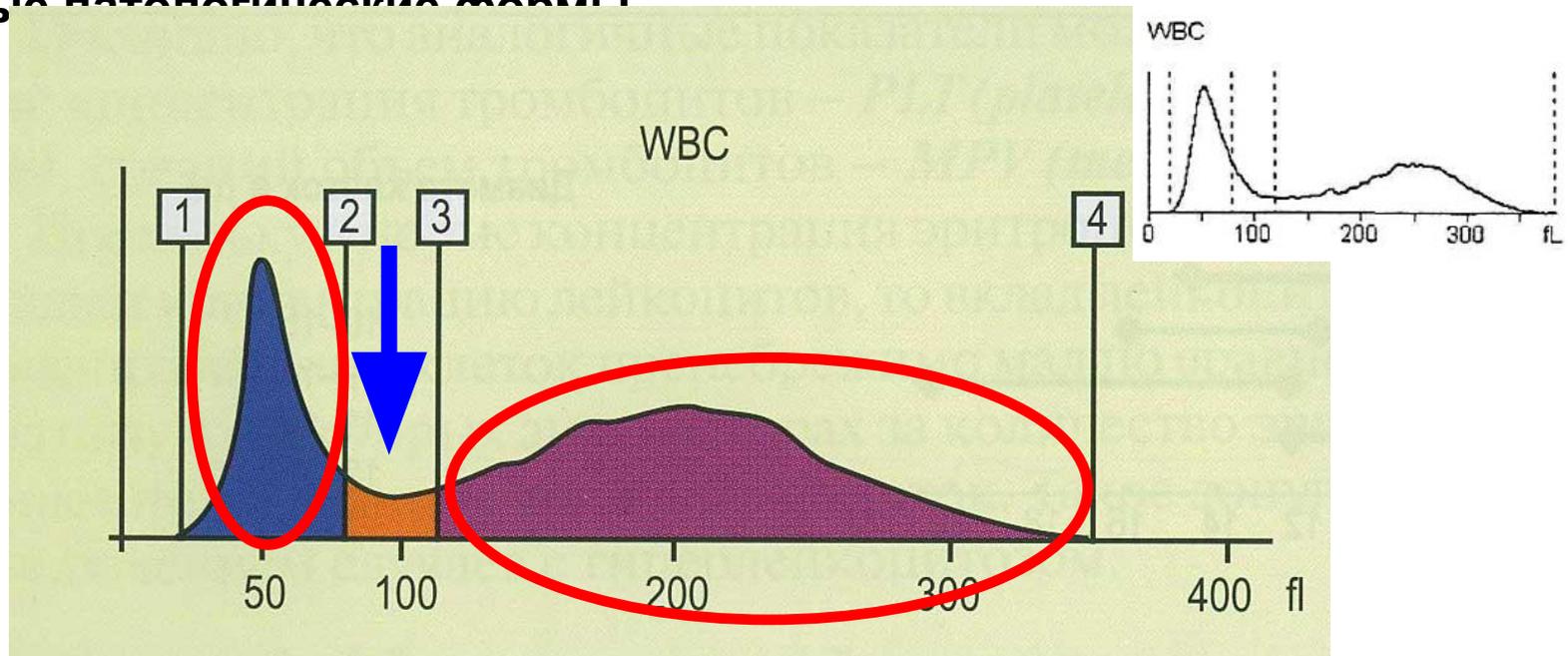


Дифференцировка лейкоцитов

- Область малых объемов (35-90 фл) формируется лимфоцитами, которые под действием гемолитика значительно уменьшаются в объеме.

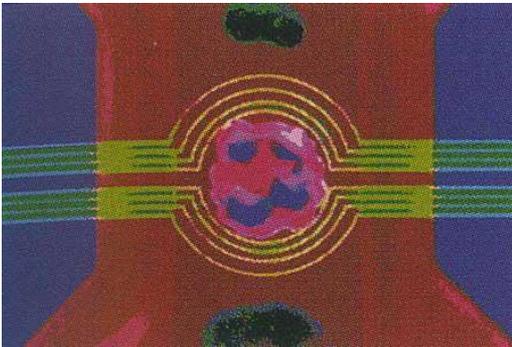
- Гранулоциты (нейтрофилы, базофилы и эозинофилы), напротив, подвергаются небольшому сжатию и расположены в области больших объемов (120-400 фл).

- Между двумя пиками имеется зона так называемых **"средних лейкоцитов"** (90-120 фл) (MID) – моноциты, эозинофилы, базофилы, различные патологические формы.

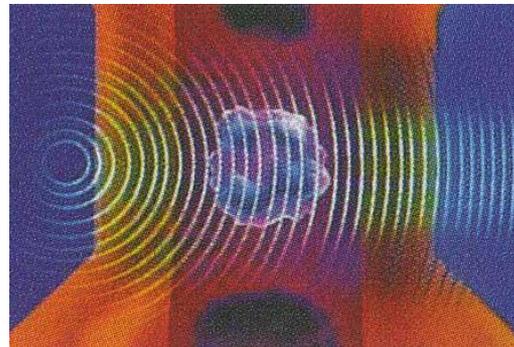


Высокотехнологические гематологические анализаторы

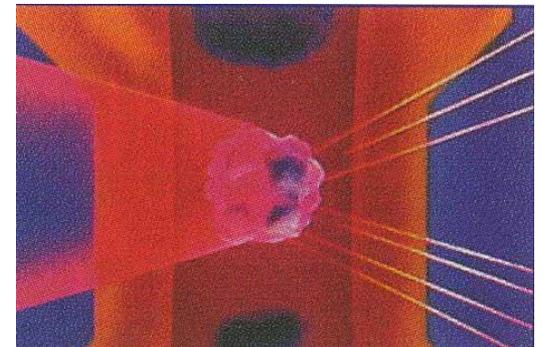
анализаторах фирмы **Bekman-Coulter** (LH 500, LH750) (США - Франция) используется трехмерный анализ дифференцировки лейкоцитов (**VCS-технология**), который включает в себя одновременный компьютерный анализ клеток



по объему
(Volume)



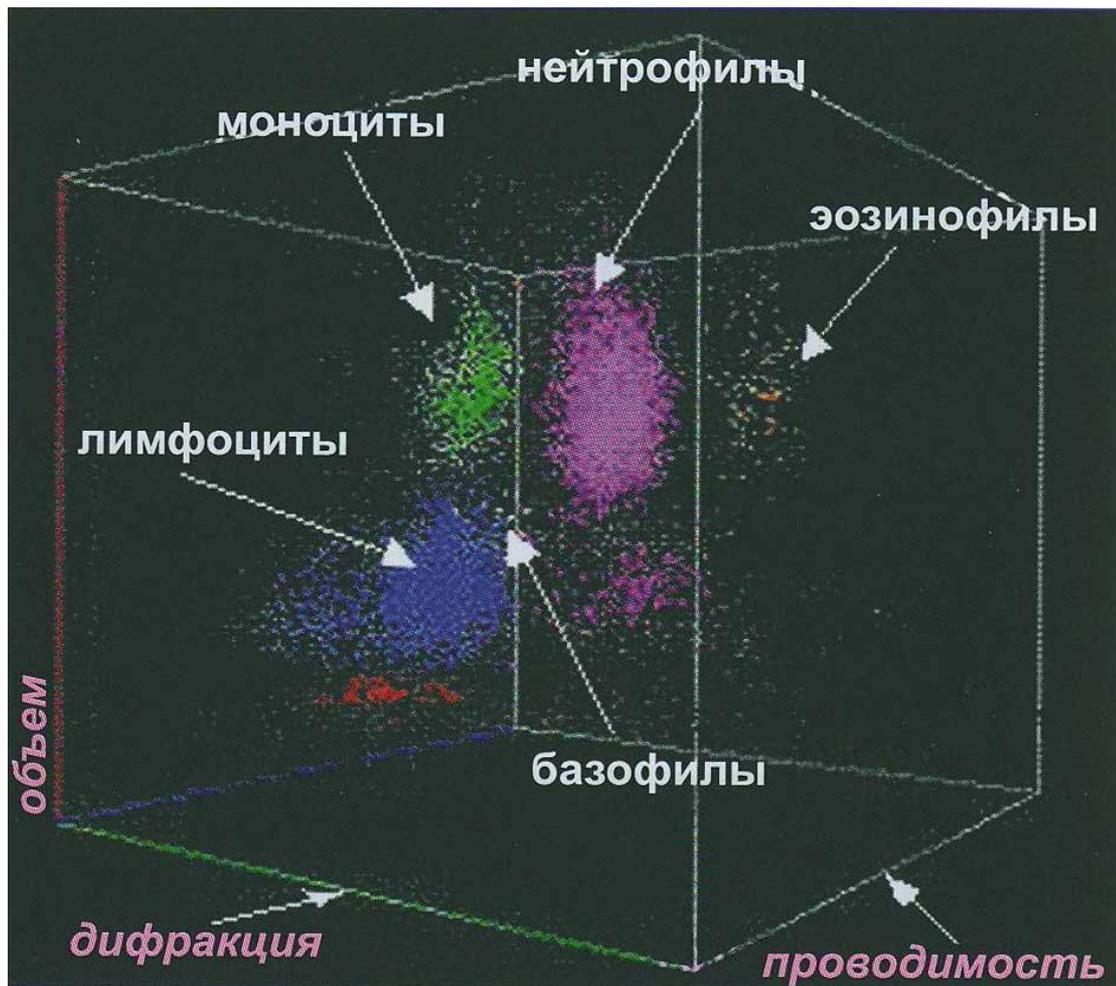
электропроводности
(Conductivity)



светорассеиванию
(Light Scatter)

VCS-технология

Лейкоцитарная скатерограмма



VCS – куб, определяющий лейкоцитарную скатерограмму

X – нормированная рассеивающая способность

Y – объём клеток

Z – структурная электропроводимость

В анализаторах серии **Cell-Dyn** для дифференцировки лейкоцитов применяется технология MAPSS - Multi Angle Polarized Scatter Separation - мультипараметрическая система лазерного светорассеивания - регистрация интенсивности рассеивания клетками поляризованного лазерного луча под разными углами.

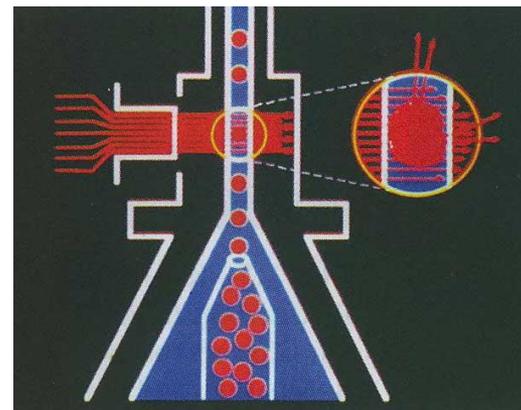
Рассеивание клеткой поляризованного лазерного луча под разными углами дает сведения о таких ее свойствах, как:

размер клеток (- 0 град)

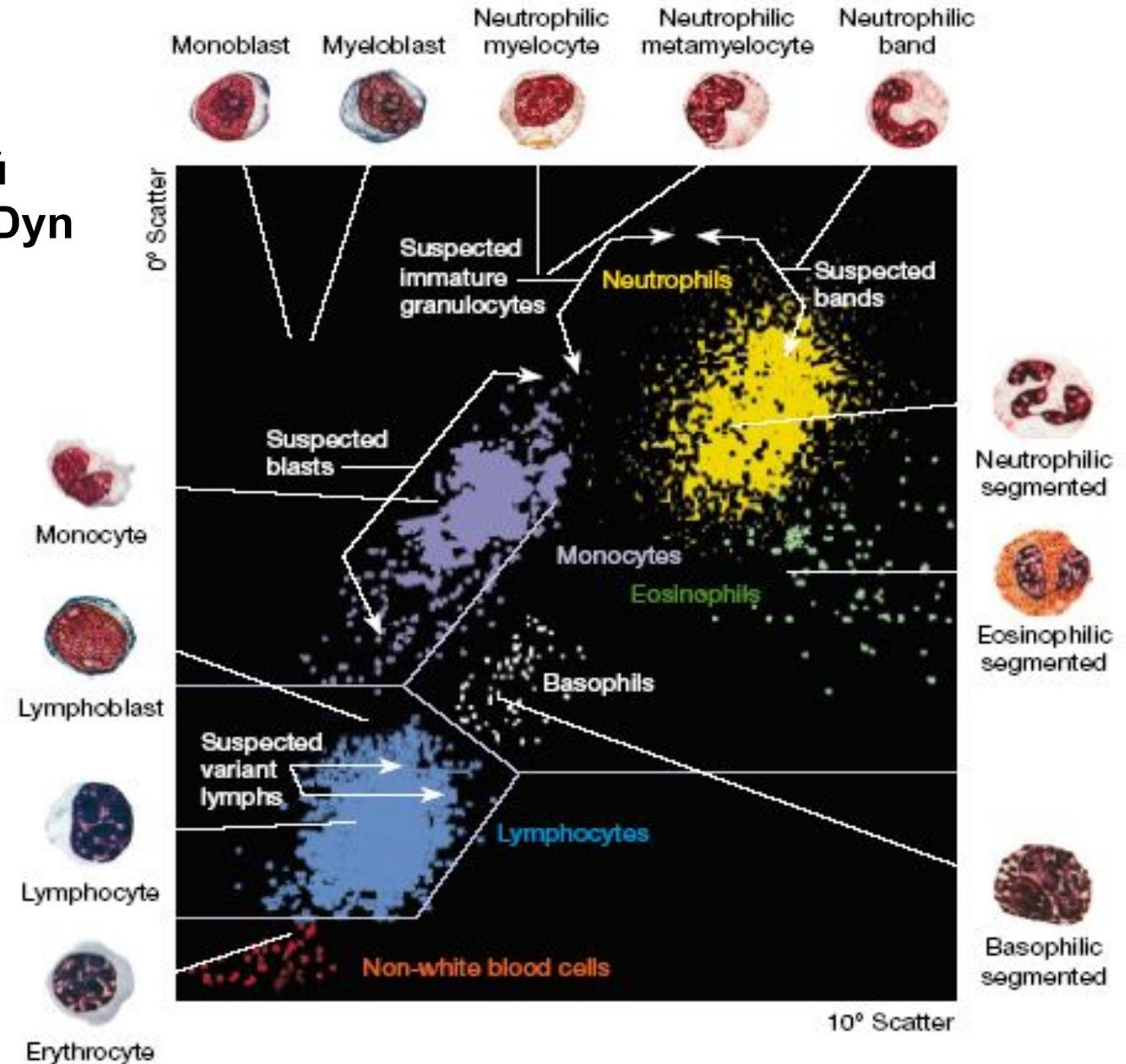
структура и степень сложности клеток (угол до 7 град)

ядерно-цитоплазматическое соотношение (угол до 10 град)

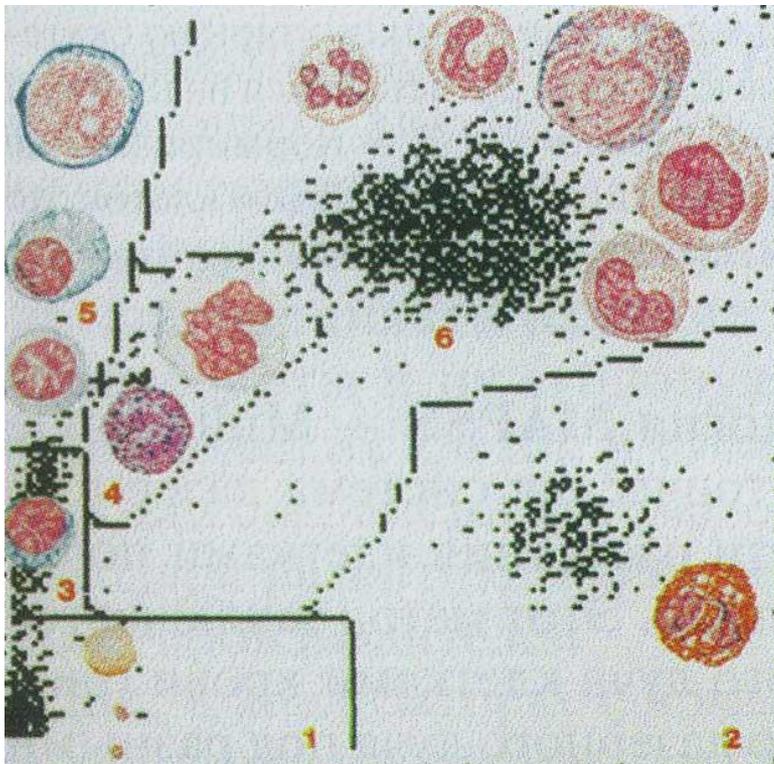
оценка формы клеточного ядра (90 град)



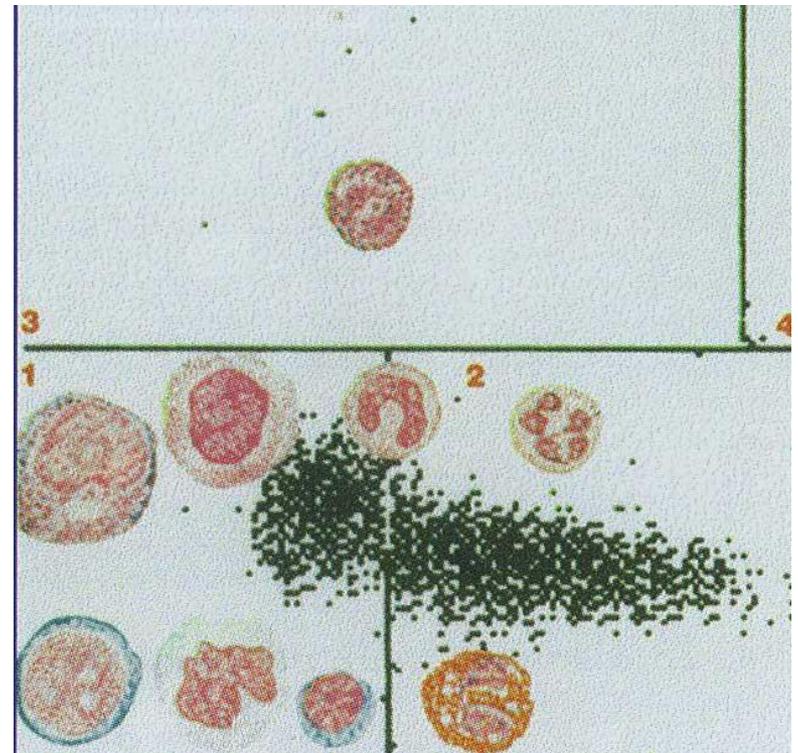
Лейкоцитарная скатерограмма, Гематологический Анализатор: Cell-Dyn



В приборах серии **Technicon, ADVIA120, 2120, Pentra DX 120** разработан принцип **жидкостной цитохимии** (измерение активности пероксидазы в лейкоцитах), который в сочетании с другими методами (кондуктометрический, гидродинамическое фокусирование, оптическая абсорбция) позволяет проводить дифференцировку лейкоцитов.



Лейкоцитарная скатерограмма



Скатерограмма базоканала

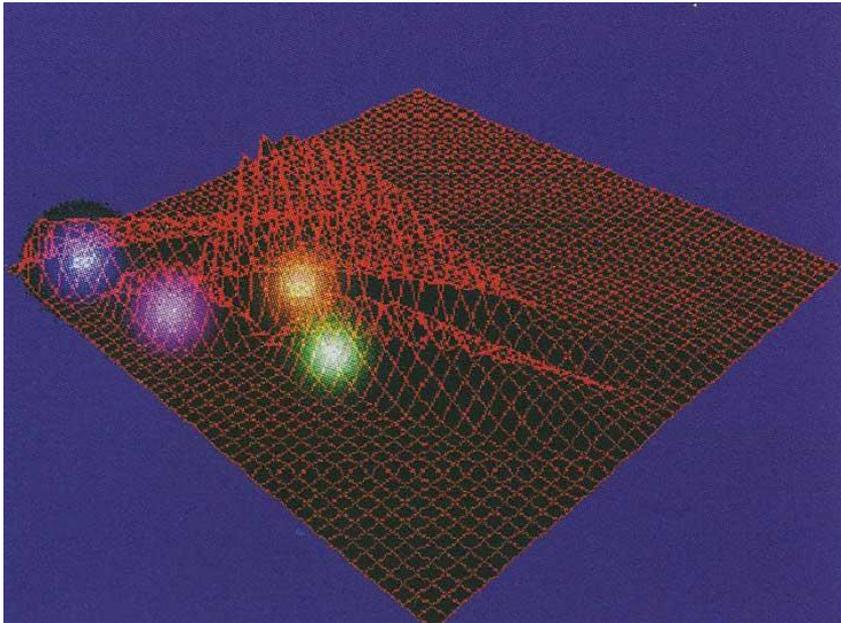
В гематологических анализаторах серии фирмы **Sysmex** применяется метод проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентного красителя полиметина.

Этот флуоресцентный краситель связывается с ДНК и РНК неизмененных клеток, что позволяет использовать его как для дифференцировки лейкоцитов по 5-ти параметрам, так и для подсчета ретикулоцитов



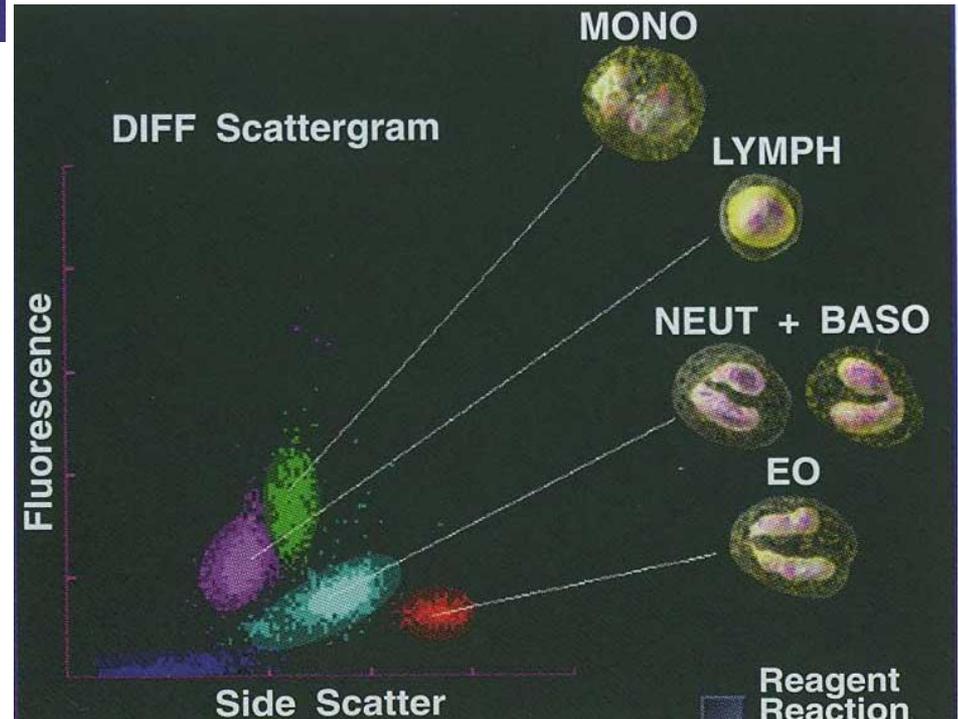
Анализ клеток происходит в проточной кювете при пересечении луча лазера длиной 633 нм. После контакта лазерного луча с окрашенной клеткой происходит рассеивание последнего под большим и малым углами и возбуждение флюоресцентного красителя. Данные сигналы улавливаются фотоумножителями и регистрируются в виде трех параметров



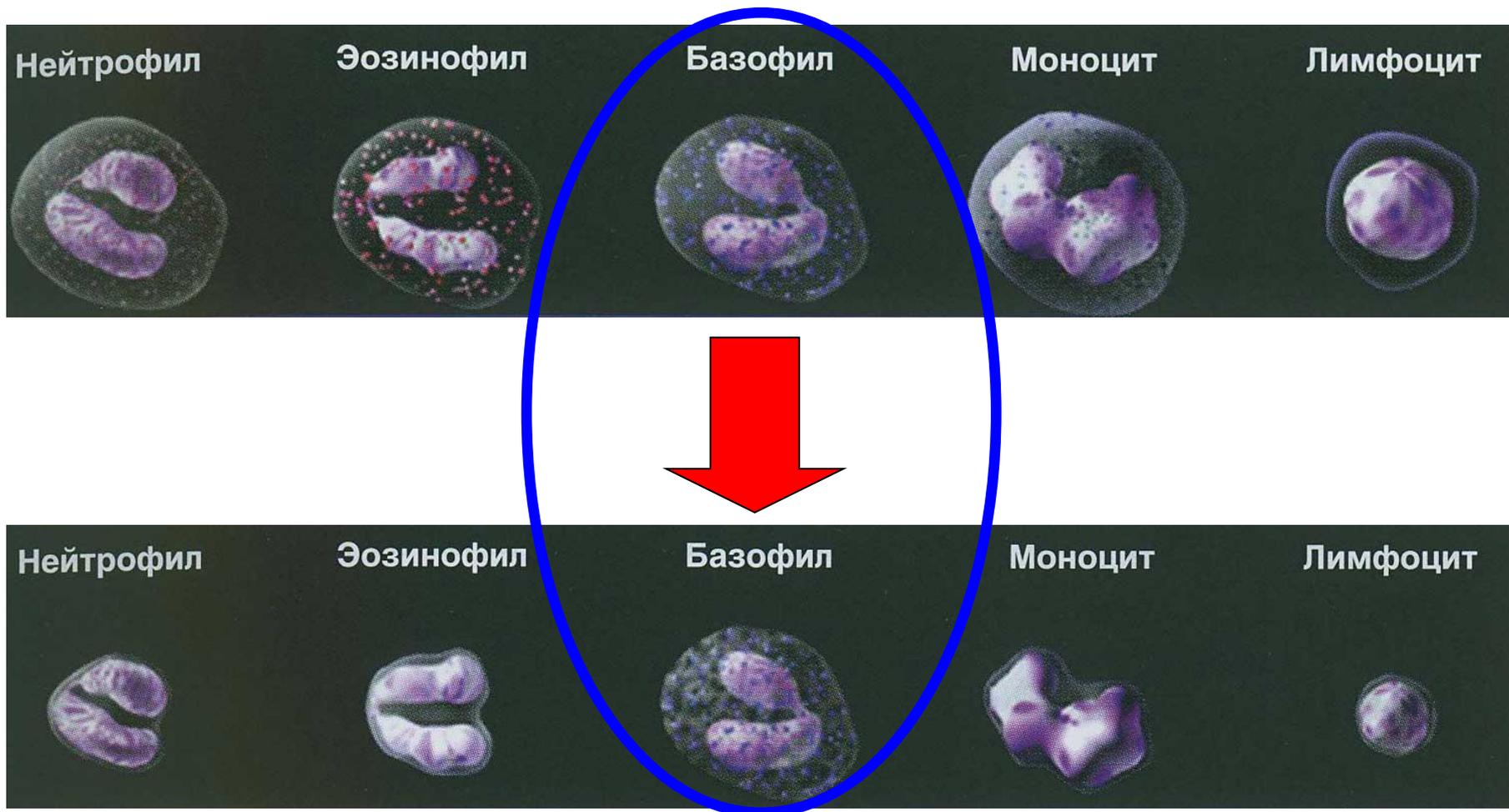


На основании полученных сигналов все клетки распределяются по соответствующим кластерам в соответствии с их **размером, структурой и количеством ДНК.**

Лейкоцитарная скатерограмма:
 лимфоциты,
 моноциты,
 эозинофилы
 нейтрофилы вместе с
 базофилами

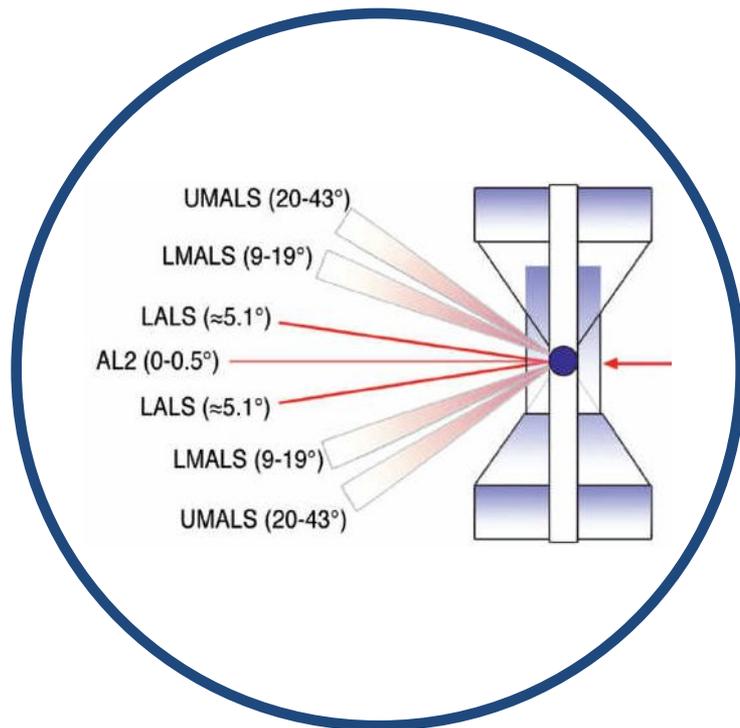


Разделение нейтрофилов и базофилов происходит в **базоканале**, где используется метод специфического химического лизиса, основанный на предварительной обработке лейкоцитов реактивом, осуществляющим лизис всех клеток, за исключением базофилов



Цифровая морфология методом проточной цитометрии

29 различных измерений для каждой клетки:

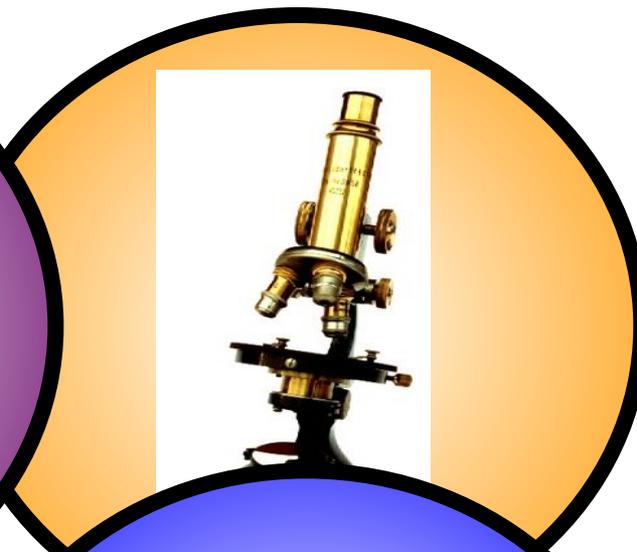


- ✓ Объем
- ✓ Проводимость в радиочастотном токе
- ✓ Рассеяние: 5 углов
- ✓ Соотношение ядро/цитоплазма
- ✓ Цитоплазматические структуры
- ✓ Гранулярность
- ✓ Структура ядра

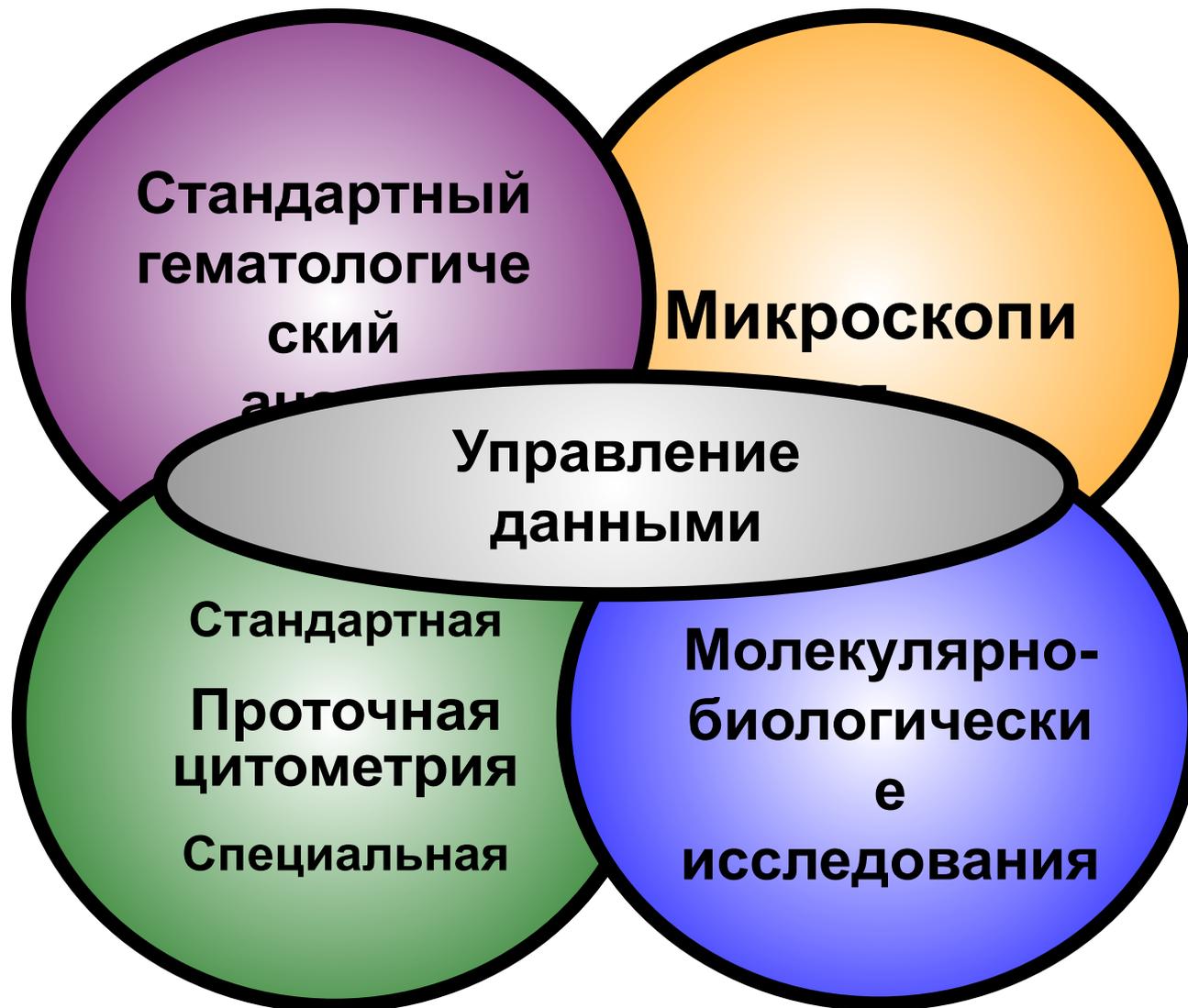
Возможность объединения нескольких приборов



Технологии, использующиеся в гематологической лаборатории



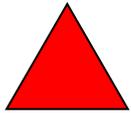
Технологии, используемые в гематологической лаборатории



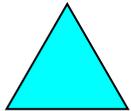
Диагностические возможности гематологических анализаторов

- ▲ Диагностика и дифференциальная диагностика анемий
- ▲ Диагностика тромбоцитопатий и тромбоцитопений.
- ▲ Диагностика гемобластозов
- ▲ Оценка состояния гемопоэза
- ▲ Мониторинг за мобилизацией стволовых клеток из костного мозга.
- ▲ Оценка эффективности проводимой терапии

Правила выбора гематологического анализатора



В первую очередь, при выборе анализаторов необходимо определиться с потребностями лаборатории, объёмом и сложностью проводимых исследований



Производительность

Помимо структуры исследований важным вопросом является производительность приборов. Приборы первых двух классов производят до 60 анализов в час. Приборы старшего класса имеют производительность от 60 до 120 анализов в час. Скорость работы приборов лимитирована как самой методикой исследования, так и особенностями подготовки проб.

Правила выбора гематологического анализатора

Пробоподготовка

● Полуавтоматические анализаторы – требуется дилютер

● Полностью автоматические анализаторы

работают только
с предразведенной
кровью



работают
непосредственно с
цельной кровью



Правила выбора гематологического анализатора

Объем пробы

Современные гематологические анализаторы используются для анализа от 10 до 300 микролитров цельной крови. Более низкие объемы крови позволяют использовать систему в педиатрии, а также более экономно расходовать кровь, что дает возможность проведения повторных исследований. Кроме того, более низкие объемы проб **снижают потребление реагентов.**

Реагентная база

Количество разных реагентов, используемых анализатором, существенно влияет на себестоимость и качество исследований.

Составляющими комплектов реагентов являются:

-  -Изотонический разбавитель
-  -Лизирующий раствор
-  -Промывающий раствор (после каждой пробы)
-  -Промывающий раствор (для глубокой очистки системы)
-  -Очищающий раствор (для экстренной очистки датчика и/или сервисных работ)

Реагентная база

- **Изотонический разбавитель** - это буферный раствор с фиксированными параметрами pH, электропроводности и осмолярности. Стабилизирующие добавки в изотоническом разбавителе должны обеспечивать сохранность форменных элементов крови в течение достаточно длительного времени в первом разведении крови. Присутствие в растворе антикоагулянта должно эффективно предотвращать образование фибриновых сгустков и агрегацию тромбоцитов. В случае гематологических анализаторов, проводящих дифференциацию лейкоцитов на три популяции, изотонический разбавитель содержит специальные добавки, модифицирующие мембраны лейкоцитов.
- **Лизирующий раствор (гемолитик)** - содержит сложную композицию ионных поверхностно-активных соединений. Добавление гемолитика в изотонический разбавитель приводит к лизису эритроцитов, сжатию стромы эритроцитов до частиц размером менее 20 мкм³, что позволяет подсчитывать лейкоциты. Под действием гемолитика в анализаторах 2 класса лейкоциты изменяют свои размеры, что позволяет разделить их на 3 популяции.

Реагентная база

Промывающие растворы - непосредственно не участвуют в процессе измерения, однако их свойства существенно влияют на стабильность аналитических характеристик анализаторов.

Современное решение проблемы качественной промывки прибора - **применение ферментативных промывающих растворов**. Благодаря наличию ферментов, такие растворы эффективно удаляют адсорбированные на стенках гидравлической системы белки и другие вещества. При этом они совершенно нейтральны и не оказывают вредного действия на детали прибора.



Реагентная база

Очищающий раствор на основе гипохлорида натрия является очень эффективным реагентом для устранения спонтанно возникших засоров (фибриновые нити, сгустки), а также при профилактическом обслуживании сервисными инженерами.



Так как гипохлорид натрия очень едкое вещество, разрушающее при долгом контакте детали из пластика и металла, его использование целесообразно только в экстренных случаях.



Правила выбора гематологического анализатора

● Система представления информации

Обычной формой предоставления результата являются абсолютные и относительные показатели, а также гистограммы и флаги. Использование флагов и гистограмм существенно упрощает расшифровку результатов анализа. Наличие у приборов специальных интерфейсов, позволяющих выводить информацию на принтер, внутри лабораторную сеть или отдельно стоящий компьютер, является в настоящее время обязательным требованием. Также важным является сохранение результатов исследования в памяти прибора.

Правила выбора гематологического анализатора

Система контроля качества



Большой проблемой по работе с гематологическими анализаторами является система контроля качества исследований. Многие из программ контроля качества, используемые современными гематологическими анализаторами, не отвечают **российским стандартам**. Убедитесь, что выбранный вами гематологический анализатор имеет все необходимое для проведения процедур контроля качества по методикам, принятым в вашей лаборатории.

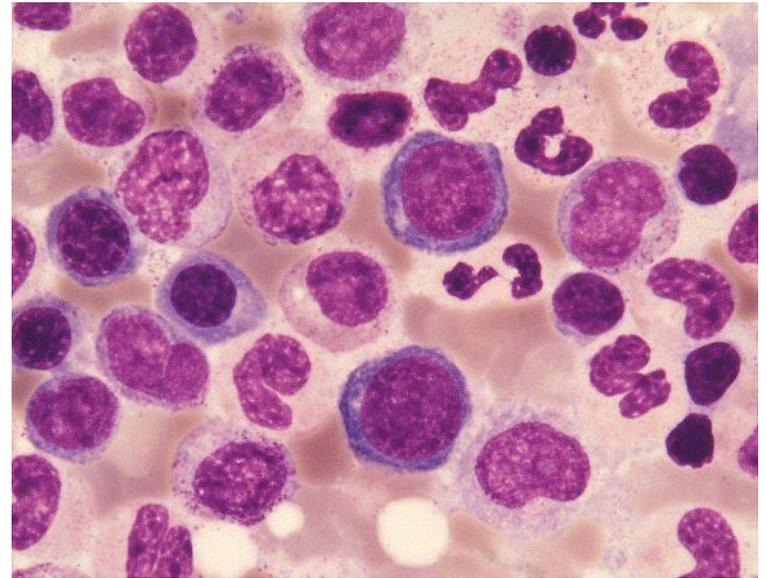
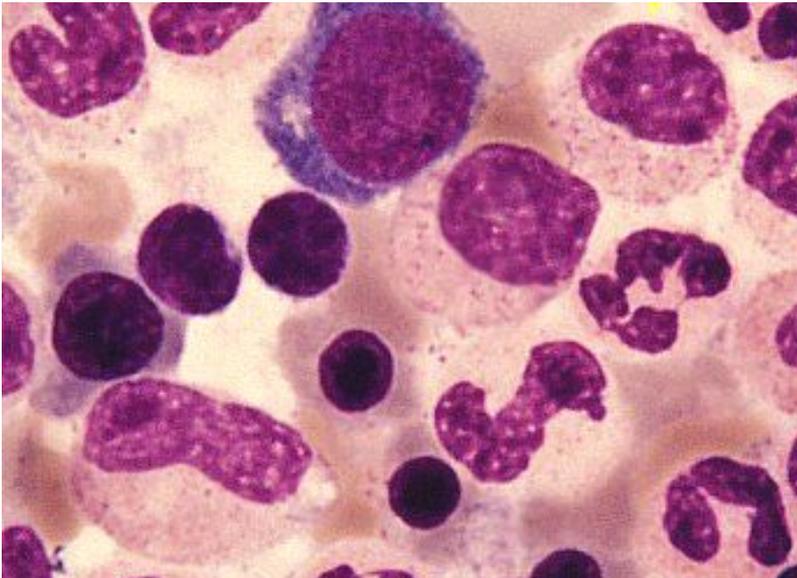
Таким образом, при выборе гематологического анализатора следует учитывать целый ряд факторов:

- Измеряемые параметры
- Метод исследования
- Производительность прибора
- Автоматическая или полуавтоматическая подготовка проб
- Объём пробы
- Реагентная база
- Удобная система выдачи информации
- Наличие программы контроля качества
- Совокупная стоимость владения



Заключение

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



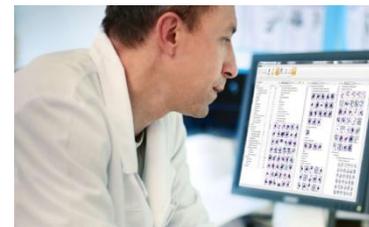


Характеристика современных технологий окраски клеток крови и костного мозга



Цели автоматизации

- высокое качество и однотипность получаемых препаратов;
- повышение производительности труда;
- реализация методик окраски, трудно выполнимых вручную
- обеспечение безопасных условий труда лаборантов.



Лабораторный процесс сегодня



патологические пробы

- микроскопия с подсчетом 100 клеток для анализа лейкоцитарной формулы



WBC Est		
Neut	52	60
Lymph	35	29
Mono	7	8
Eos	1	3
Baso	1	
NRBC		
Band		
Imm Gran		
Var Lymph		
Blast		

г/л. 4

Автоматическая фиксация и окраска мазков



Нема-Тек® 2000, Bayer Group (США)



Нема-Тек® 2000, Bayer Group (США)



Poly Stainer, IUL,S.A. (Испания)



Stainingmaster 2032/8/DI MDS-Group (Германи)

Автоматическая фиксация и окраска мазков



ЭМКОСТЕЙНЕР-АВТО
(АФОМК8-В-01), ООО ЭМКО
(Россия)



Aerospray Hematology Pro™ Wescor Inc.
(США)



- 1 – крышка рабочей камеры,
- 2 – ручка крышки рабочей камеры,
- 3 – блок управления,
- 4 – сенсорный графический экран,
- 5 – корпус автомата,
- 6 – мнемоническое светодиодное табло,
- 7 – винтовые ножки корпуса,
- 8 – крышка входного отверстия вентиляции с воздушным фильтром,
- 9 – крышка блока питания с выключателем питания, розеткой сетевого шнура, крышкой предохранителей,
- 10 – решётка выходного отверстия вентиляции.

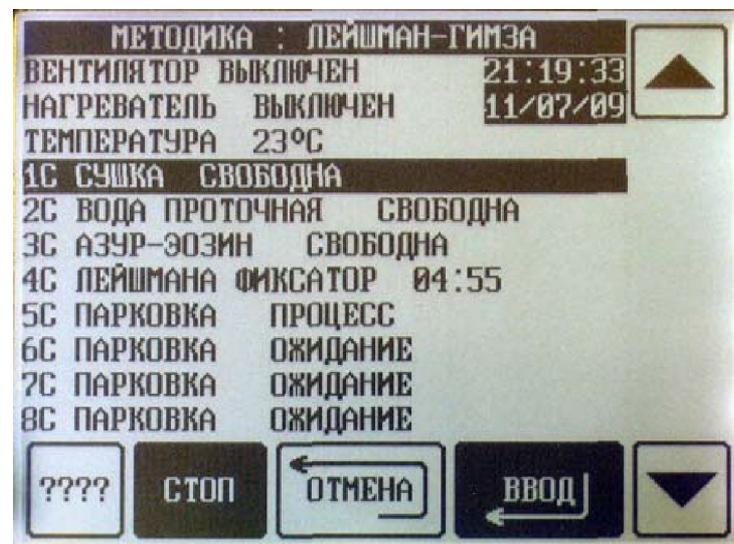
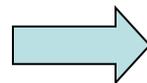
ЭМКОСТЕЙНЕР-AВТО
(АФОМК8-B-01), ООО ЭМКО
(Россия)



Рабочая камера автомата с установленными поддонами, ваннами и штативами



Пример отображения состояния автомата во время технологического процесса

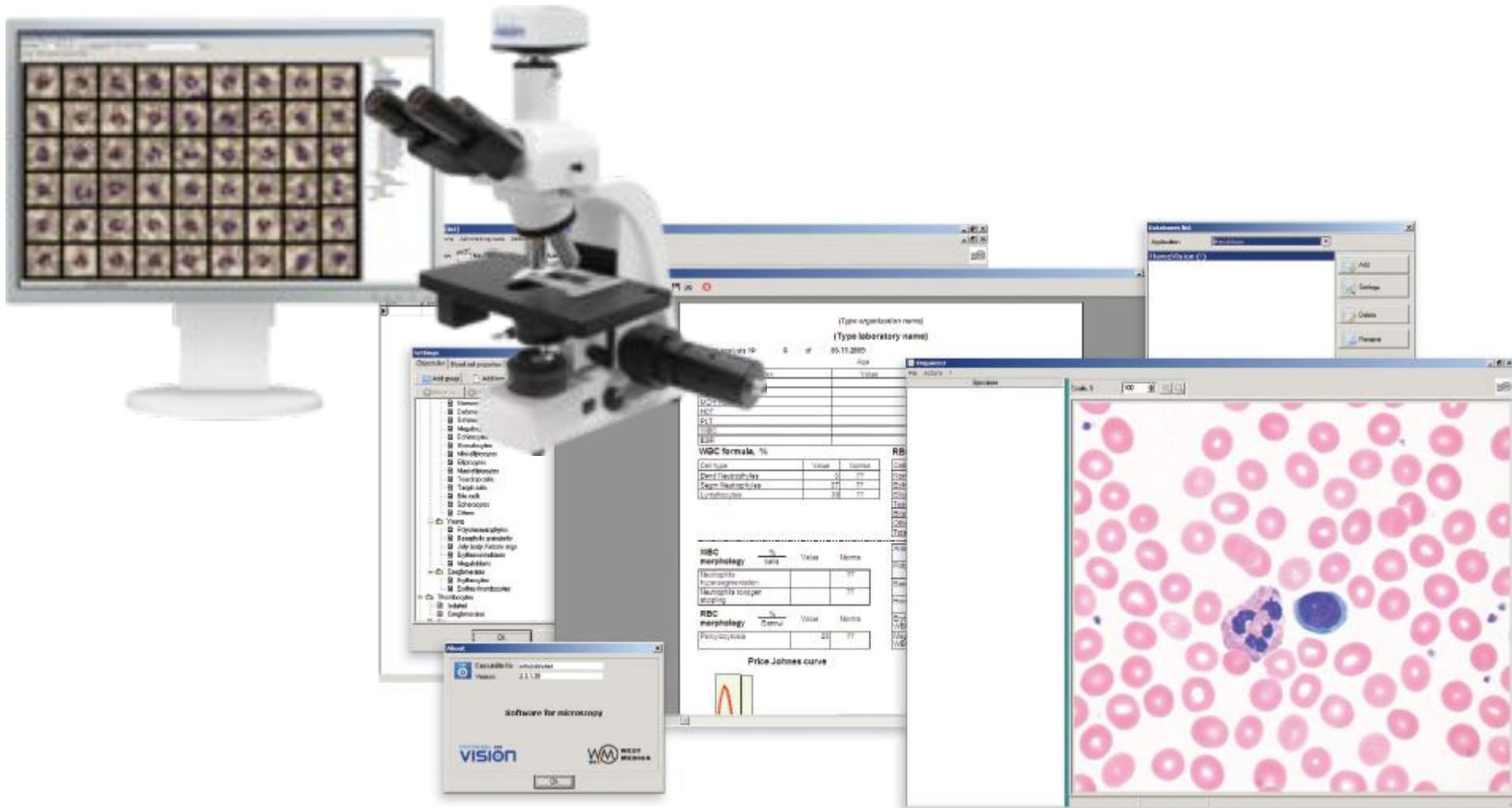


Микроскопическое исследование клеточных элементов

- Окрашенный препарат крови должен сначала быть рассмотрен с помощью иммерсионного объектива (90x) и окуляра 7x или 10x.
- При исследовании эритроцитов важно выявить отклонения в их размере, форме, степени насыщения и распределении гемоглобина, а также наличие включений.
- Затем оценивается число и морфология тромбоцитов и проводится дифференциальный подсчет лейкоцитов.



Автоматическая цифровая система анализа мазка крови Vision Нета (Австрия)



Процедура автоматического анализа



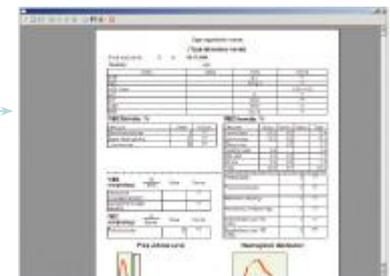
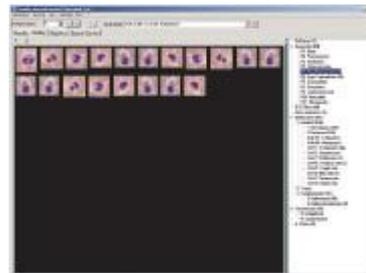
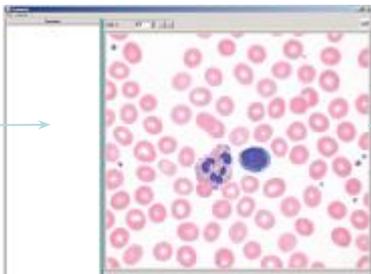
Приготовьте препарат

Установите препарат на моторизованном столике

Введите препарат в базу данных

Создается новая запись

Автоматический ввод препарата в программу благодаря моторизации



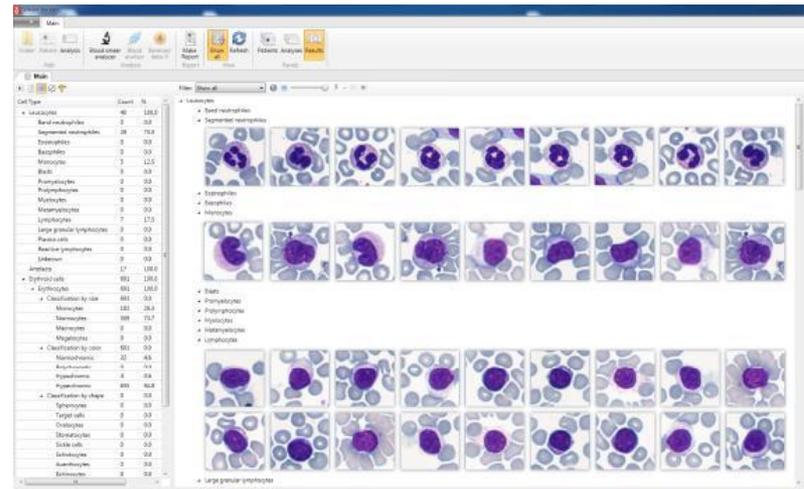
Вы получаете цифровой препарат

Запустите «Анализ»

Автоматический анализ, подсчет и сортировка клеток крови, включая лейкоциты

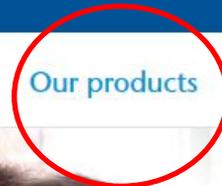
Подготовка отчета

Процедура автоматического анализа





<http://www.cellavision.com>



We help hematology laboratories automate and simplify the process of performing blood and body fluid differentials.



We help
laboratories
and simplify
of performing
and blood
differentials.

- CellaVision® DM1200 >
- CellaVision® DM9600 >
- CellaVision® Peripheral Blood Application >
- CellaVision® Advanced RBC Application >
- CellaVision® Body Fluid Application >
- CellaVision® Remote Review Software >
- CellaVision® Server Software >
- CellaVision® Image Capture System >
- CellaVision® Proficiency Software >
- CellaVision® CellAtlas >

An introduction to our technology

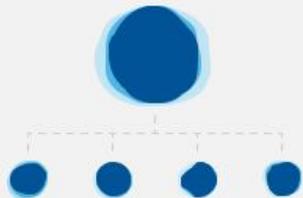
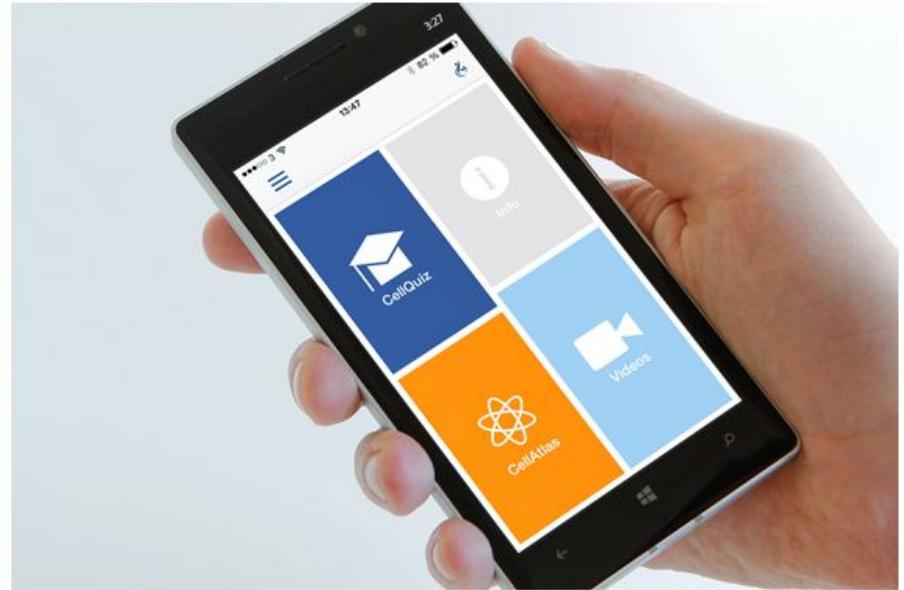
In most hematology labs, cell differentials are performed using manual microscopy. But this traditional process is not without its limitations. Our innovative technology replaces manual microscopy and transforms the process of performing blood and body fluid differentials.

[Learn more >](#)



Welcome to CellaVision® CellAtlas

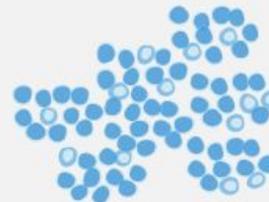
CellaVision CellAtlas is an app developed by CellaVision in close partnership with morphology experts from around the world. It combines a series of mini lectures with an extensive cell image library – giving students and laboratory professionals a top-line introduction to cell morphology. Download it on your smartphone today or explore the online- version below.



Hematopoiesis



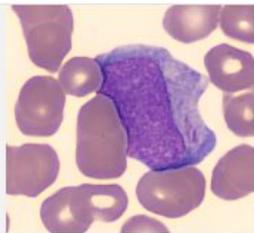
Leukocytes in Peripheral Blood



Erythrocytes in Peripheral Blood

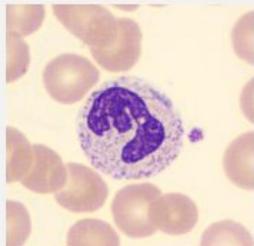


Other findings in Peripheral Blood



Auer Rods

- 0.2-0.5 microns
- Azurphilic round or rod shaped cytoplasmic inclusions
- Mostly seen in immature granulocytes
- Found in blast cells associated with acute myeloid leukemia



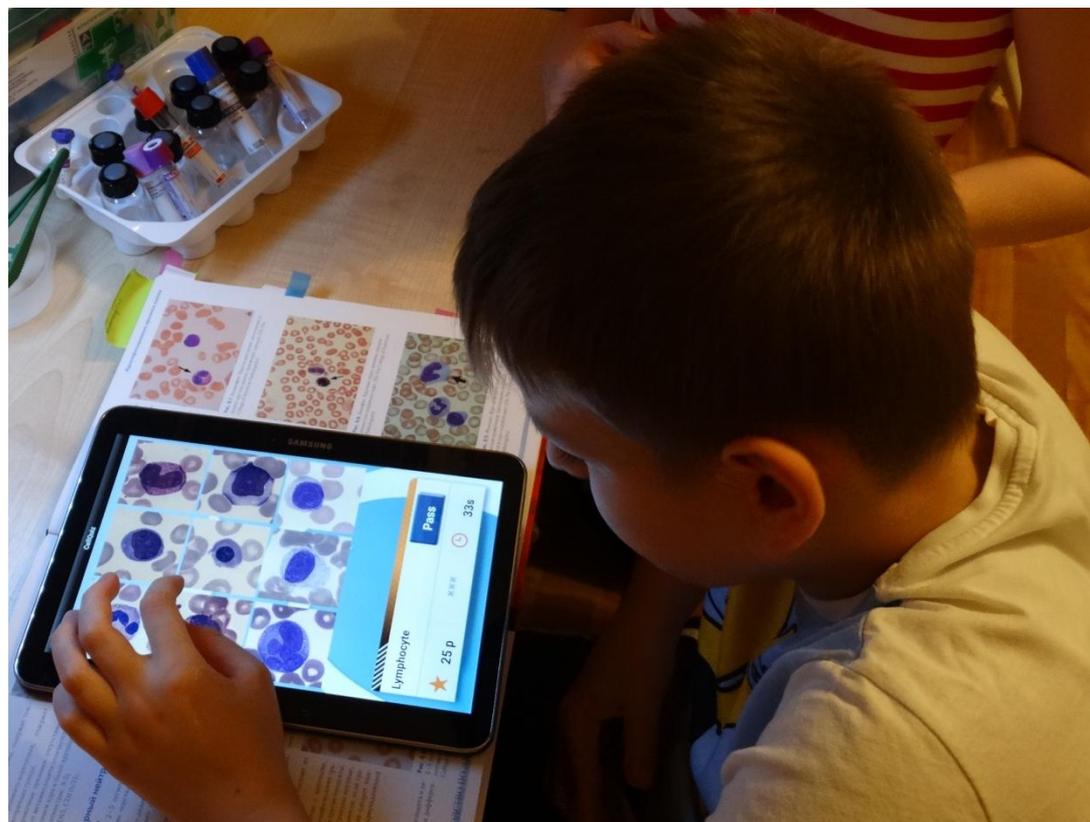
Döhle Bodies

- 1-2 microns Light blue or blue-gray oval structure
- Usually found at the periphery of the neutrophil
- Consist of ribosomes and endoplasmic reticulum
- Found in bacterial infections and in a benign inherited condition known as May-Heggling Anomaly



Segmented Neutrophil

- 10-15 microns
- Nucleus with coarse, clumped chromatin structure with 3-5 segments
- Plentiful pale pink to colorless cytoplasm
- Moderate to plentiful very fine violet granules



Спасибо за внимание!