

Гистологические анализы. Интерпретация результатов анализа

Периоды клинических лабораторных исследований

- ❶ **Преаналитический** (*от назначения врачом анализа до доставки биологического материала в лабораторию, подготовка проб к анализу*)
 - ❷ **Аналитический** (*исследование материала, выдача результатов*)
 - ❸ **Постаналитический** (*интерпретация результатов*)
-

Преаналитический период

- ❖ **Подготовка больного к исследованию** (*прием пищи, физическая и эмоциональная нагрузка, положение тела, циркадные ритмы и т.д.*)
- ❖ **Сбор и хранение материала** (*применение антикоагулянтов, соблюдение анаэробности, обеспечение свободного тока, соблюдение условий забора и хранения материала и т.д.*)
- ❖ **Доставка материала в лабораторию, обработка его до начала анализа** (*гемолиз, задержка отделения плазмы, длительная транспортировка и т.д.*)
- ❖ **Канцелярские ошибки** (*ошибочный больной, образец, заявка, маркировка*)

При плановом назначении исследования ОАК кровь следует брать:

- натощак (после примерно 12 часов голодании, воздержания от приема алкоголя и курения),
 - между 7 и 9 часами утра,
 - при минимальной физической активности непосредственно перед взятием (в течение 20-30 мин),
 - в положении пациента лежа или сидя.
-

Взятие крови на общий анализ



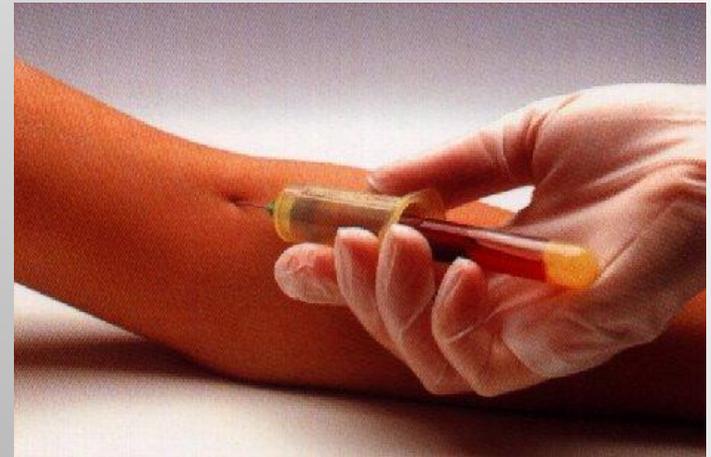
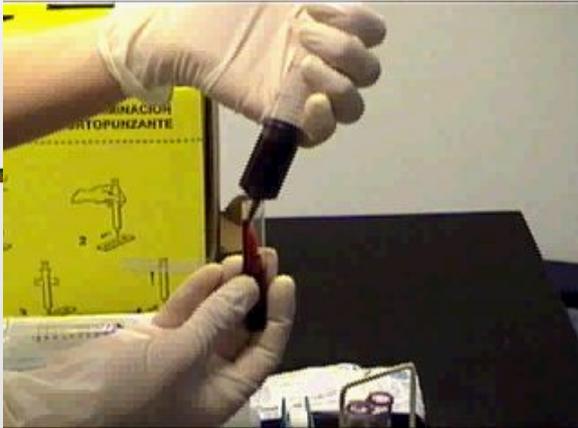
Взятие крови на общий анализ

- Предпочтение отдается взятию венозной крови
- В качестве стабилизатора используются калиевые соли ЭДТА (K_2 ЭДТА или K_3 ЭДТА) в конечной концентрации 1,6 – 2,2 мг/мл
ICSH* и NCCLS** отдают большее предпочтение K_2 EDTA (перед K_3 EDTA), так как K_2 EDTA обеспечивает большую стабильность размера клеток крови и не разбавляет образец.
- Из одной пробирки выполняется весь анализ (включая постановку СОЭ и приготовление мазков)
- При правильном взятии разницы результатов между венозной и капиллярной кровью быть не должно

*International Council for Standardisation in Haematology -
Международный комитет по стандартизации в гематологии

** National Committee for Clinical Laboratory Standards - Национальный комитет по стандартизации в клинической лаборатории (США)

Взятие крови



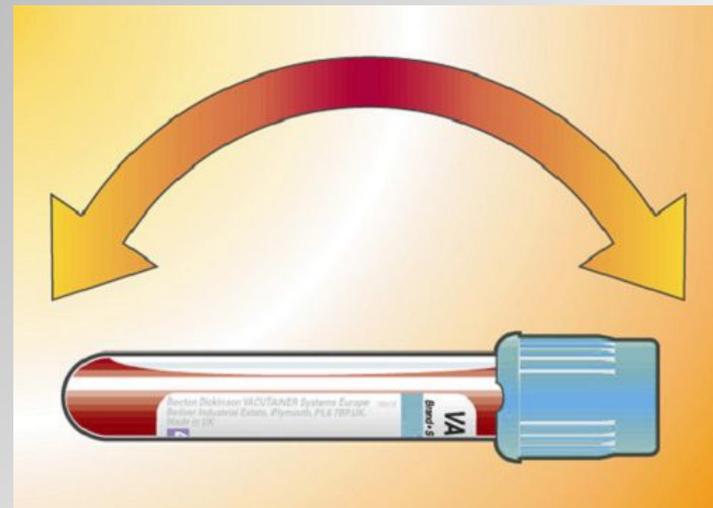
- При переливании крови в пробирку в игле создается давление, увеличивающее вероятность гемолиза и разбрызгивания крови
- В момент переливания крови в пробирку она подвергается воздействию окружающей среды, что приводит к нарушению целостности и стерильности пробы
- Взятие крови с помощью шприца всегда подразумевает возможный контакт с кровью пациента, что может привести к инфицированию
- Для различных тестов необходимо предварительно готовить несколько пробирок с разными реагентами
- Традиционный метод требует от медсестры тщательного дозирования крови в пробирке для соблюдения точного соотношения кровь/реактив

- Тщательно дозированный объем вакуума обеспечивает точное соотношение кровь/ реагент в пробирке
- Это система, позволяющая быстро и качественно взять кровь у пациента.
- Время забора сокращается на 30-50%, при этом кровь в пробирке не подвергается гемолизу
- Одной венепункции достаточно для отбора крови в несколько пробирок

Венозная кровь

Последовательность наполнения пробирок:

1. Кровь без антикоагулянтов - для получения сыворотки, используемой при биохимических и серологических исследованиях;
2. Кровь с цитратом - для получения плазмы, используемой при коагулологических исследованиях;
3. Кровь с гепарином - для получения плазмы, используемой при клинико-химических исследованиях;
4. Кровь с K_2 ЭДТА - для получения цельной крови, используемой для гематологических исследований

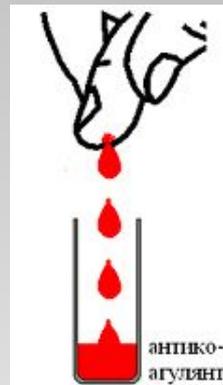
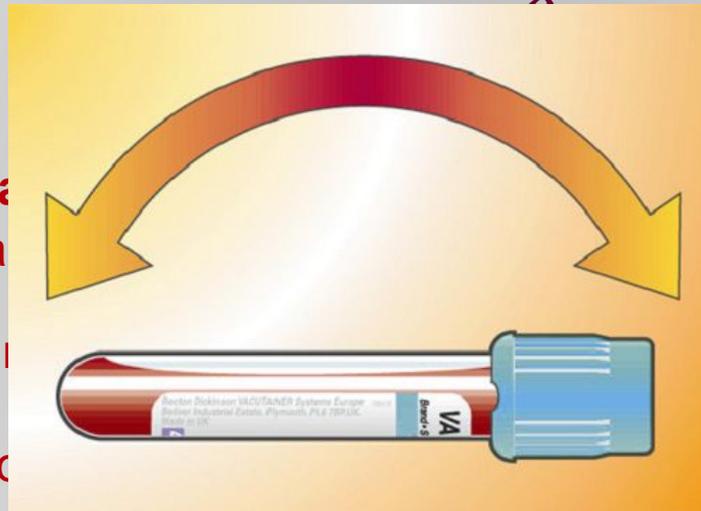


Капиллярная кровь



Капиллярную кровь рекомендуется собирать в следующих случаях:

- при ожогах, заживлении обширных ран, на большой поверхности тела и при наличии у пациента варикозных вен;
- при выраженном ожирении пациента;
- при установленной склонности к венозному тромбозу;
- у новорожденных.



Проблемы и рекомендации :

При заживлении через поврежденную кожу часто происходит свертывание крови, длительность взятия крови критически важным показателем является время свертывания крови. Если кровь не стекает по стенке пробирки и любой другой емкости, так как мгновенно происходит активация процесса

свертывания.

- Кровь самотеком из прокола должна попадать прямо в антикоагулянт, перемешиваясь с ним.
- Нельзя выдавливать кровь из пальца во избежание спонтанной агрегации тромбоцитов и попадания в пробу большого количества межтканевой жидкости (тромбопластина).

Преаналитический период

- ❖ Подготовка больного к исследованию (*прием пищи, физическая и эмоциональная нагрузка, положение тела, циркадные ритмы и т. д.*)
- ❖ Сбор и хранение материала (*применение антикоагулянтов, соблюдение анаэробности, обеспечение свободного тока, соблюдение условий забора и хранения материала и т.д.*)
- ❖ Доставка материала в лабораторию, обработка его до начала анализа (*гемолиз, задержка отделения плазмы, длительная транспортировка и т.д.*)
- ❖ Канцелярские ошибки (*ошибочный больной, образец, заявка, маркировка*)

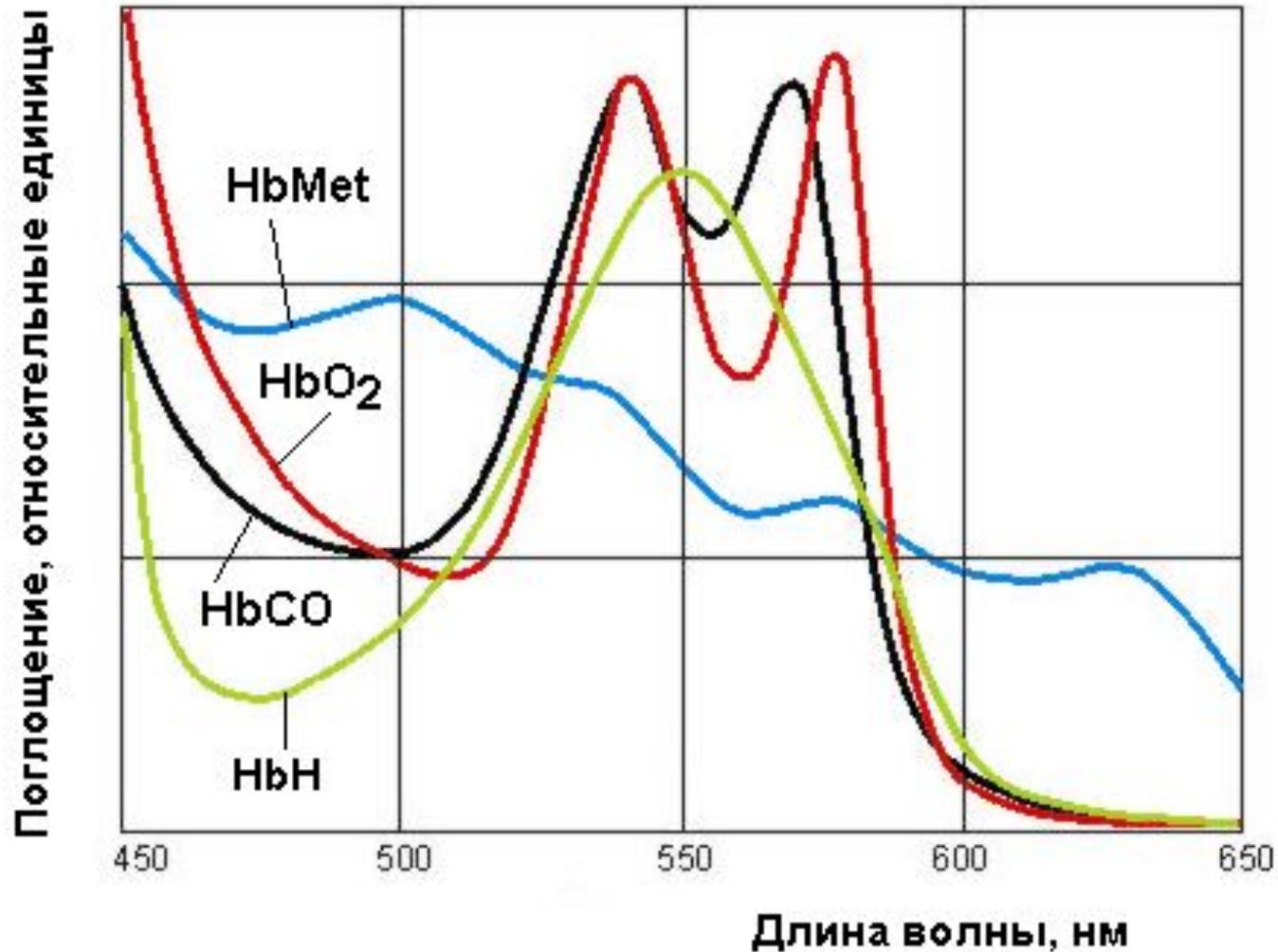
Доставка и хранение

- Автоматизированное исследование крови необходимо проводить либо непосредственно после взятия (исключается возможность спонтанной агрегации тромбоцитов), либо спустя 25 мин (время, необходимое для адаптации тромбоцитов к антикоагулянту) и не позднее 6 -8 часов после взятия образца.
 - Кровь нельзя замораживать. Образцы крови должны храниться при комнатной температуре.
 - Капиллярную кровь с ЭДТА следует хранить при комнатной температуре и анализировать в течение 4 часов после взятия.
 - При необходимости проведения отсроченного анализа (транспортировка на отдаленные расстояния, техническая неполадка прибора и т. д.), пробы крови хранят в холодильнике (4° – 8° С) и исследуют в течение 24 часов.
 - Исследование крови на приборе проводится при комнатной температуре. Кровь, хранившуюся в холодильнике, необходимо вначале согреть до комнатной температуры,
 - Приготовление мазков крови рекомендуется делать не позднее 1-2 часов после взятия крови.
-

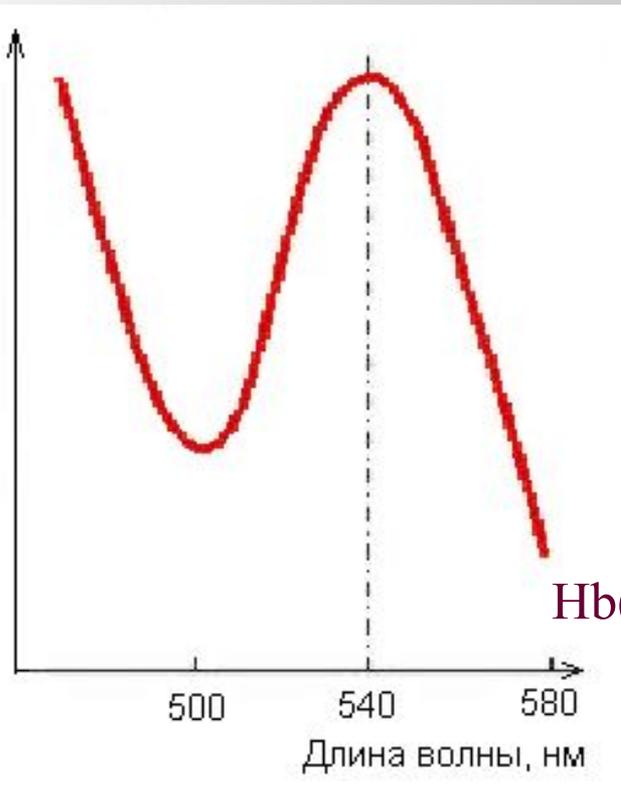
Аналитический период

- ❑ Ошибки дозирования проб (пипетирования)
 - ❑ Дефекты измерительных приборов, калибровок, плохое качество реактивов
 - ❑ Использование устаревших методик
 - ❑ Низкая квалификация и недобросовестность персонала
-

*Спектры поглощения оксигемоглобина (HbO_2),
дезоксигемоглобина (HbH) метгемоглобина
($HbMet$), карбоксигемоглобина ($HbCO$).*



Гемиглобинцианидный метод (метод Драбкина) (1932)



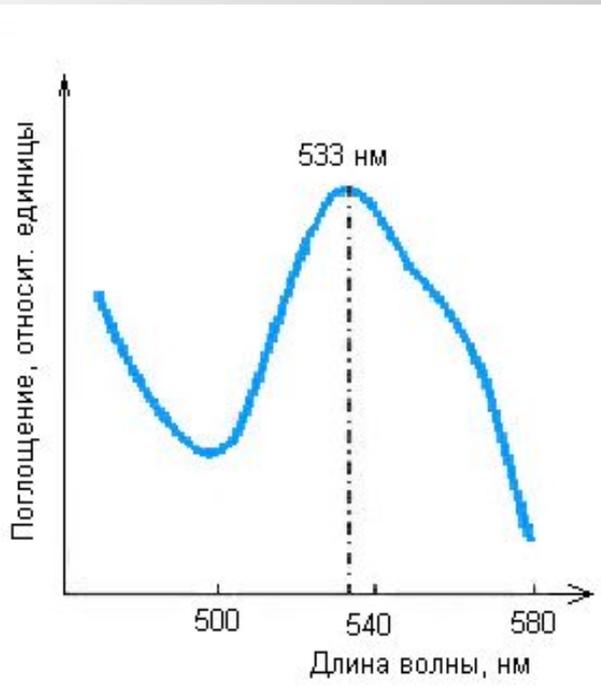
- Принцип метода: все формы гемоглобина преобразуются в гемиглобинцианид (с помощью трансформирующего реагента, содержащего железосинеродистый калий, цианид калия и гидрокарбонат натрия), для которого установлен миллимолярный коэффициент экстинкции, равный 11,0 при длине волны 540 нм

$$\text{Hb(г/л)} = \frac{A_{540\text{HiCN}} \times 16114,5 \times 10^{-3} \times P}{11,0 \times L} = 367,7 \times A_{540\text{HiCN}}$$

$A_{540\text{HiCN}}$ - абсорбция раствора гемоглобина при длине волны 540 нм,
16114,5 - молекулярная масса мономера гемоглобина,
11,0 - коэффициент миллимолярной экстинкции цианметгемоглобина,
L - длина оптического пути, равная в большинстве фотометров 10 мм,
 10^{-3} - перевод молярной массы гемоглобина в миллимолярную массу
P - разведение крови (1 : 251, соотношение 20 мкл крови и 5,0 мл трансформирующего раствора)

*Спектр поглощения
цианметгемоглобина
(CNmetHb)*

Гемихромный метод



Спектр поглощения метгемоглобина (HbMet)

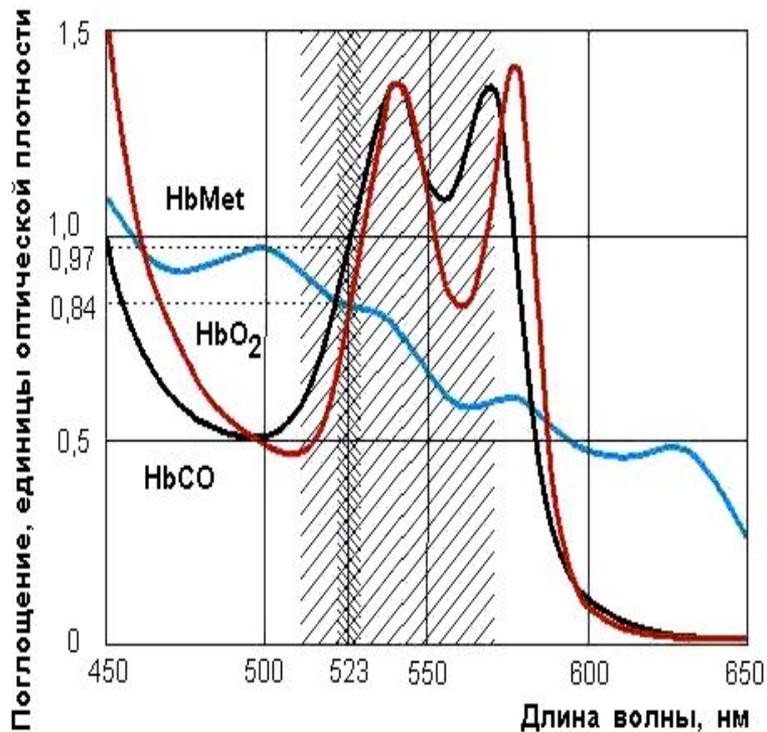
Принцип метода: Схож с методом Драбкина, но без последней реакции - перевода HbMet в CNmetHb

Максимум кривой поглощения гемихрома находится на длине волны 533 нм.

Ближайшая к 533 нм типовая длина волны — 540 нм, на которой и проводится фотометрирование с учетом коэффициента пересчета (фактора) для 540 нм.

Для гемихромного метода фактор равен 398,0 ($\lambda=540$ нм).

Аммиачный метод (модифицированный метод Дервиза-Воробьева).



Спектры поглощения растворов производных гемоглобина.

Принцип метода: выполняется разведение пробы крови (различных производных гемоглобина) в 0,04% растворе аммиака.

Оптимальной (рабочей) является изобестическая точка 523 нм.

В данной точке два производных гемоглобина — оксигемоглобин и метгемоглобин имеют одинаковое поглощение, поэтому результат фотометрирования не зависит от относительного содержания этих производных в растворе.

Возможные ошибки измерения гемоглобина

- из-за повышенной мутности сыворотки при гиперлипидемии, гипербилирубинемии, криоглобулинемии и др. причин.
 - присутствии нестабильных гемоглобинов (Hb S, Hb C);
 - высокие лейкоцитозы (более $100 \times 10^9/\text{л}$);
-

Ошибка при измерении концентрации гемоглобина в хилезной пробе

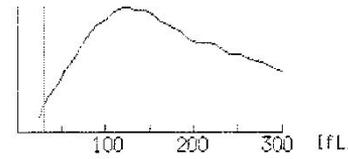
No. 139
Date 28/04/06 12:49
Mode WB

Assay Report by the Analyzer

ID 22
Time 28-04-2006 12:55

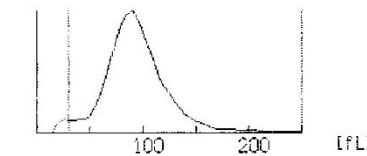
WBC WL! $299.1 \times 10^9/L$
RBC - $2.35 \times 10^{12}/L$
HGB * $82g/L$
HCT -0.217
MCV 92.3 fL
MCH * $34.9pg$
MCHC * $378g/L$
PLT AG $290 \times 10^9/L$

WBC 258.3 $\times 10^9/L$ H
Lymph# 36.9 $\times 10^9/L$ H
Mid# 36.4 $\times 10^9/L$ H
Gran# 185.0 $\times 10^9/L$ H
Lymph% 14.3 % L
Mid% 14.1 % H
Gran% 71.6 % H

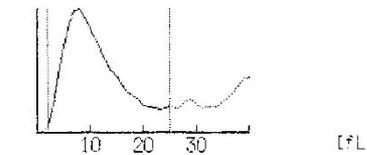


WBC HGB 127 g/L
RBC $2.33 \times 10^{12}/L$ L
HCT 20.5 % L
MCV 88.4 fL
MCH 54.5 pg H
MCHC 619 g/L H
RDW-CV 18.7 % H
RDW-SD 59.9 fL H
PLT $296 \times 10^9/L$
MPV 13.5 fL H
PDW 16.4
PCT 0.399 % H

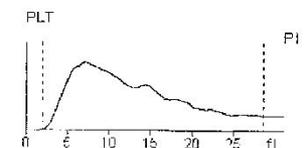
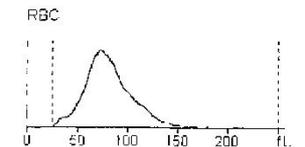
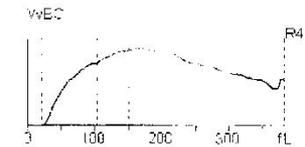
LYM% WL -.-.-
MXD% WL -.-.-
NEUT% WL -.-.-
LYM# WL -.-.- $\times 10^9/L$
MXD# WL -.-.- $\times 10^9/L$
NEUT# WL -.-.- $\times 10^9/L$



RDW +0.228



PDW + 19.5 fL
MPV 11.2 fL
P-LCR 0.373



Источники ошибок при выполнении исследования СОЭ

- Если исследуемая кровь стоит при комнатной температуре, СОЭ должна определяться не позже 2 часов после взятия крови. В случае нахождения крови при $+4^{\circ}\text{C}$, СОЭ определяют в течение не более 6 часов, но перед выполнением реакции кровь должна быть прогрета до комнатной температуры.
- исследование должно выполняться при $18-25^{\circ}\text{C}$. При более высоких температурах значение СОЭ увеличивается, при низких – замедляется.

Искажение результатов наблюдается при:

- при нарушении соотношения кровь/цитрат,
- стоянии пробы на свету, в тепле, под наклоном,
- более 4 часов с цитратом
- При отсутствии резкой границы между эритроцитным столбиком и плазмой (образование светлой «вуали» в несколько миллиметров, из разведенных эритроцитов, главным образом из ретикулоцитов) - определяется граница компактного слоя, а эритроцитарная вуаль причисляется к столбику плазмы.
- Не все пластмассы (полипропил, поликарбонат) могут заменять стеклянные капиллярные пипетки.

Унифицированные методы подсчета количества эритроцитов и лейкоцитов:

- 1. В счетной камере Горяева*
- 2. В автоматическом гематологическом анализаторе*

Унифицированные методы подсчета количества тромбоцитов:

- 1. В счетной камере Горяева*
- 2. В автоматическом гематологическом анализаторе*
- 3. В мазках крови (по Фонио)*

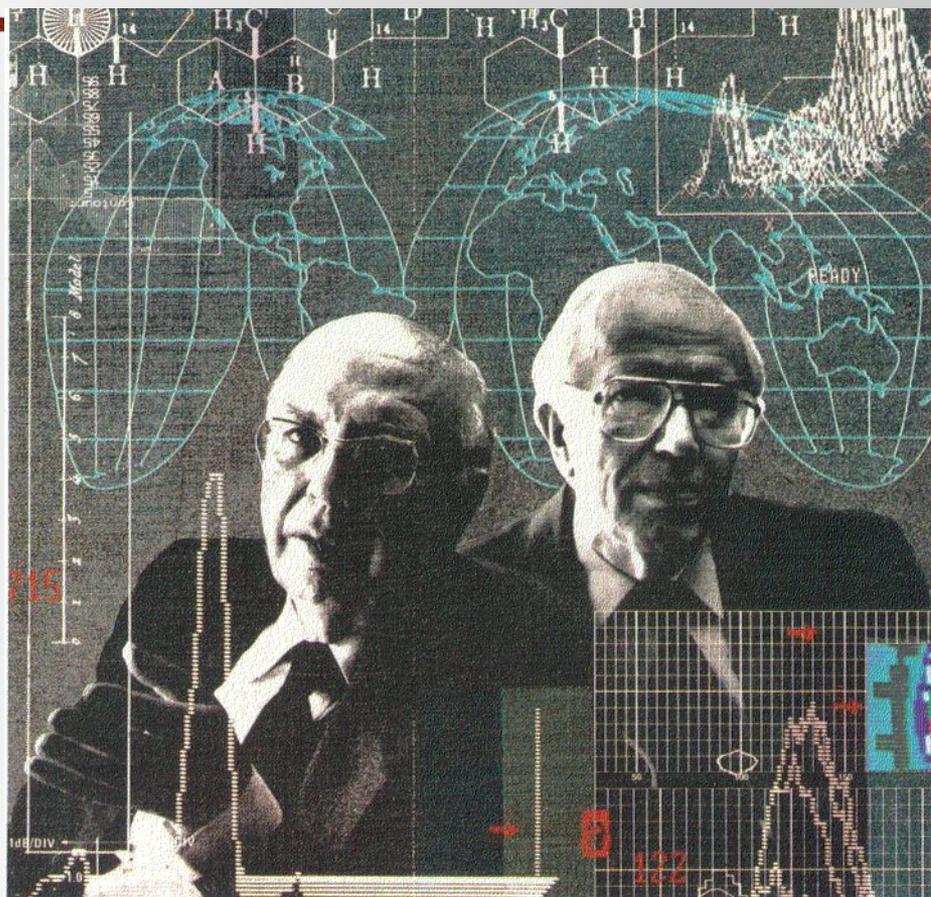
Основными источниками ошибок при подсчете эритроцитов в камере Горяева

- Неточное взятие крови в пипетку.
 - Образование сгустка, поглощающего часть клеток и занижающего результат исследования.
 - Недостаточное перемешивание содержимого пробирки перед заполнением камеры.
 - Неправильная подготовка камеры: недостаточное притирание покровных стекол; неравномерное заполнение камеры, образование пузырьков воздуха и .т.д.
 - Подсчет эритроцитов сразу после заполнения камеры, не выжидая 1 минуту.
 - Подсчет меньшего, чем требуется по методике, количества квадратов.
 - Плохо вымытые камера, пробирки, пипетка, капилляр для взятия крови; недостаточно просушенные пробирки и пипетки.
 - Использование недоброкачественного разводящего раствора.
-

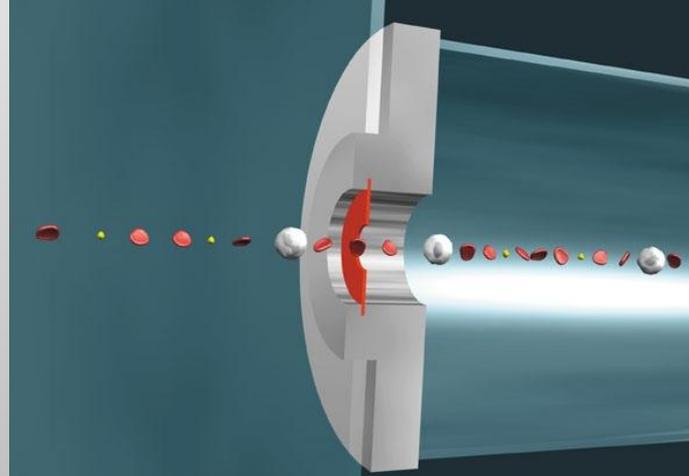
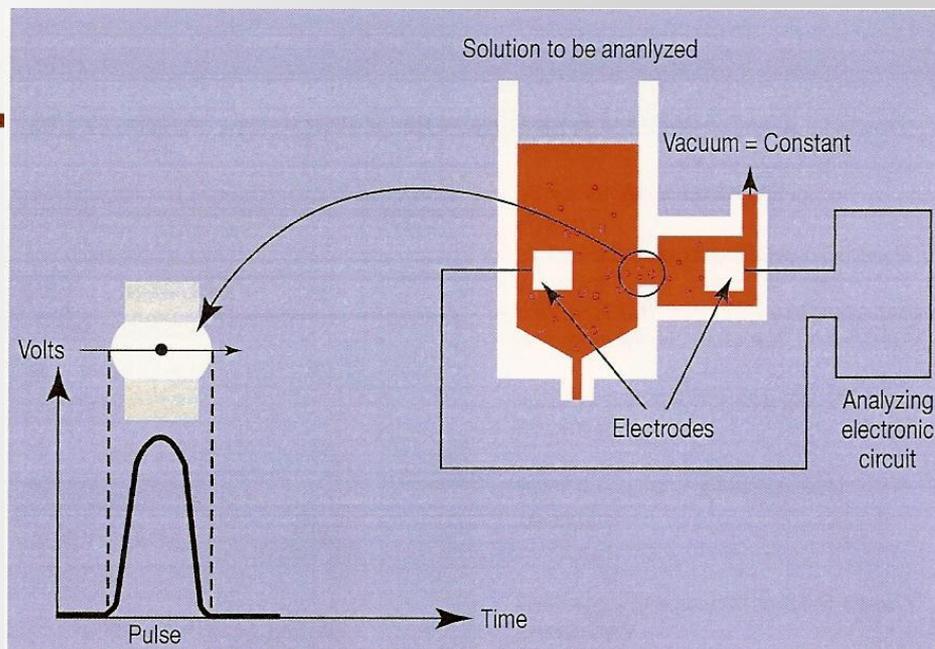
Основные источники ошибок при подсчете лейкоцитов в камере:

- Неправильное соотношение объемов крови и уксусной кислоты, взятые в пробирку.
 - Неправильно подготовленный раствор уксусной кислоты (при концентрации большей, чем 5%, часть лейкоцитов может лизироваться, что приведет к занижению результата).
 - Длительное нахождение пробы при температуре выше 28⁰С, что может ускорить лизис лейкоцитов в образце и привести к занижению результата.
 - Неправильное заполнение камеры Горяева (камеру необходимо оставлять на 1 минуту для оседания клеток).
 - Недостаточно хорошо отмытая после предыдущего определения камера Горяева. Оставшиеся в камере лейкоциты могут завышать результаты анализа.
-

**«Мы сделаем анализ крови легче, быстрее, надежнее.
Больной будет в максимальной выгоде.
Coulter W.H.
Coulter Jr.»**



Принцип кондуктометрического метода (м-д Культера)



Условия получения достоверного результата

- ❖ В канале датчика всегда должно быть не больше одной клетки.
- ❖ В пробе не должно быть частиц аналогичных по своим электрическим характеристикам анализируемым клеткам крови

Оценка тромбоцитопоза

PLT (*platelet*) кол-во тромбоцитов 180-320 x 10⁹/л

MPV (*mean platelet volume*) средний объем тромбоцитов 8,1 ± 1,9fl

Увеличение MPV наблюдается при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, гипертиреозе, атеросклерозе, сахарном диабете, у курильщиков и лиц, страдающих алкоголизмом. Транзиторная макроцитомия описана у рабочих, контактирующих с асфальтовыми испарениями, лиц, работающих с ракетным топливом. Крупные тромбоциты с аномальной морфологией появляются при миелопролиферативных заболеваниях.

Уменьшение этого показателя отмечается после спленэктомии и при синдроме Вискотта-Олдрича.

PDW (*platelet distribution width*) показатель анизоцитоза

тромбоцитов

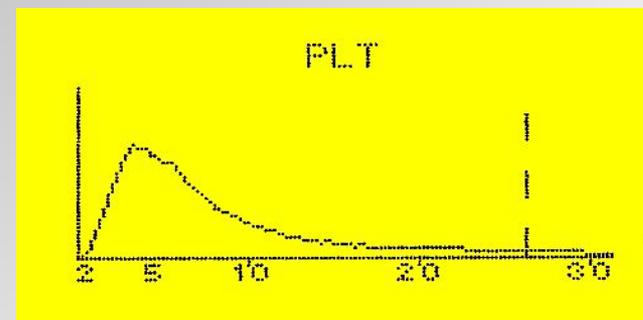
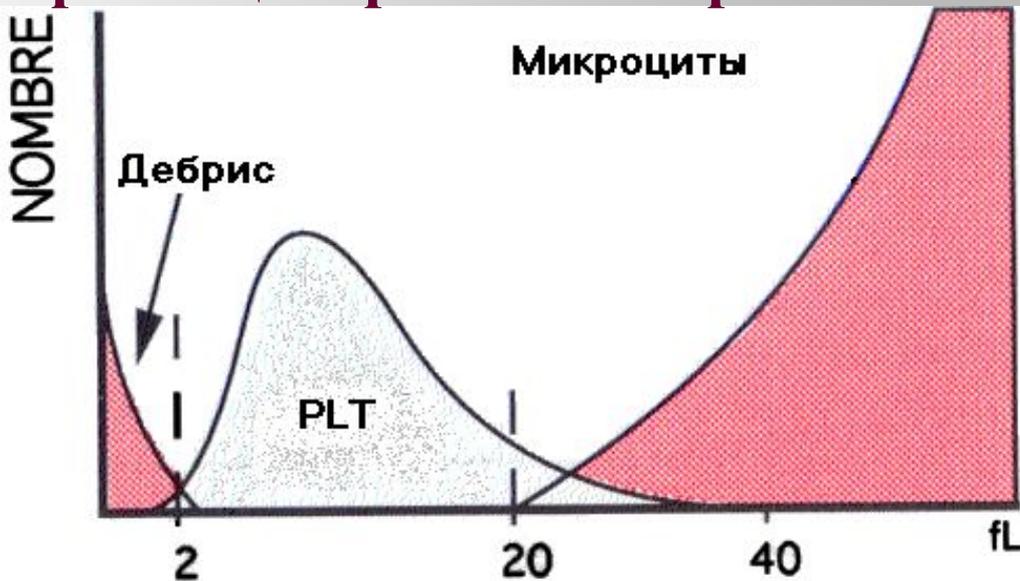
16,3 ± 1,0

РСТ (platelet crit - тромбокрит), % - является параметром, который отражает долю объема цельной крови, занимаемую тромбоцитами. В норме тромбокрит составляет 0,15-0,40%.

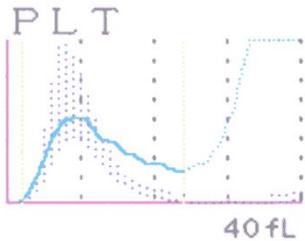
IPF- (Immature Platelet Fraction) - фракция незрелых тромбоцитов. В норме составляет 1,0-10,3%.

Фракция незрелых тромбоцитов отражает состояние костномозгового тромбоцитопоэза. IPF повышается при ДВС-синдроме, идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, регенерации костномозгового гемопоэза после химиотерапии.

тромбоцитарная гистограмма



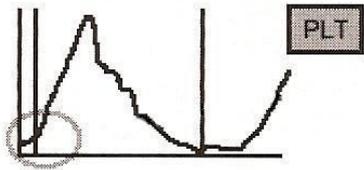
Изменения тромбоцитарных гистограмм



Тромбоцитарная гистограмма не оканчивается на базисной линии. Популяция тромбоцитов не может быть четко отделена от популяции эритроцитов.

Возможные причины:

- микроэритроциты
- Шизоциты
- макротромбоциты
- агрегация тромбоцитов (несовместимость с ЭДТА, инициация свертывания образца крови)

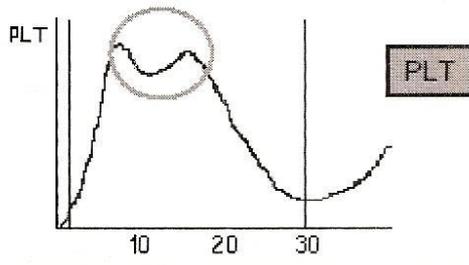


Тромбоцитарная гистограмма не начинается на базисной линии.

Возможные причины:

- Высокое фоновое значение (загрязнение реактивов)
- Фрагменты клеток (эритроцитов, лейкоцитов)

Высокое количество бактерий в крови



Тромбоцитарная гистограмма имеет несколько пиков.

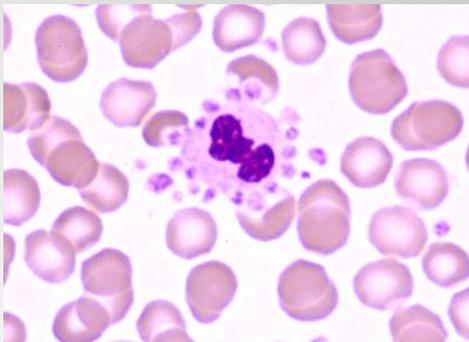
Возможные причины:

- Анизоцитоз тромбоцитов
- Восстановление тромбоцитарного звена после химиотерапии
- Агрегация тромбоцитов (часто наблюдается «Зигзаг»-кривая)

Возможные ошибки измерения

Ложное повышение

- Микроцитоз
- Криоглобулинемия
- Гемолизированные образцы крови
- Наличие фрагментов эритроцитов и лейкоцитов



Ложное понижение

- Агрегация или агглютинация тромбоцитов
- Тромбоцитарный "сателлизм" (прилипание тромбоцитов к лейкоцитам)
- Гигантские тромбоциты
- Агглютинация эритроцитов
- Тромбообразование
- Взятие крови с гепарином
- Гипертромбоцитоз (более $1.000 \times 10^9/\text{л}$)

Оценка лейкопоза

WBC (*white blood cells*)

$CV_{\text{авт.}}$ - 1-3%,

$CV_{\text{руч.}}$ - 6,5-15% (в зависимости от числа лейкоцитов)

Лейкоцитарная формула (% и #)

Лейкоцитарная
формула 3 diff:

Gr - % , #

Mo - % , #

Ly - % , #

Лейкоцитарная формула 5 diff:

Neut - % , #

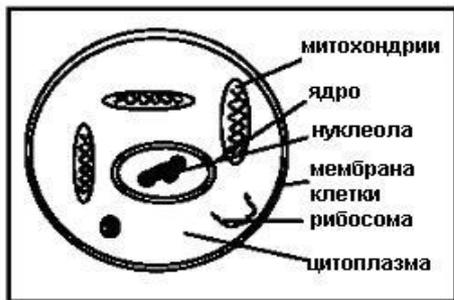
Ео - % , #

Baso - % , #

Мо - % , #

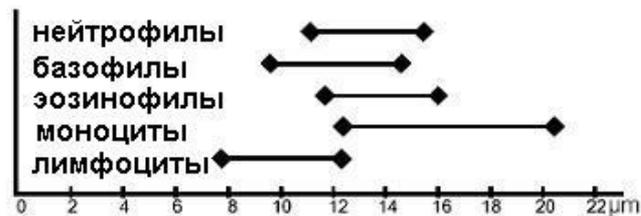
Ly - % , #

WBC-гистограмма или скетограмма



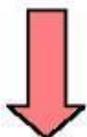
Дифференцировка лейкоцитов на основании метода Культера.

До добавления лизирующего реагента

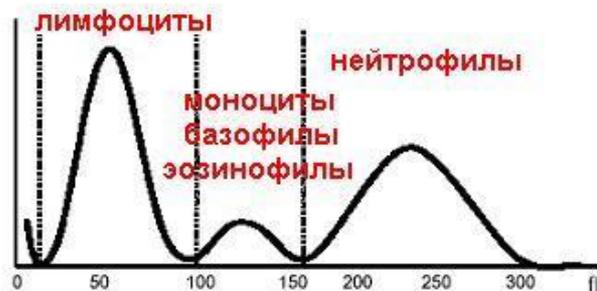


Диаметр клеток в мкм

- 10 - 15
- 9 - 14
- 11 - 16
- 12 - 20
- 7 - 12



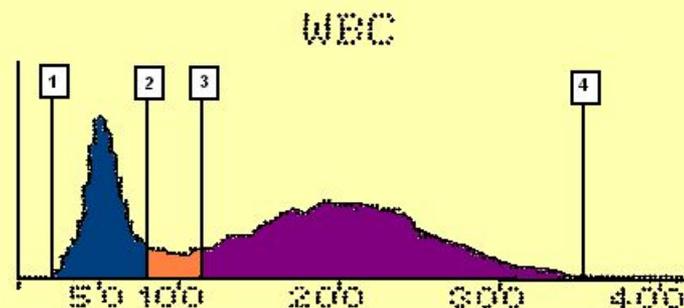
После добавления лизирующего реагента



Действие лизирующего реагента приводит к потере цитоплазмы моноцитами и разбуханию нейтрофилов, тем самым изменяются размеры клеток

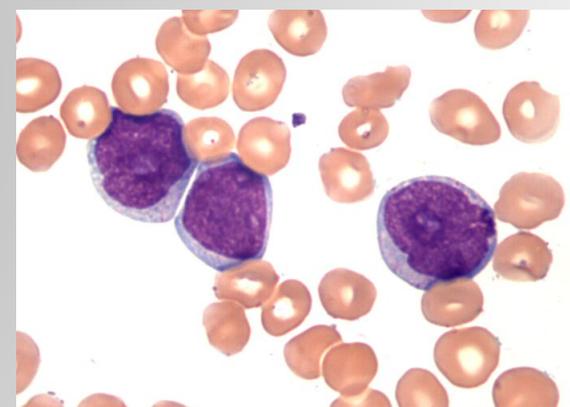
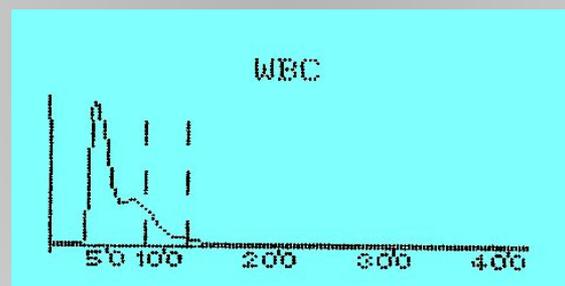
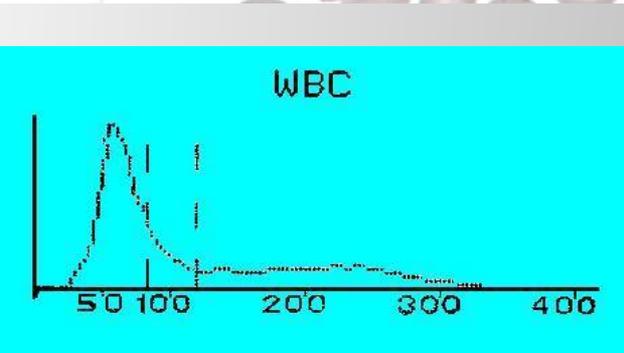
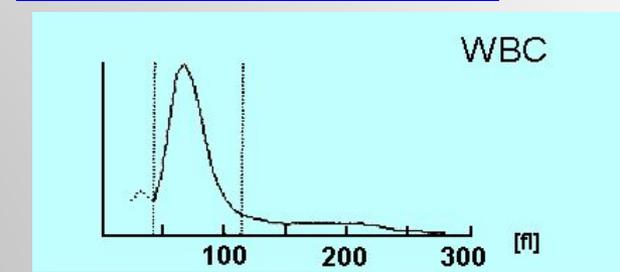
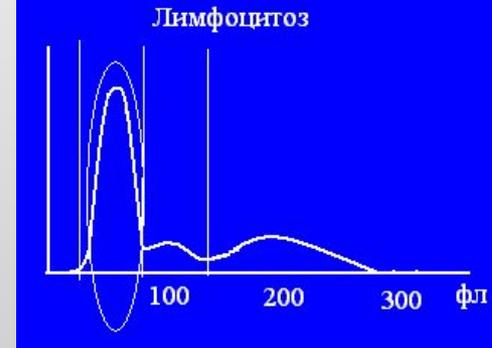
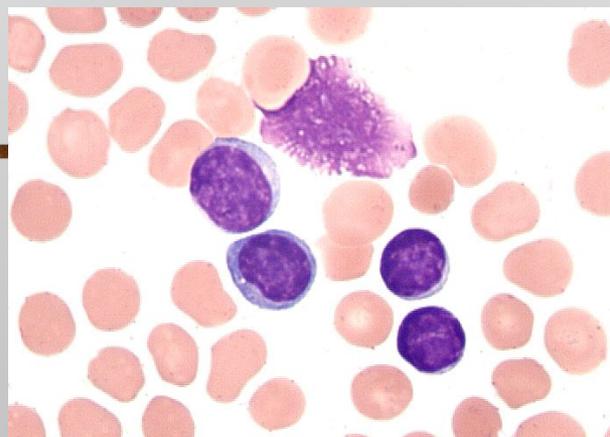
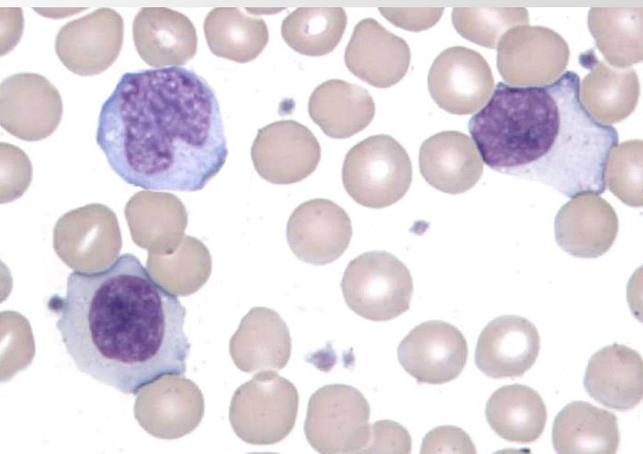
Объем клеток в фл

- лимфоциты 30 - 80
- моноциты 60 - 120
- базофилы 70 - 130
- эозинофилы 80 - 140
- нейтрофилы 120 - 250



Изменения WBC-гистограмм.

Лимфоцитоз

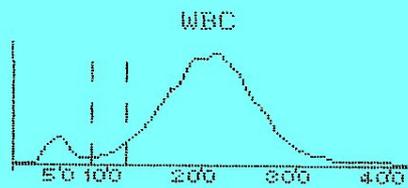
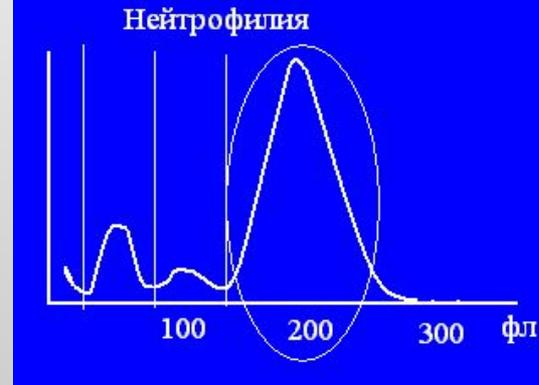


WBC – $7,9 \times 10^9/\text{л}$,
палочкоядерные нейтрофилы – 14%, сегментоядерные нейтрофилы – 13%, моноциты – 7%, лимфоциты – 66% (из них 30 – атипичные мононуклеары).

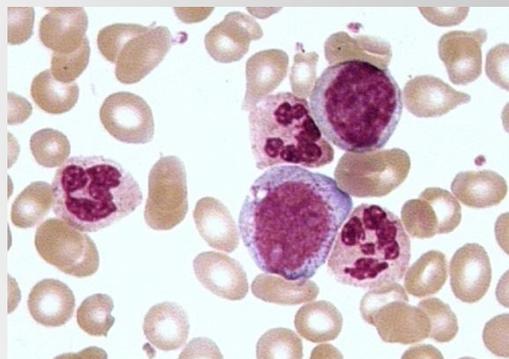
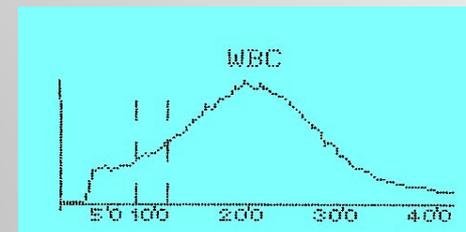
WBC – $229,0 \times 10^9/\text{л}$,
сегментоядерные нейтрофилы – 2%, лимфоциты – 98%.

WBC – $35,0 \times 10^9/\text{л}$, бласты - 66%, миелоциты – 7%, палочкоядерные нейтрофилы – 4%, сегментоядерные нейтрофилы – 13%, моноциты – 2%, лимфоциты – 8%.

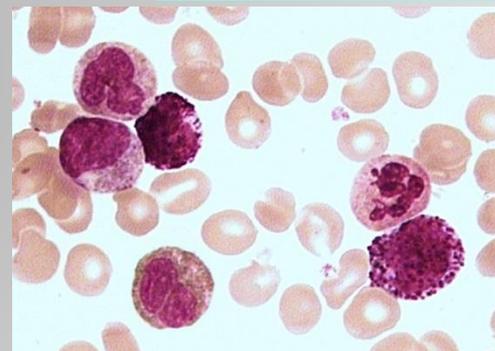
Изменения WBC-гистограмм. Нейтрофилез



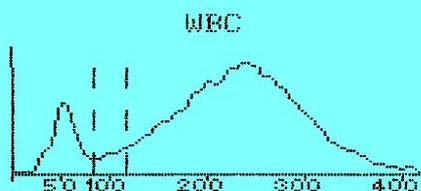
Лейкоцитарная гистограмма периферической крови больного с лейкоцитозом ($13,1 \times 10^9/\text{л}$) и палочкоядерным сдвигом (11%).



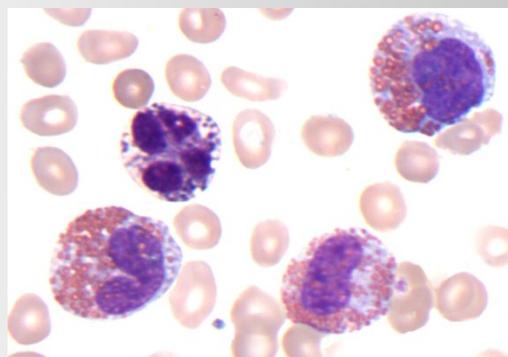
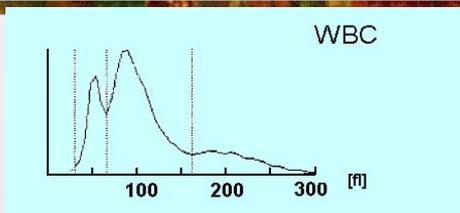
WBC – $34,5 \times 10^9/\text{л}$,
бласты – 7%,
миелоциты – 18%,
метамиелоциты – 2%,
палочкоядерные
нейтрофилы – 16%,
сегментоядерные
нейтрофилы – 39%,
базофилы – 6%,
моноциты – 6%,
лимфоциты – 6%.



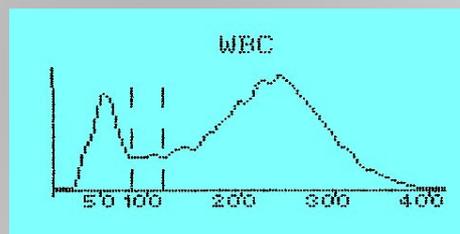
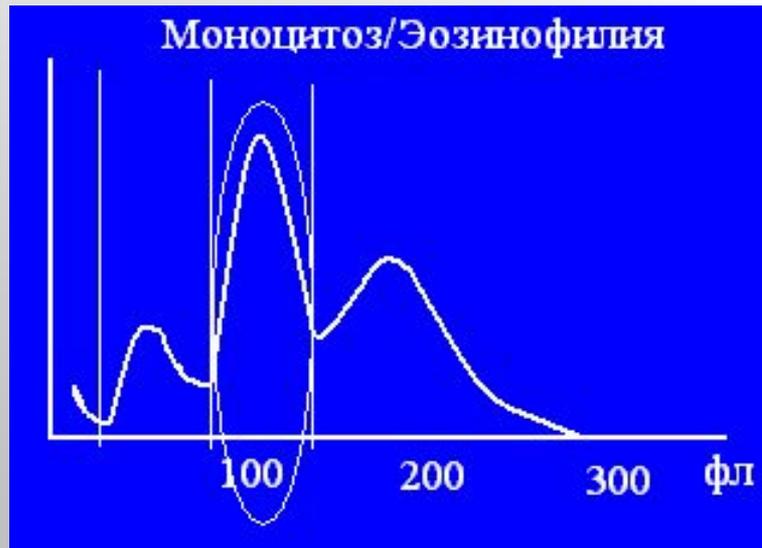
WBC – $117,2 \times 10^9/\text{л}$, бласты – 8%,
миелоциты – 22%, метамиелоциты – 4%,
палочкоядерные нейтрофилы – 15%,
сегментоядерные нейтрофилы – 16%,
эозинофилы – 15%, базофилы – 14%,
моноциты – 3%, лимфоциты – 3%.



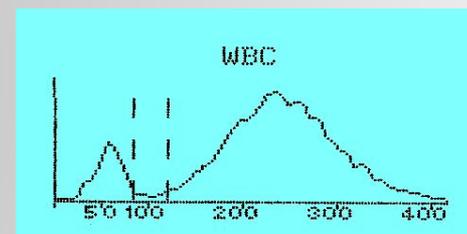
Изменения WBC-гистограмм. Моноцитоз. Эозинофилия



WBC – $12,1 \times 10^9/\text{л}$,
палочкоядерные нейтрофилы – 2%,
сегментоядерные нейтрофилы – 22%,
эозинофилы – 53%,
моноциты – 3%,
базофилы – 1%,
лимфоциты – 19%.



WBC – $9,5 \times 10^9/\text{л}$,
палочкоядерные
нейтрофилы – 4%,
сегментоядерные
нейтрофилы – 59%,
эозинофилы – 1%,
моноциты – 14%,
лимфоциты – 22%.



WBC – $3,3 \times 10^9/\text{л}$,
палочкоядерные
нейтрофилы – 1%,
сегментоядерные
нейтрофилы – 65%,
моноциты – 1%,
лимфоциты – 33%.

Возможные ошибки измерения.

Ложное **завышение** числа лейкоцитов при автоматическом анализе возможно при наличии в крови:

- ядерных красных клеток или устойчивых к лизису эритроцитов;
- агрегатов тромбоцитов;
- криоглобулинов или криофибриногена.

Присутствие ядерных красных клеток и агрегатов тромбоцитов в исследуемых образцах крови сопровождается в большинстве современных гематологических анализаторов появлением соответствующих "сигналов тревоги" на бланках анализов ("NRBC", "Plamb")

Ложное **занижение** количества лейкоцитов наблюдается при разрушении клеток при длительном хранении крови (более 24 часов) или грубом перемешивании.

Исследование проб с гиперлейкоцитозами



Гематологические анализаторы	Степень разведения пробы				Итоговое значение
	Цельная кровь	1:1	1:3	1:4	
1	-- D	274,5	179,5	143,1	715,5
2	322,6	253,2	177,7	141,8	709,0
3	-- D	-- D	168,3	139,1	695,5

Постаналитический период

Неправильная интерпретация результатов

исследований в следствие неучитывания:

- Гипер- или гиповолемии
- влияние фармакотерапии (*результат интерференции лекарственных препаратов или их промежуточных или конечных продуктов метаболизма с определенными веществами в процессе лабораторного исследования ; влияние способа введения лекарства - в/м введение ведет к увеличению КФК, альдолазы, мышечного изофермента ЛДГ*)
- сезонные и климатические влияния (*колебания К, экскреции Са, Р, Na, Mg с мочей и т.д.*)

Контроль качества (КК) - система мер, направленных на количественную оценку точности, воспроизводимости и правильности лабораторных исследований

Сущность КК - сопоставление результатов исследования проб с результатами исследования контрольного материала и измерение величины отклонения.

Цели КК :

- Устранение систематических ошибок и сведение до минимума числа случайных ошибок.
 - Достижение оптимальных стандартных условий исследования биологических жидкостей во всех КДЛ
-

Контроль качества должен быть:

- 1** Систематическим (по единым правилам), повседневным - ***анализ контрольных проб должен включаться в обычный ход работы лаборатории***
- 2** Охватывать все области измерений (***норма, высокие и низкие патологические значения***)
- 3** Производиться в реальных условиях работы лаборатории (***так же, как обычные пробы пациентов, т.е. тем же персоналом и в тех же условиях***)
- 4** Объективным (***желательно «шифровать» контрольный материал, что бы исполнитель не знал, где опыт, а где контроль***)

Основные характеристики внутреннего и внешнего контролей качества

Внутренний контроль качества	Внешний контроль качества
<ul style="list-style-type: none">• Организует и проводит лаборатория	<ul style="list-style-type: none">• Проводит некая организация
<ul style="list-style-type: none">• Проводится ежедневно	<ul style="list-style-type: none">• Проводится периодически
<ul style="list-style-type: none">• Лучше выявляет случайные ошибки	<ul style="list-style-type: none">• Лучше выявляет систематические ошибки

Методы внутрилабораторного контроля качества исследований

Методы, использующие контрольные материалы

1. Метод контрольных карт
2. Метод контрольных правил Westgard
3. Метод “Cusum”

Методы, использующие данные пациентов

1. Метод параллельных проб
2. Метод «средней нормы»
3. Метод дельта-контроля
4. Метод смешивания
5. Метод добавки
6. Сравнение методов

Типы контрольных материалов для гематологических исследований

Наименование	Контроль параметров	Срок годности
Стандартный раствор гемоглобина	Гемоглобин	1 год
Гемолизат	Гемоглобин	1 год
Консервированная кровь	Параметры, указанные в паспорте к контрольному материалу	От 21 дня до 6 мес.
Суспензии (фиксированные клетки)	Эритроциты, тромбоциты, лейкоциты	От 6 мес. До 1 года
Окрашенные мазки крови	Лейкоцитарная формула	Несколько лет

Проведение Внутреннего Контроля Качества включает 3 этапа:

- 1. Оценка сходимости, которая выполняется при введении новых методик и при внесении существенных изменений в аналитическую систему.
- 2. Оценка воспроизводимости и правильности (установочные серии). Построение контрольных карт. Используются только аттестованные КМ.
- 3. Оперативный контроль качества результатов в каждой серии измерений и оценка приемлемости результатов исследований. Используются аттестованные КМ
- Переход на новый КМ проводится путем одновременного исследования используемого и вводимого КМ в течение 20 дней.

При выполнении расчета используют:

- На стадиях 1 и 2 - установленные стандартом предельно допускаемые погрешности для измерений показателей крови, сыворотки и мочи
- На стадии 3 – установленные стандартом контрольные правила. При обнаружении нарушений всю серию считают неприемлемой (бракуют), а проведение исследований приостанавливают для анализа причин ошибок. После выявления и устранения причин ошибок все пробы, проанализированные в отбракованной серии, анализируют повторно

Оценка внутрисерийной воспроизводимости методики

- Проводят **10 измерений** определяемого показателя **в одном и том же материале** (контрольный материал или проба пациента) **в одной и той же аналитической серии**.
- Из полученных 10 результатов рассчитывается коэффициент внутрисерийной вариации методики (CV_{BC}) по формуле:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

Где

S - среднеквадратическое отклонение

\bar{X} - среднее арифметическое значение результатов n измерений

Среднеквадратическое отклонение (S)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

где - \bar{X} среднее арифметическое значение результатов n измерений

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Где $\sum_{i=1}^n x_i$ - сумма результатов измерений

n - число измерений

Пример расчета внутрисерийной воспроизводимости методики

Hb	$X_i - \bar{X}$	$(X_i - \bar{X})^2$
140	0	0
138	-2	4
141	1	1
139	-1	1
142	2	4
140	0	0
138	-2	4
140	0	0
139	-1	1
141	1	1
$\Sigma = 1398$		$\Sigma = 16$

$$\bar{X} = 1398 : 10 = 139,8$$

$$\approx 140$$

$$S = \sqrt{16:9} \approx 1,3$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

$$CV = 1,3 : 140 \times 100 \approx 1,0$$

Оценка внутрисерийной воспроизводимости методики

⊗ Внутрисерийная вариация методики отвечает установленным нормам если выполняется неравенство:

$$CV_{BC} \leq 0,5 \cdot CV_{10}$$

Где CV_{10} - коэффициент общей аналитической вариации для 10 измерений

Оценка смещения и коэффициента общей аналитической вариации методики

В течение 10 дней производят измерение определяемого показателя в двух (нормальном и патологическом) аттестованных контрольных материалах (по 1 измерению каждого в день)

По результатам 10 измерений каждого КМ рассчитывают величину относительного смещения (B_{10}) по формуле:

$$B = \frac{\bar{X} - y3}{y3} \times 100\%$$

где УЗ - установленное значение

и значение общей аналитической вариации (CV_{10})

Оценка смещения и коэффициента общей аналитической вариации методики

- **Сравнивают данные V_{10} и CV_{10} с предельно допустимыми значениями по таблице приложения к приказу №45 и №220**
- **Если значения V_{10} и CV_{10} не превышают табличные данные, производят измерение еще 10 аналитических серий каждого КМ, рассчитывают V_{20} и CV_{20} и сравнивают с табличными данными.**
- ***Если V_{20} и CV_{20} не превышают табличные данные - используемая методика пригодна для целей лабораторной диагностики. Можно строить контрольную карту.***

Пример определения контрольных пределов гемолизата

№	дата	X_i	$\bar{X} - X_i$	$(\bar{X} - X_i)^2$
1	5.01	142	2.3	5.29
2	6.01	141	3.3	10.89
3	7.01	146	-1.7	2.89
4	8.01	144	0.3	0.09
5	9.01	143	1.3	1.69
...				
19	29.01	147	-2.7	7.29
20	30.01	145	-0.7	0.49
21	31.01	146	-1.7	2.89
		$\Sigma=3031$		$\Sigma=250.69$

$$\bar{X} = \frac{3031}{21} = 1443$$

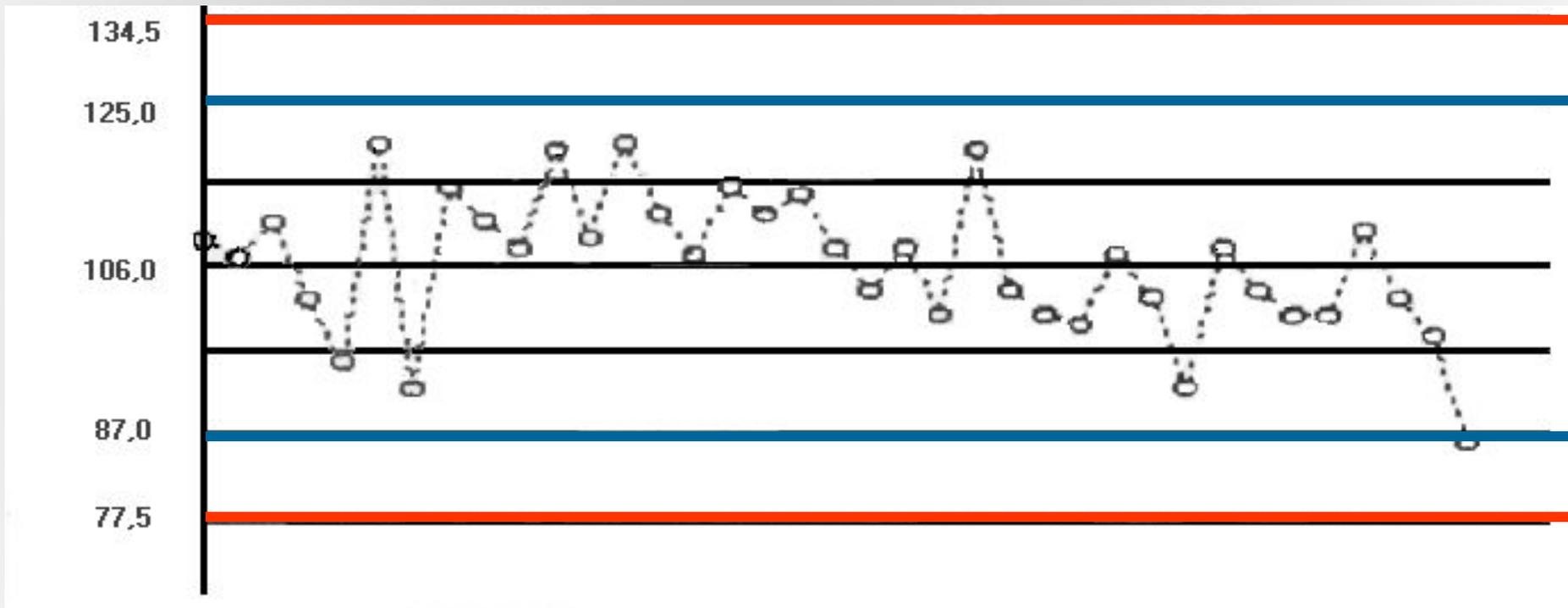
$$S = \pm \sqrt{\frac{25069}{20}} = \pm 3.54$$

$$\bar{X} + 2S = 1443 + 7.08 = 151.35$$

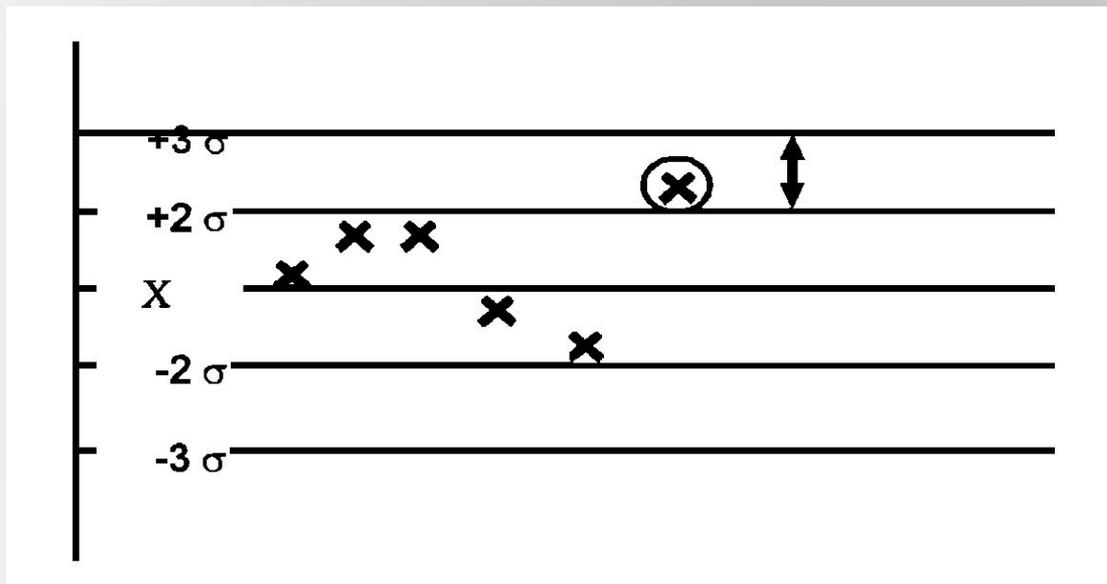
$$\bar{X} - 2S = 1443 - 7.08 = 137.22$$

$$CV = \frac{3.54}{1443} \times 100 = 2.45$$

Пример контрольной карты



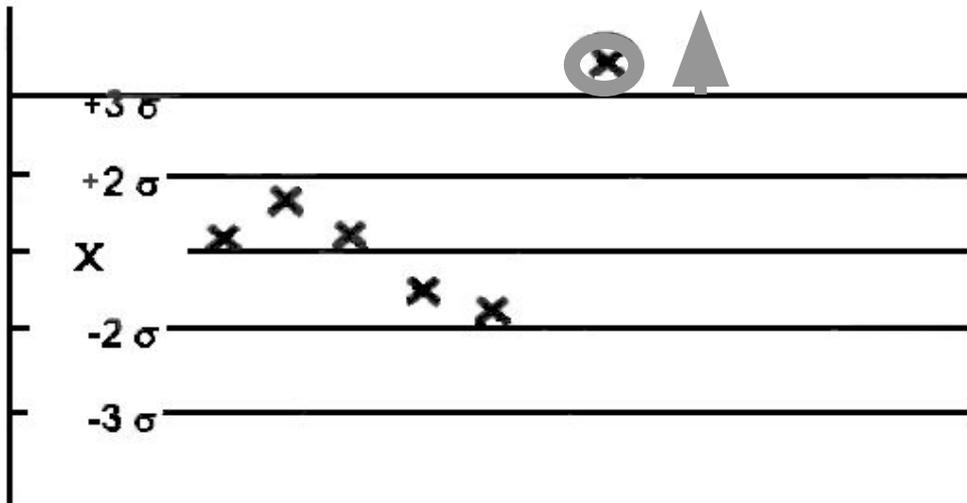
Контрольные правила Westgard



1_{2s}

- Один контрольный результат выходит за пределы □ $X \pm 2S$
- Проверить последовательно наличие других признаков
- При их отсутствии не требуется исключение серии

Контрольные правила Westgard



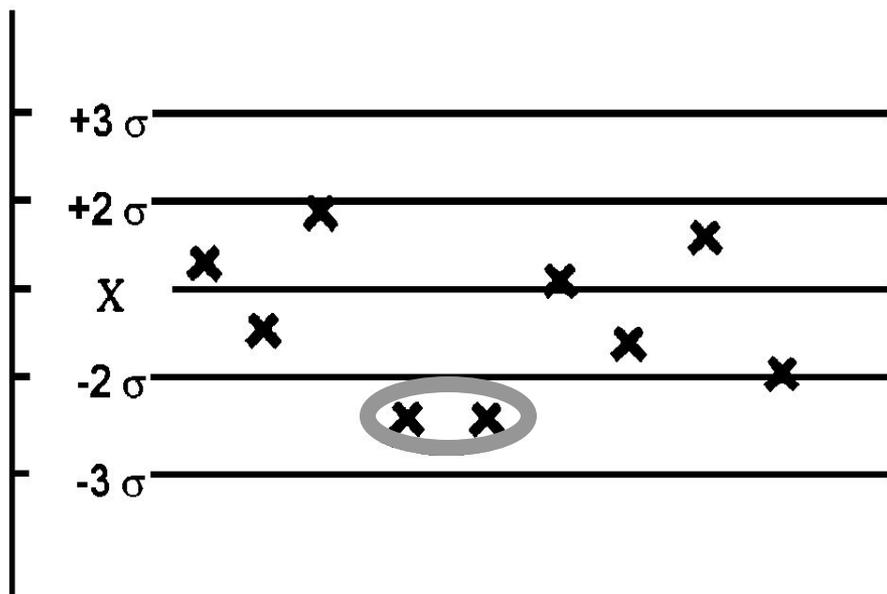
Одно из контрольных измерений выходит за пределы $\square X \pm 3S$

Аналитическая серия признается неудовлетворительной

- ❖ Искать случайную или систематическую ошибку

1_{3S}

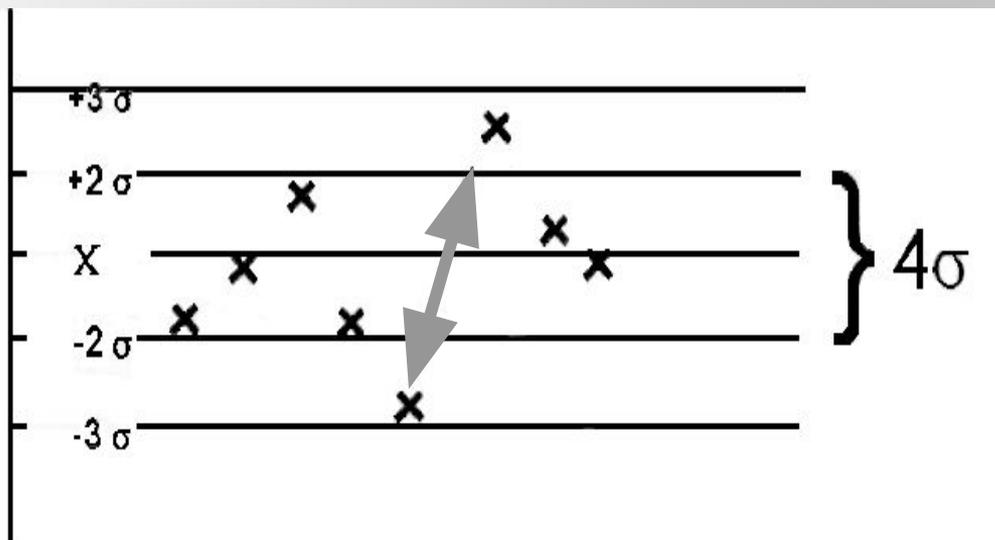
Контрольные правила Westgard



2_{2S}

- ⊗ Два последовательных контрольных измерений превышают предел $\square X+2S$ или лежат ниже предела $\square X-2S$
- ⊗ Аналитическая серия признается неудовлетворительной
- ⊗ Искать систематическую ошибку

Контрольные правила Westgard

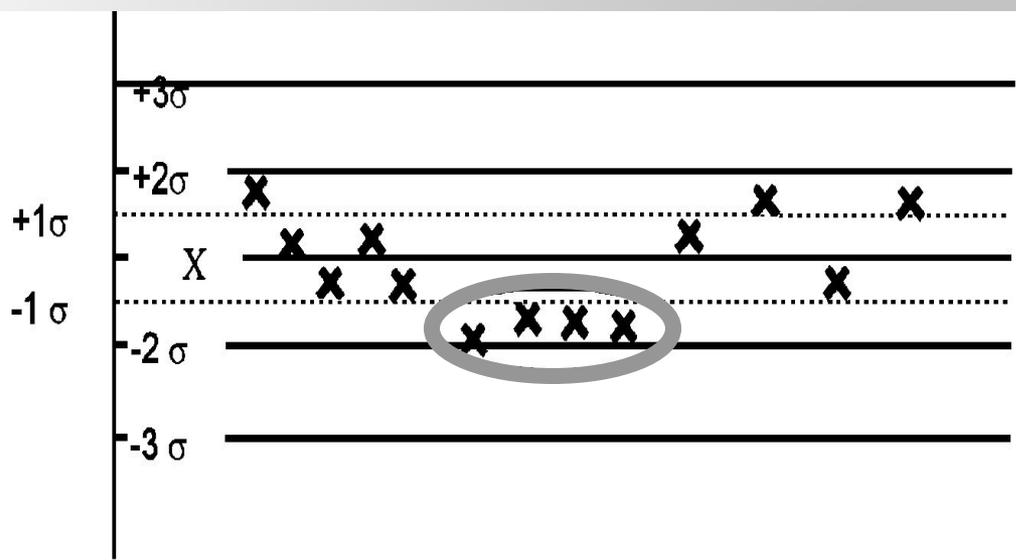


R_{4S}

- ⊗ Два контрольных измерений в рассматриваемой контрольной серии расположены по разные стороны от коридора $X \pm 2S$
- ⊗ Аналитическая серия признается неудовлетворительной
- ⊗ Показатель случайной ошибки

Контрольные правила Westgard

- ☒ Четыре последовательных контрольных измерений превышают предел $X+1S$ или лежат ниже предела $X-1S$



Аналитическая серия признается неудовлетворительной

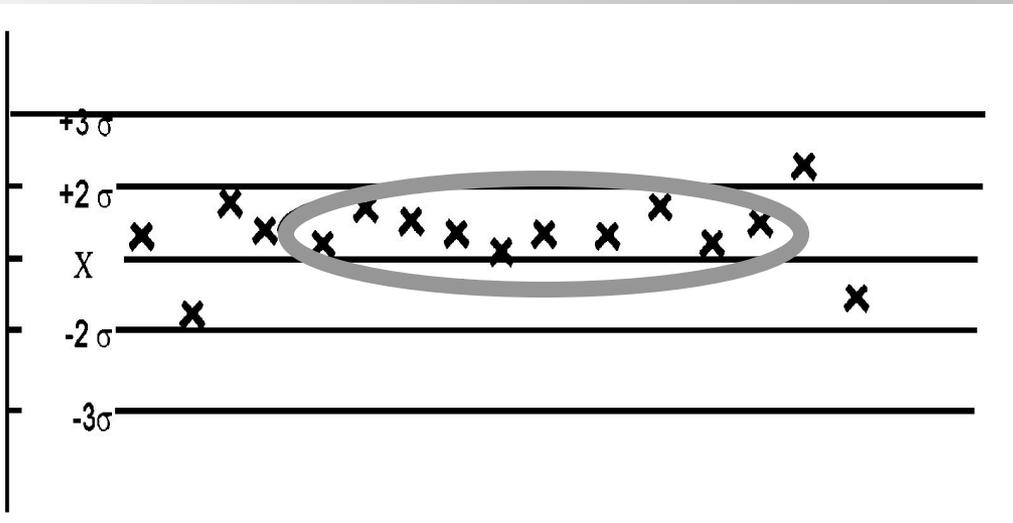
Показатель систематической ошибки

- ☒ Не всегда требует исключение серии, т.к. смещение чаще всего не является клинически значимым

4_{1S}

Контрольные правила Westgard

- Десять последовательных контрольных измерений располагаются по одну сторону от линии, соответствующей \bar{X}

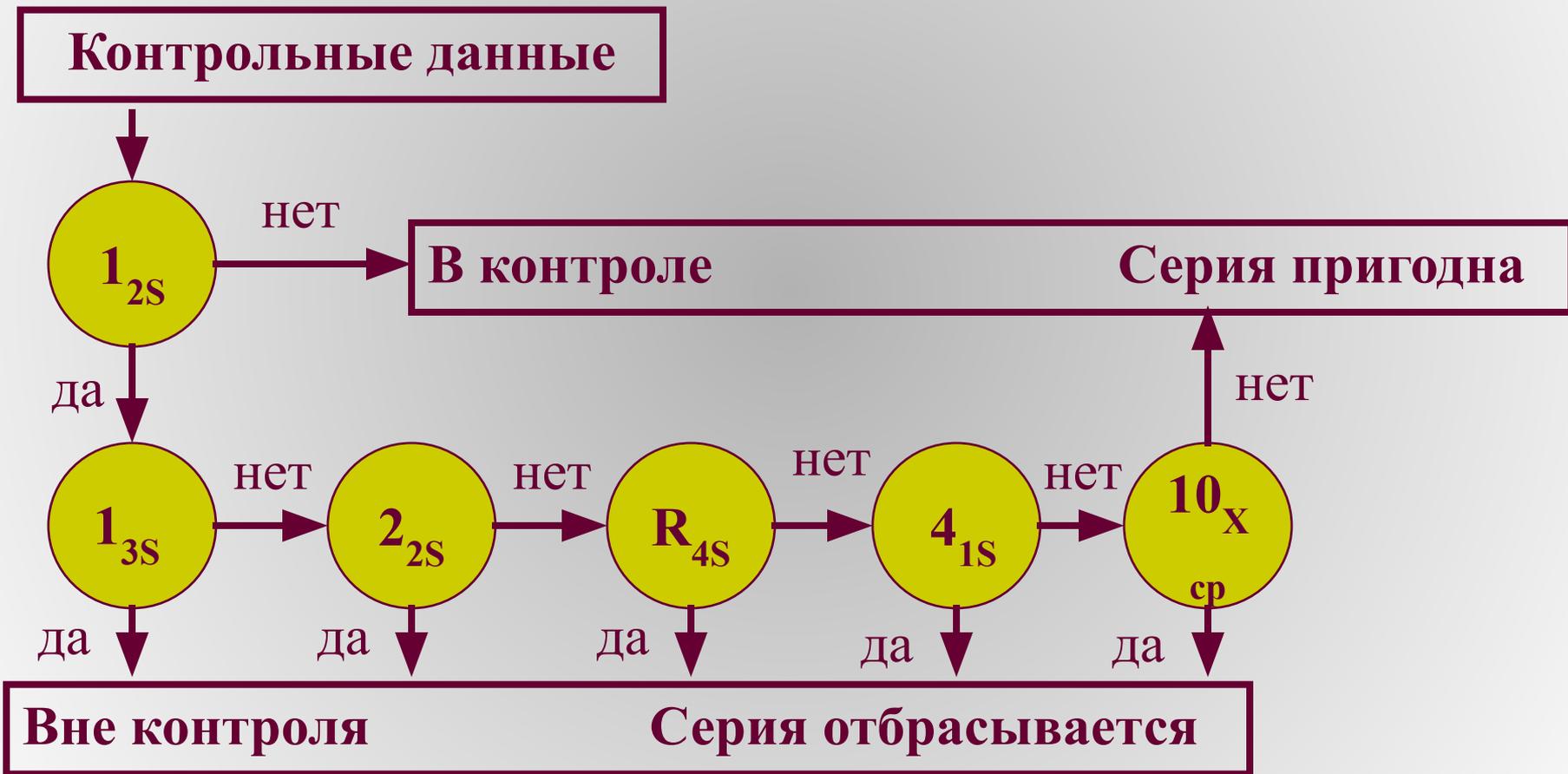


Аналитическая серия признается неудовлетворительной
Показатель систематической ошибки

- Не всегда требует исключение серии, т.к. смещение чаще всего не является клинически значимым

10 \bar{X}

Алгоритм последовательного применения контрольных правил для случая с одним контрольным материалом



Метод контроля воспроизводимости по дубликатам.

□ Отбирают 20 проб и проводят по два параллельных исследований

□ Для каждой пробы рассчитывают величину относительного размаха (R_i) между первым значением показателя (X_1) и вторым (X_2) по формуле

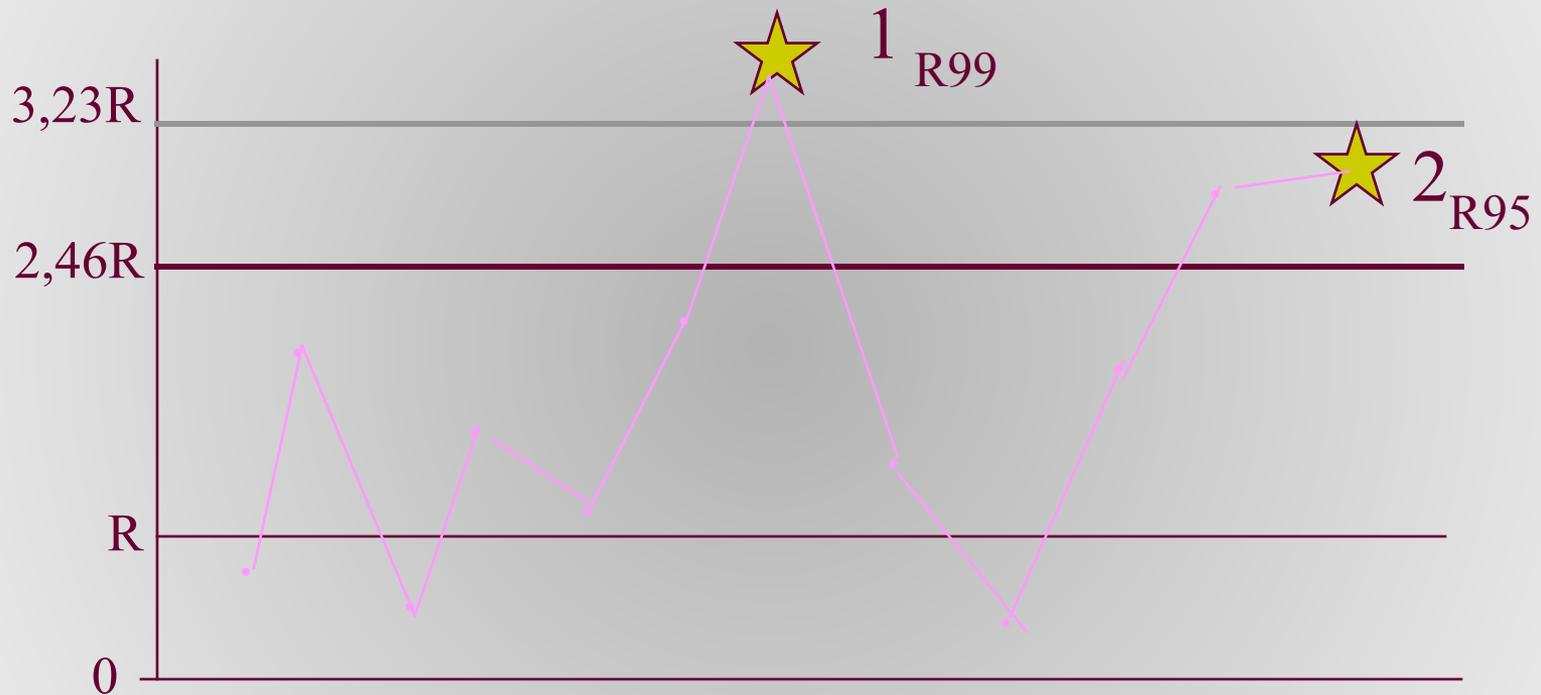
$$R_i = \frac{2 \times |X_1 - X_2|}{X_1 + X_2} \times 100\%$$

□ Из полученных 20 значений ($R_{1,2,\dots,20}$) рассчитывают среднее арифметическое значение □ R .

□ Рассчитывают контрольные пределы:

для 95% границы - □ $R \cdot 2,46$
для 99% границы - □ $R \cdot 3,23$

Контрольная карта по дубликатам



Контроль правильности по ежедневным средним

- Обследуемый контингент должен быть достаточно однородным
- При смене обследуемого контингента значения средних по этим дням не учитываются
- Даже один сильно патологический вариант может существенно изменить среднее значение, поэтому в расчет должны приниматься только значения, укладывающиеся в диапазон усреднения
- Пределы усреднения устанавливаются произвольно (обычно диапазон нормы или 1,2 - 2,0 раза шире его)

Контроль правильности по ежедневным средним

- Диапазон усреднения не должен быть слишком узким (снижается чувствительность метода) и чрезмерно широким (большой разброс средних изо дня в день)
- Минимальное количество усредняемых ежедневно результатов должно быть не менее 15 (оптимально 50 -70)
- Большая часть пациентов должна иметь результаты в области усреднения
- Из-за необходимости обработки больших массивов данных желательно проводить автоматизированный контроль

Контроль правильности осуществляется:

- Если результаты исследований контрольного материала вышли за пределы $\pm 2S$.
 - При налаживании нового метода.
 - При использовании новой измерительной аппаратуры, новой партии реактивов и т.д.
-

Тест Лорда

$$L = \frac{\bar{X} - \mu}{X_{\max} - X_{\min}}$$

Где \bar{X} - средняя арифметическая величина аналитической серии

X_{\max} - максимальный результат аналитической серии

X_{\min} - минимальный результат аналитической серии

μ - паспортные данные КМ

Тест Лорда должен быть меньше или равен 0,23

Оценка эритропоэза

RBC (*red blood cells*)

Ж : 3,5-5,2•10¹²/л

М : 4,0-5,6 •10¹²/л

Возможные ошибки измерения количества эритроцитов

- **Ложнозавышенные** результаты могут наблюдаться при криоглобулинемии; присутствии гигантских тромбоцитов; гиперлейкоцитозе (>100x10⁹/л);
- К ложному **занижению** получаемых результатов приводят агглютинация эритроцитов; выраженный микроцитоз (< 36 фл) эритроцитов.

Нормобласты (NRBC)

Например: Общее количество лейкоцитов при подсчете в анализаторе - 45x10⁹/л.

В лейкоцитарной формуле на 100 лейкоцитов имеется 50 нормобластов.

150 клеток (общее количество лейкоцитов и нормобластов, полученное при подсчете лейкоцитарной формулы)	—	45 x 10 ⁹ /л (количество клеток в 1 мкл, полученное при подсчете в камере или на анализаторе)
100 клеток (лейкоциты)	—	X (истинный лейкоцитоз крови)

$$X = \frac{100 \times 45 \times 10^9 / л}{150} = 30 \times 10^9 / л$$

Оценка эритропоэза

HGB (Hb) - *hemoglobin*

Ж : 120-152 г/л

М : 130-170 г/л

Повышение концентрации гемоглобина наблюдается при реактивных и опухолевых эритроцитозах, обезвоживании.

Снижение концентрации гемоглобина имеет место при анемиях, гипергидратации.

HCT (*hematocrit*) – гематокрит.

Ж : 32-46 %

М : 36-49 %

Возможные ошибки измерения

Ложное повышение

- Гигантские тромбоциты (с объемом более 30 фл);
- Криоглобулинемия
- Высокий лейкоцитоз (более $50 \times 10^9/\text{л}$)
- Высокий лейкоцитоз (более $50 \times 10^9/\text{л}$)
- Гипергликемия ($> 600 \text{ мг/дл}$)
- Диабетический кетоацидоз

Ложное понижение

- Агглютинация эритроцитов
- Выраженный микроцитоз эритроцитов ($< 36 \text{ фл}$)

Оценка эритропоэза

MCV

(mean corpuscular volume)

средний объем
эритроцита

80-100 fl

Возможные ошибки измерения MCV.

Ложное **завышение** MCV может происходить в случае:

- присутствия холодových агглютининов. Агглютинаты эритроцитов воспринимаются прибором как одна большая клетка, если их размер меньше верхнего порога эритроцитарного канала. Сохранение *in vitro* и измерение таких проб при 37°C способствует получению правильных результатов.
- диабетического кетоацидоза вследствие гиперосмолярности плазмы. При разведении *in vitro* изотоническим раствором происходит быстрое набухание эритроцитов. В этом случае измерение гематокрита на гематокритной центрифуге является более точным.

Относительное **снижение** MCV может быть при:

- повышенном содержании фрагментов эритроцитов в крови вследствие механического гемолиза, коагулопатии потребления и др. причин

Оценка эритропоэза

Среднее
содержание
гемоглобина в
эритроците

$$\text{MCH} = \frac{\text{Hb (г/л)}}{\text{RBC (10}^{-12}\text{/л)}}$$

27-31 пг

Средняя
концентрация
гемоглобина в
эритроците

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Hb (г/л)}}{\text{Ht (\%)}}$$

320-370 г/л

Показатель
анизоцитоза
эритроцитов

$$\text{RDW} = \frac{\text{SD}}{\text{MCV}} \times 100$$

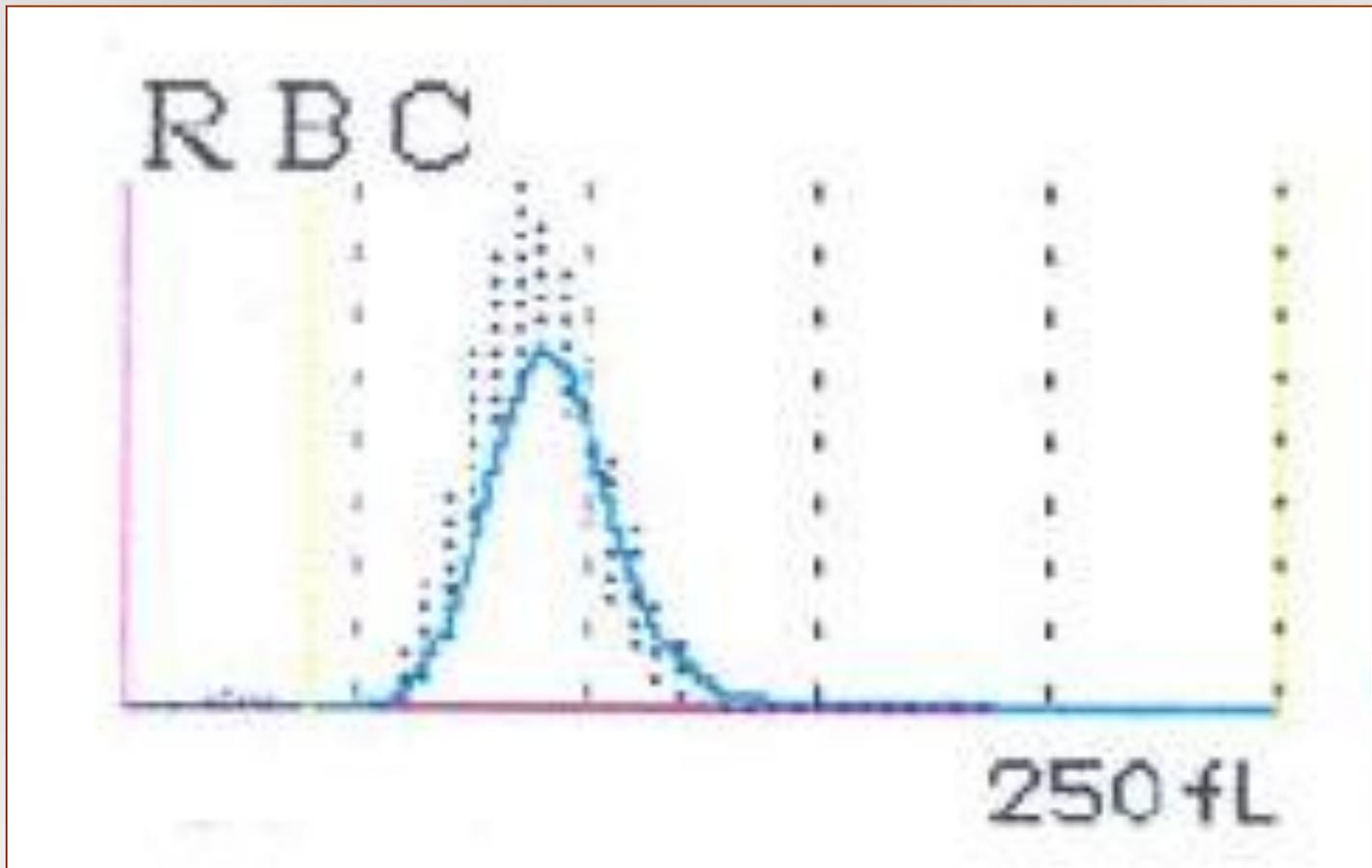
11,5 -14,5 %

Ретикулоциты

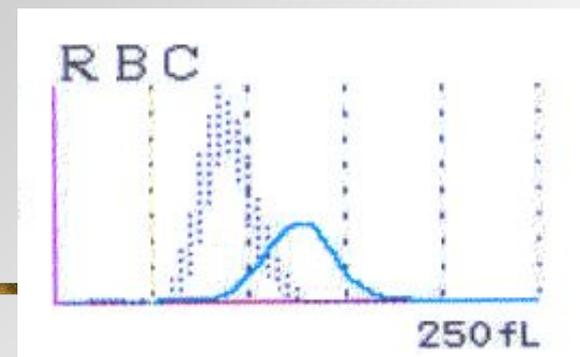
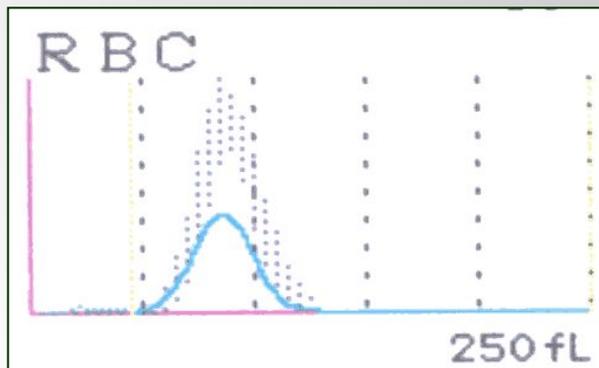
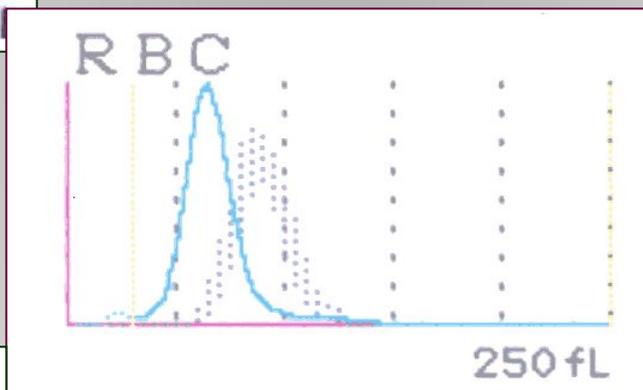
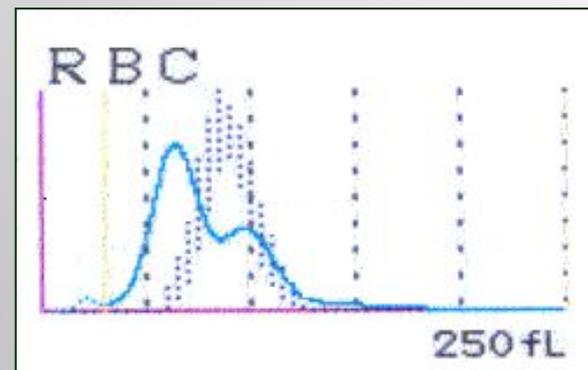
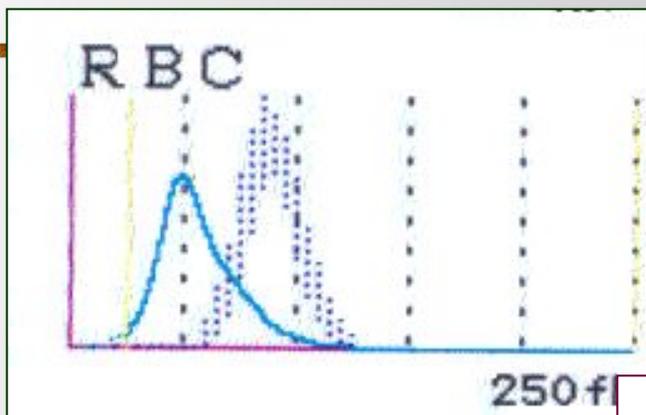
RET

0.5-1.2%

Нормальная RBC-гистограмма



RBC-гистограмма



Снижение Hb

MCV менее 80 fl
MCH менее 26 пг
MCHC менее 320 г/л
RDW норма или увеличен

*Микроцитарные
гипохромные
анемии*

ЖДА

*Нарушение синтеза и
утилизации порфиринов,
Гетерозиг. талассемия и др.*

MCV в пределах нормы
MCH в пределах нормы
MCHC в пределах нормы
RDW обычно в пределах нормы

*Нормоцитарные
Нормохромные
анемии*

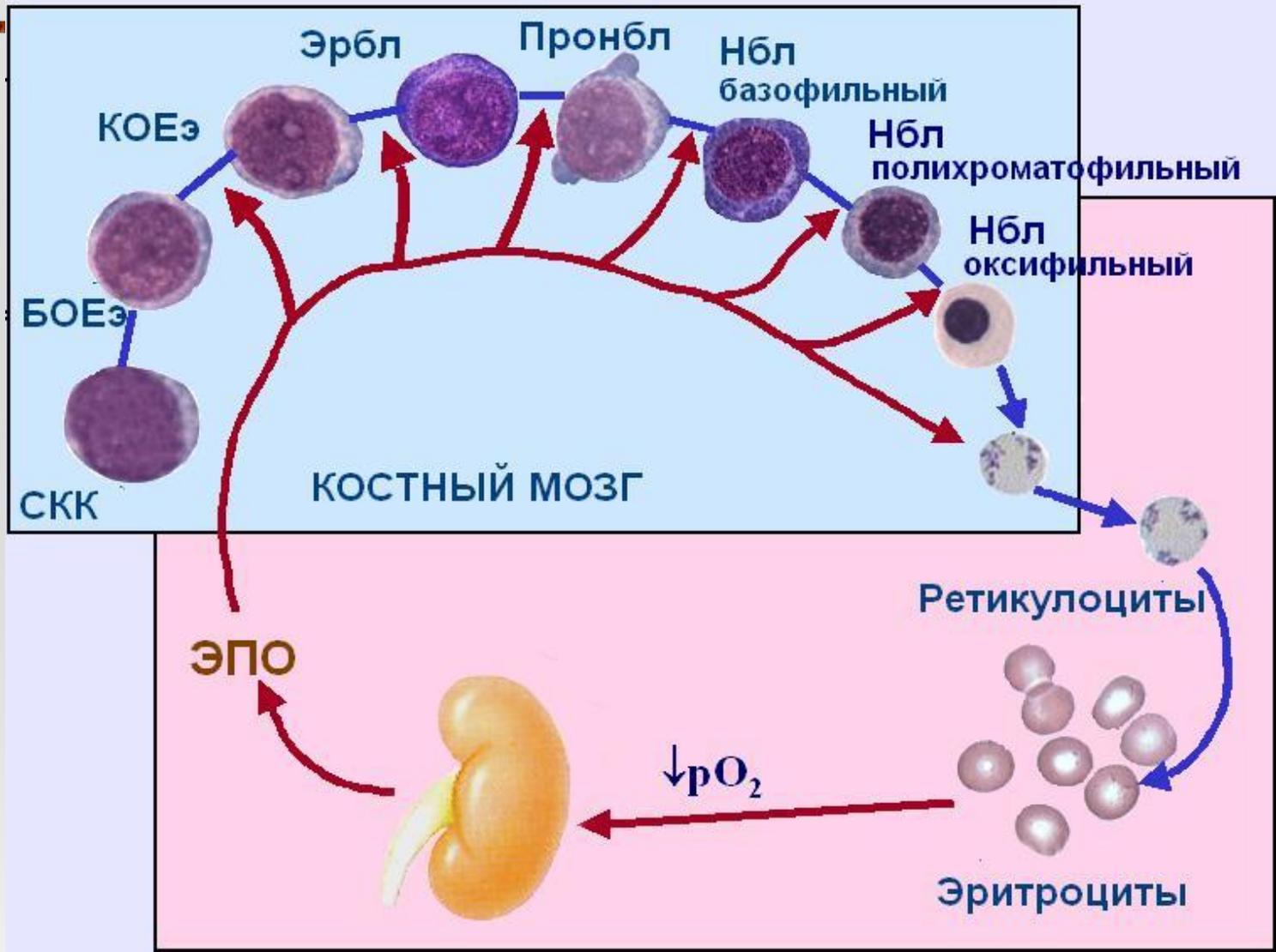
*Анемии при заболеваниях почек
Гипопластические анемии
Острая постгеморрагическая
анемия, АХЗ*

MCV более 100fl
MCH более 32 пг
MCHC в пределах нормы
RDW увеличен

*Макроцитарные
нормо- или
гиперхромные
анемии*

*В12-дефицитная анемии
Фолиеводефицитная анемия
Анемия при хронических
заболеваниях печени, АИГА*

Дифференцировка клеток эритропоэза



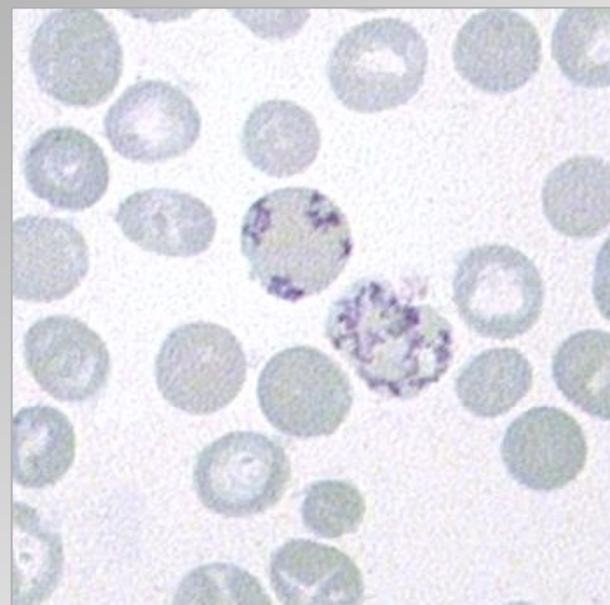
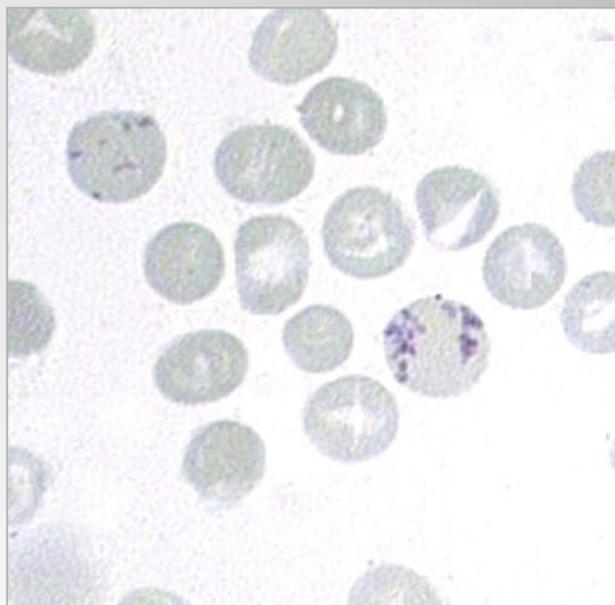
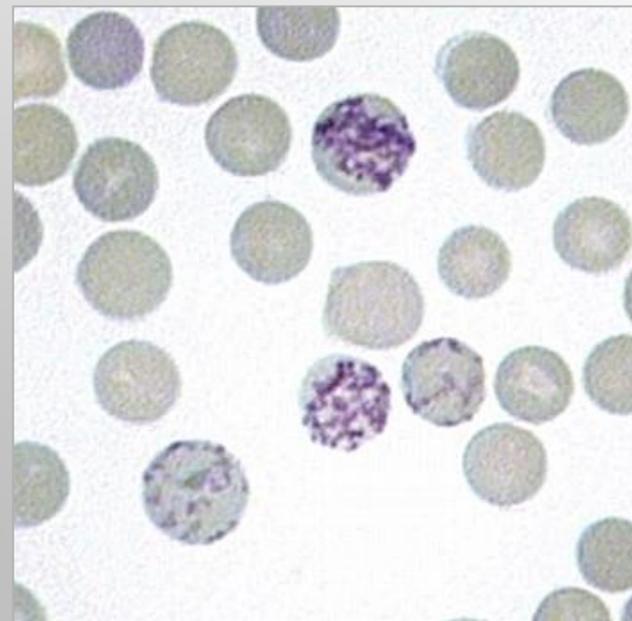
Исследование ретикулоцитов используется для:

- оценки активности эритропоэза при состояниях, сопровождающихся гемолизом или кровопотерей;
- детекции нарушения регенераторной способности костного мозга при дефиците железа, витаминов В₁₂, В₆, фолатов, меди и мониторинга соответствующей терапии;
- оценки состояния эритропоэза на фоне лечения эритропоэтином;
- оценки способности костного мозга к регенерации после цитотоксической терапии и трансплантации костного мозга;
- оценки восстановления синтеза ЭПО после трансплантации почки;
- допингового контроля у спортсменов (прием ЭПО –

Ретикулоциты

(RET)

Норма 0,5-1,2%

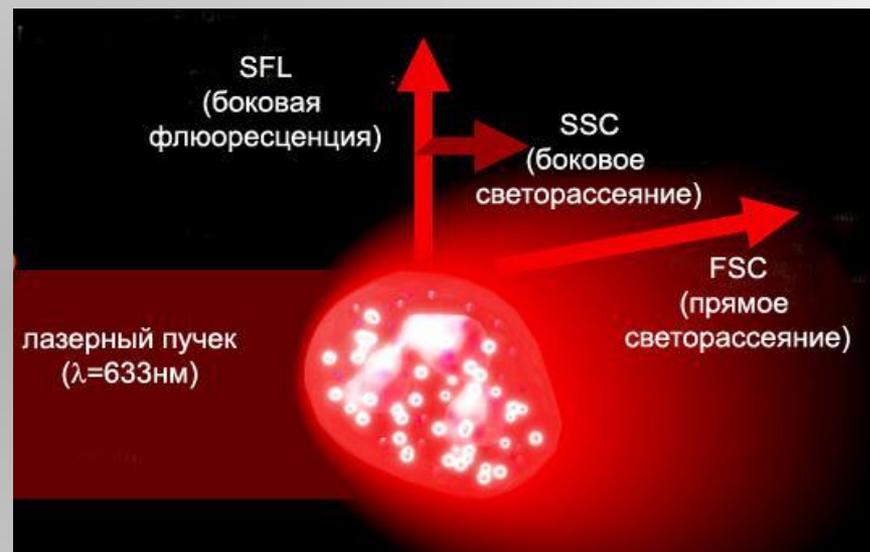


Коэффициент вариации подсчета ретикулоцитов

RET%	9%	1%
Ручной метод (CV%)	27,2	47,3
Гематологический анализатор (CV%)	5,8	6,4

Принципы анализа ретикулоцитов в гематологических анализаторах

- Использование нефлуорохромной краски (новый метиленовый синий) осаждающей РНК в ретикулоцитах -GEN-S (Beckman-Coulter), Cell-Dyn 3500 и 3700 (Abbott Diagnostics)
- Использование флуоресцирующих красителей (тиазол оранжевый, тиофлавин Т, полимитин, цианин CD4K530, акридин оранжевый, оксазин 750 и др.) - Sysmex XE-2100, Sysmex XT-2000i, Bayer Advia 120, Cell-Dyn 4000, ABX Pentra 120 Retic



Показатели ретикулоцитов:

- *классические :*

RET% - относительное количество ретикулоцитов;

RET# - абсолютное количество ретикулоцитов

- *объемные :*

MRV (Mean Reticulocyte Volume) – средний объем ретикулоцитов, (фл);

MSCV (Mean Sphered Cell Volume) – средний объем сферических клеток (*средняя величина объемов сферулированных эритроцитов после воздействия закисленного гипотонического раствора*), фл

показатели ретикулоцитов:

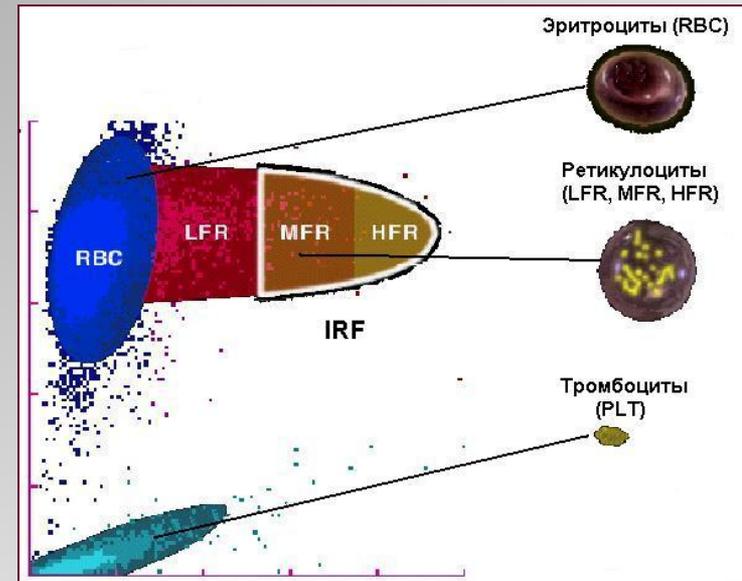
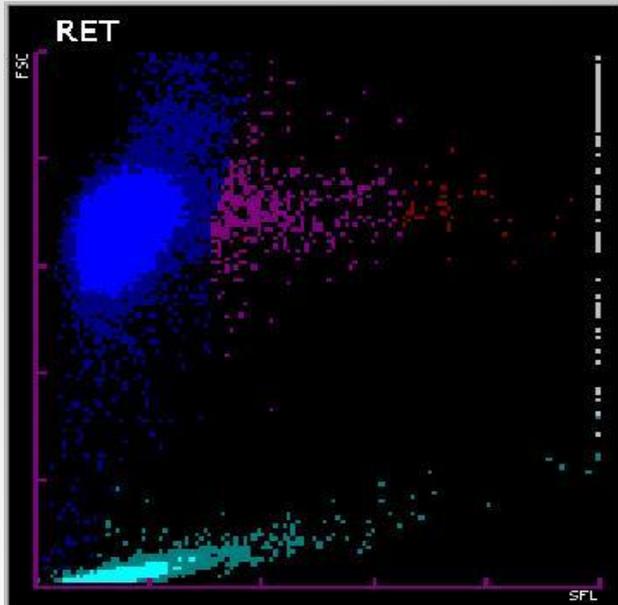
□ характеризующие степень зрелости ретикулоцитов:

LFR% (87-99% зрелых RET),

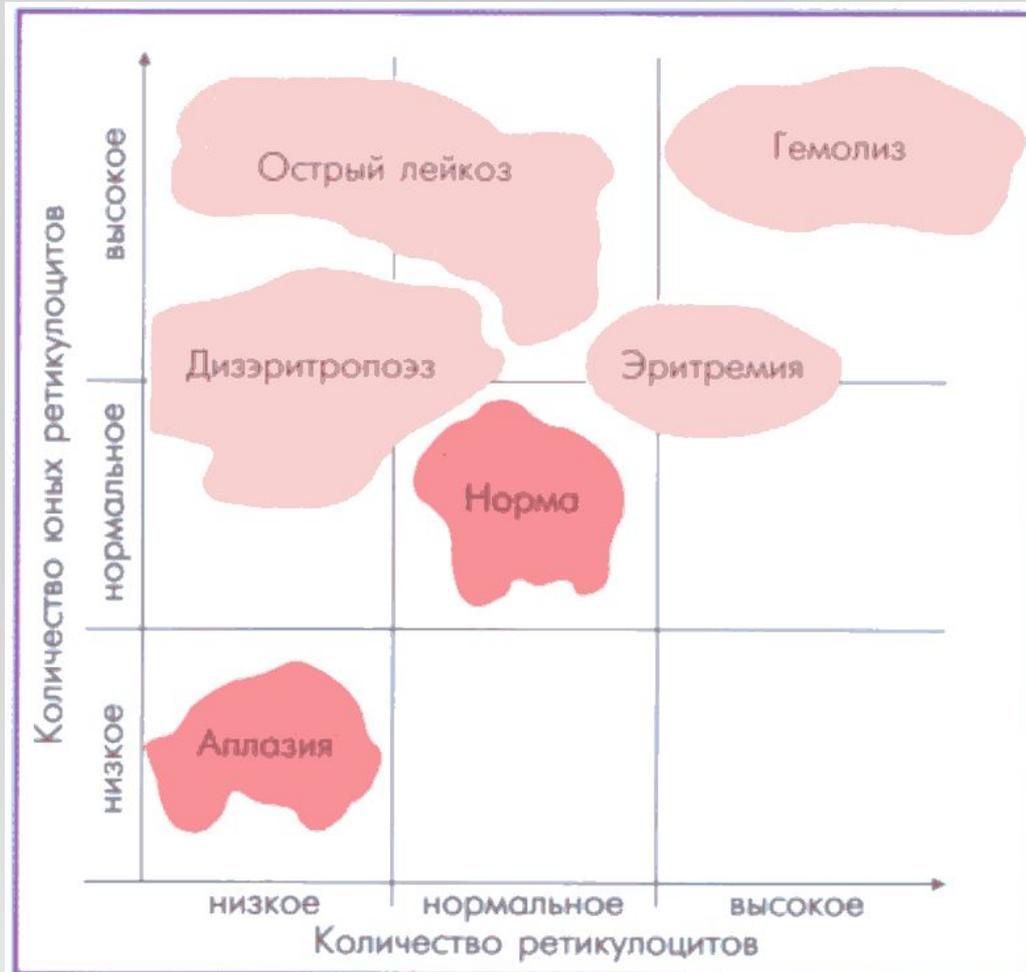
MFR% (2-12%),

HFR% (1-2%);

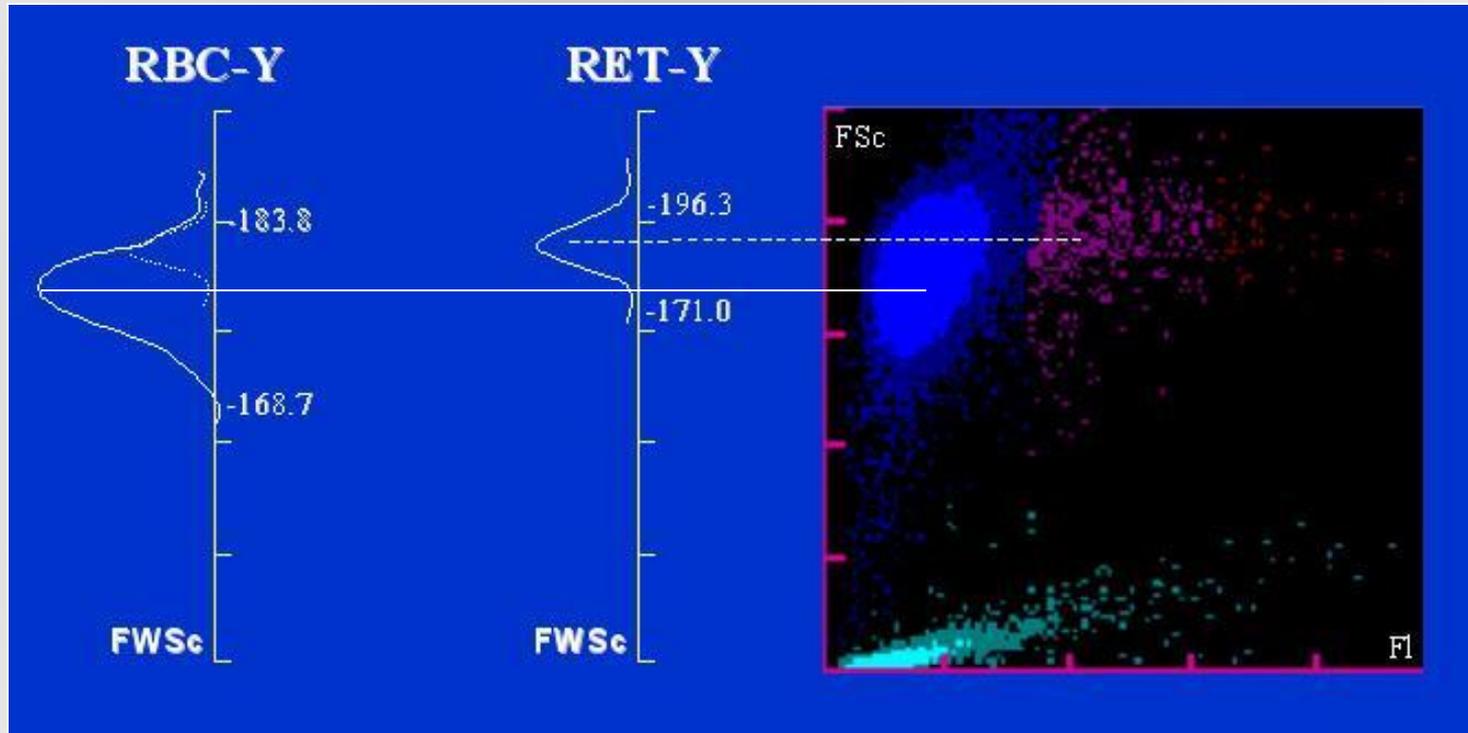
IRF (Immature Reticulocyte Fraction) фракция незрелых ретикулоцитов –
(MFR#+HFR#)/RET#
(2-14%)



Распределение ретикулоцитов по количеству и степени зрелости при некоторых гемалотогических заболеваниях



Показатели, отражающие содержание гемоглобина в ретикулоцитах

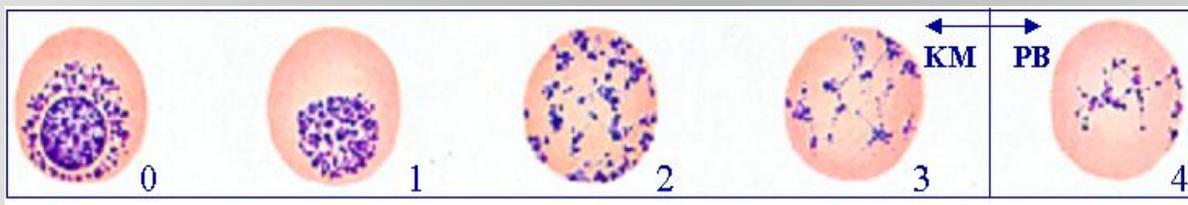


RET-Y (расчетный показатель размера клеток по среднему значению FSC) или CHr (Bayer Technicon H2) (норма *28 -32 пг*)

Скорректированный подсчет ретикулоцитов (*Corrected Reticulocyte Count - CRC*)

$$CRC = RET\% \times Ht/0,45$$

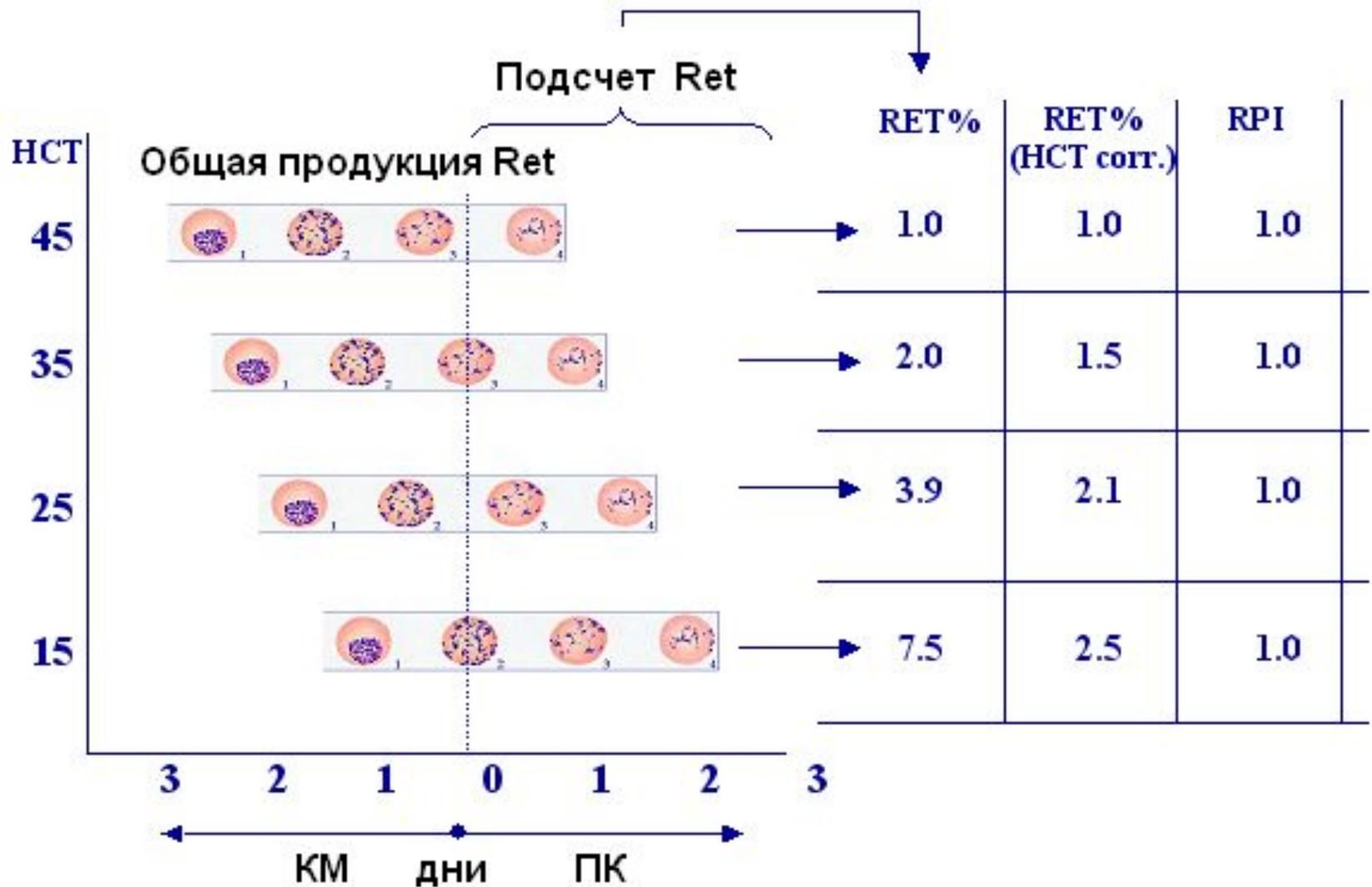
Индекс продукции ретикулоцитов (RPI -Reticulocyte production index)



$$RPI = \frac{RET\% \times HCT}{0,45 \text{ (идеальный HCT)} \times \text{дни циркуляции в крови}}$$

	<u>HCT</u>	<u>дни циркуляции Ret в крови</u>
Эритропоэз эффективен при RPI > 2	45 %	1 day
	35 %	1,5 days Shift
	25 %	2 days
	15 %	2,5 days

Индекс продукции ретикулоцитов



Другие методы гемоглобинометрии

- **Геминхлоридный (кислый гематин) метод Сали (1894)**. Основные причины ошибок:
 - влияние белков плазмы на реакцию между гемоглобином и соляной кислотой,
 - влияние билирубина,
 - влияние освещения,
 - изменение со временем цвета стандартных растворов гематина
 - **Сапониновый метод** Недостатки:
 - не растворяются тельца Гейнца,
 - гемолизат остается мутным, может изменяться спектр раствора,
 - неустойчивость стандартов при хранении
-

Классы гематологических анализаторов

I класс - полуавтоматические и автоматические счетчики клеток крови, позволяющие определять до 8-10 параметров, без дифференцировки лейкоцитов.

II класс - автоматические гематологические анализаторы, проводящие анализ цельной крови и позволяющие определять до 20 параметров, включая частичную дифференцировку лейкоцитов на три популяции — *лимфоциты, средние клетки и гранулоциты.*

III класс - высокотехнологичные гематологические анализаторы, позволяющие проводить развернутый анализ крови, включая полную дифференцировку лейкоцитов по 5-ти параметрам (*нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты*), скетограммы.