Современные аспекты клинического анализа крови. Концепция Hemato-Flow как новый уровень развития клеточного анализа и возможность оптимизации лабораторного процесса в гематологии

Трост Андрей Маркович
Специалист по продукции компании
ООО «Медикал Групп»

Общий анализ крови

Offline

Menu

Patient Results

Specimen ID	Tube Pos.	Patient Name	Patient ID	Age	Gender	Diagnosis	Location
SS-89338190839	-----				Unknown		

CDR

Filter: Custom

CBC FINAL RELEASED

05/25/2007 04:24:31 PM			CDR1	
Test	Result	Flags	Previous	Days
UWBC	6.8			
WBC	6.8			
RBC	4.66			
HGB	14.3			
HCT	40.8			
MCV	87.5			
MCH	30.7			
MCHC	35.1			
RDW	14.0			
RDW-SD	41.6			
PLT	286			
MPV	7.8			

DIFF FINAL RELEASED

05/25/2007 04:24:31 PM			CDR1	
Test	Result	Flags	Previous	Days
NE%	64.4			
LY%	23.9			
MO%	6.8			
EO%	4.0			
BA%	0.9			
NRBC%	0.8			
NE#	4.4			
LY#	1.6			
MO#	0.5			
EO#	0.3			
BA#	0.1			
NRBC#	0.1			

RETIC FINAL RELEASED

05/25/2007 04:24:31 PM			CDR1	
Test	Result	Flags	Previous	Days
RET%	1.18			
RET#	0.0551			
MRV	107.3			
IRF	0.35			

Susp/Sys/Def Msgs

Suggested Actions

none

WBC

35 100 200 300 400 fL

RBC

36 100 200 300 fL

Plt

2 10 20 30 fL

5PD1 NRBC1 RETIC1

V

RLSn

View All VCSn Graphics

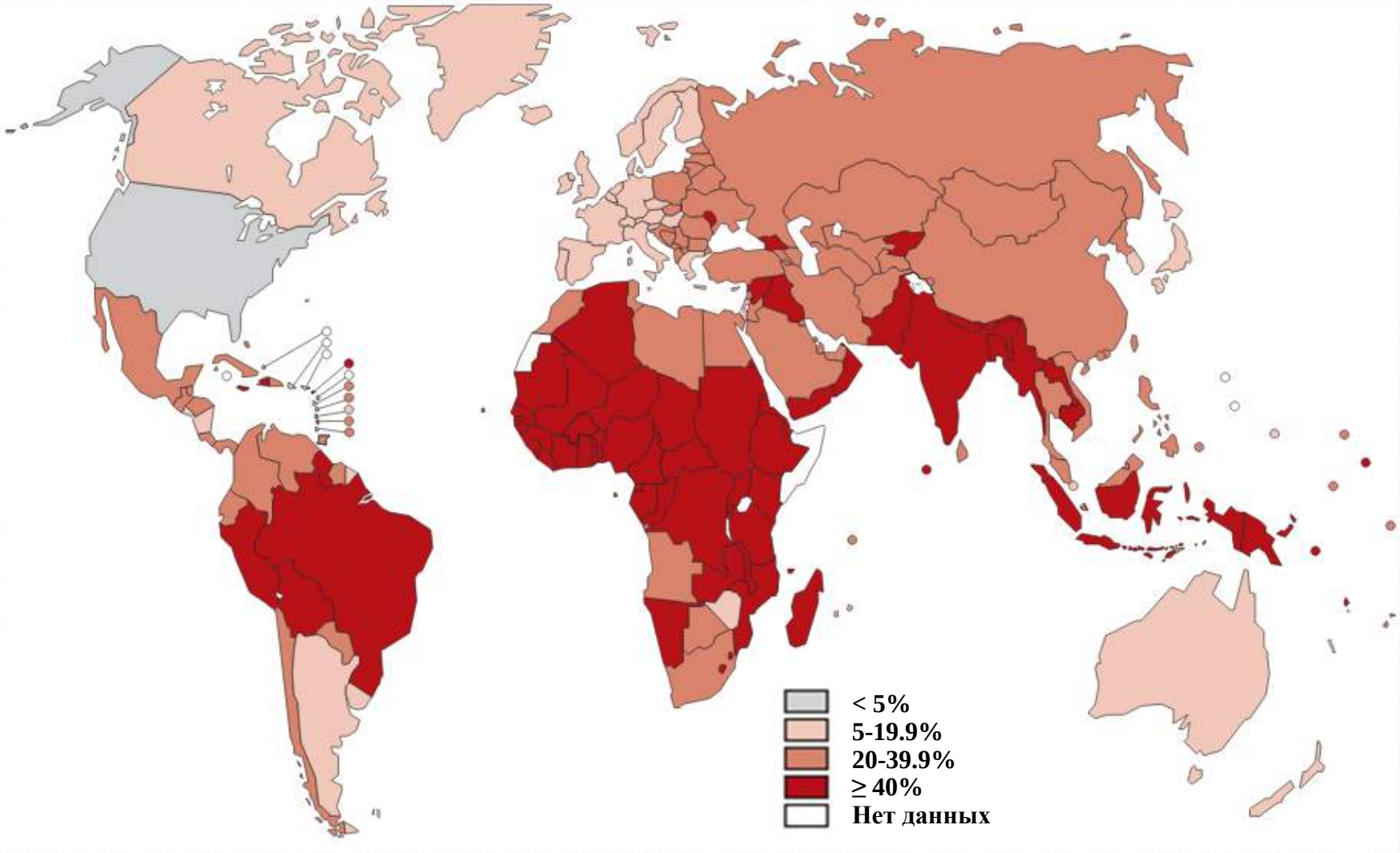
Rules Triggered

INF/DAT Filename: G:\2007-05-25T16-24-31_89338190839_128.inf

View Log | Additional Data | Comment | Show Delta | Transmit | More

Last Event: Maximum number of Partial Voteout reached. DevOp 06/26/2007 02:17:30 PM

Распространенность анемии



Критерии диагностики анемии

- **Мужчины**: Hb < 130 г/л; HCT < 39%; RBC < $4{,}0 \times 10^{12}$ кл/л

- **Женщины**: Hb < 120 г/л; HCT < 36%; RBC < $3{,}8 \times 10^{12}$ кл/л

- Беременные женщины (во II триместре (гемодилюция)): Hb < 105 г/л; HCT < 33%;
- Дети до 5 лет: Hb < 110 г/л;
- Дети от 5 до 11 лет: Hb < 115 г/л;

NHANES:

- **Женщины**: Hb < 117 г/л;
- **Мужчины**: Hb < 132 г/л;

Классификация анемий

Анемии

По ведущему патогенетическому механизму возникновения анемии:

1. Анемии вследствие кровопотери.
2. Анемии вследствие нарушения кровообразования.
3. Анемии вследствие повышенного кроверазрушения или гемолиза.

По морфологии эритроцитов:

1. Микроцитарные, гипохромные.
2. Нормоцитарные нормохромные.
3. Макроцитарные, гиперхромные.
4. Сфероцитарные.

По типу эритропоэза:

1. Нормобластические.
2. Мегалобластические.

По степени тяжести:

1. Легкие (Hb 100-120 г/л (Ж), 100-130 г/л (М)).
2. Умеренные (Hb 80-99 г/л) .
3. Тяжелые (Hb 65-79 г/л) .
4. Жизнеугрожающие (Hb < 65 г/л).

По регенераторной активности костного мозга:

1. Арегенераторные (отсутствие ретикулоцитов)
2. Гипорегенераторные (ретикулоцитов < 0,5%)
3. Регенераторные (ретикулоцитов 0,5-2%)
4. Гиперрегенераторные (ретикулоцитов > 2%)

Морфологическая классификация анемий

Параметр			Норма
MCV	средний объем эритроцитов		80-100 фл
MCH	среднее содержание гемоглобина в эритроците	$\text{MCH} = \frac{\text{Гемоглобин } (\frac{г}{л})}{\text{Кол—во эритроцитов } (x10^{12} \frac{кл}{л})}$ [пг]	27-31 пг
MCHC	средняя концентрация гемоглобина в эритроците	$\text{MCHC} = \frac{\text{Гемоглобин } (\frac{г}{дл})}{\text{Гематокрит}(\%)} x100$ [г/дл]	300-380 г/л
RDW	показатель анизоцитоза эритроцитов	$RDW = \frac{SD\ (\text{фл})}{MCV(\text{фл})}$ [%]	11,5-14,5 %

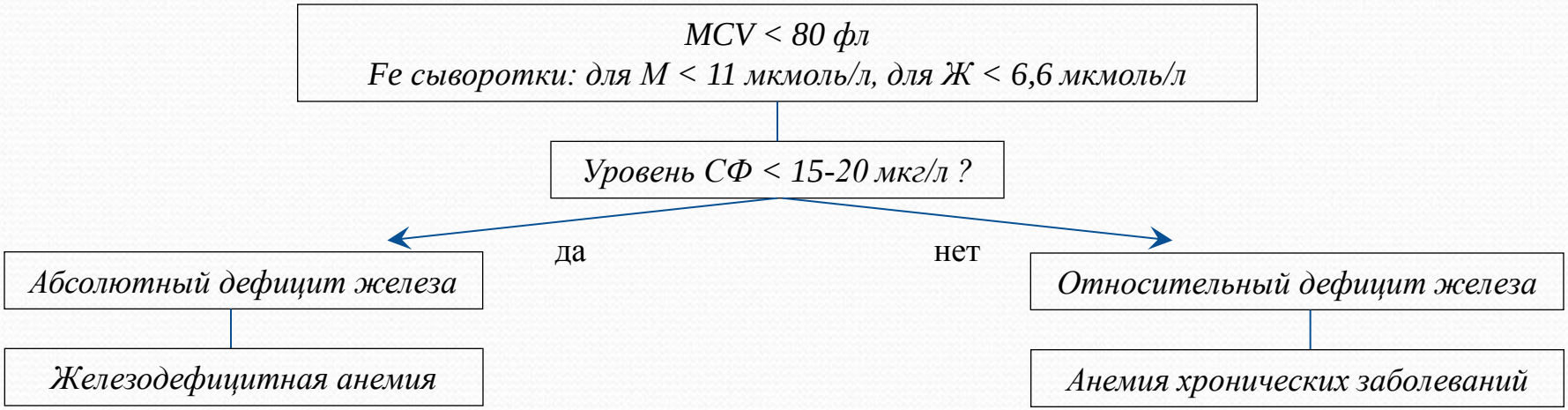
Параметр	MCV	MCH
Микроцитарные, гипохромные анемии	< 80 фл	< 27 пг
Нормоцитарные, нормохромные анемии	80-100 фл	27-31 пг
Макроцитарные, гиперхромные анемии	> 100 фл	> 31 пг

Микроцитарные анемии

Микроцитарные анемии – анемии, сопровождающиеся уменьшением размеров эритроцитов (MCV < 80 фл) в связи с уменьшением содержания в них гемоглобина. С учетом структуры Hb выделяют несколько причин нарушения его синтеза и, соответственно, видов микроцитарных анемий:

1) дефицит железа:
   - абсолютный (железодефицитная анемия);
   - относительный (анемия хронических заболеваний);
2) дефицит синтеза порфирина:
   - наследственный (наследственная сидеробластная анемия);
   - приобретенный (отравление свинцом);
3) дефект синтеза белковых цепей глобина:
   - малая β- и α-талассемии;

Для дифференциальной диагностики проводится измерения уровня сывороточного ферритина:



Макроцитарные анемии

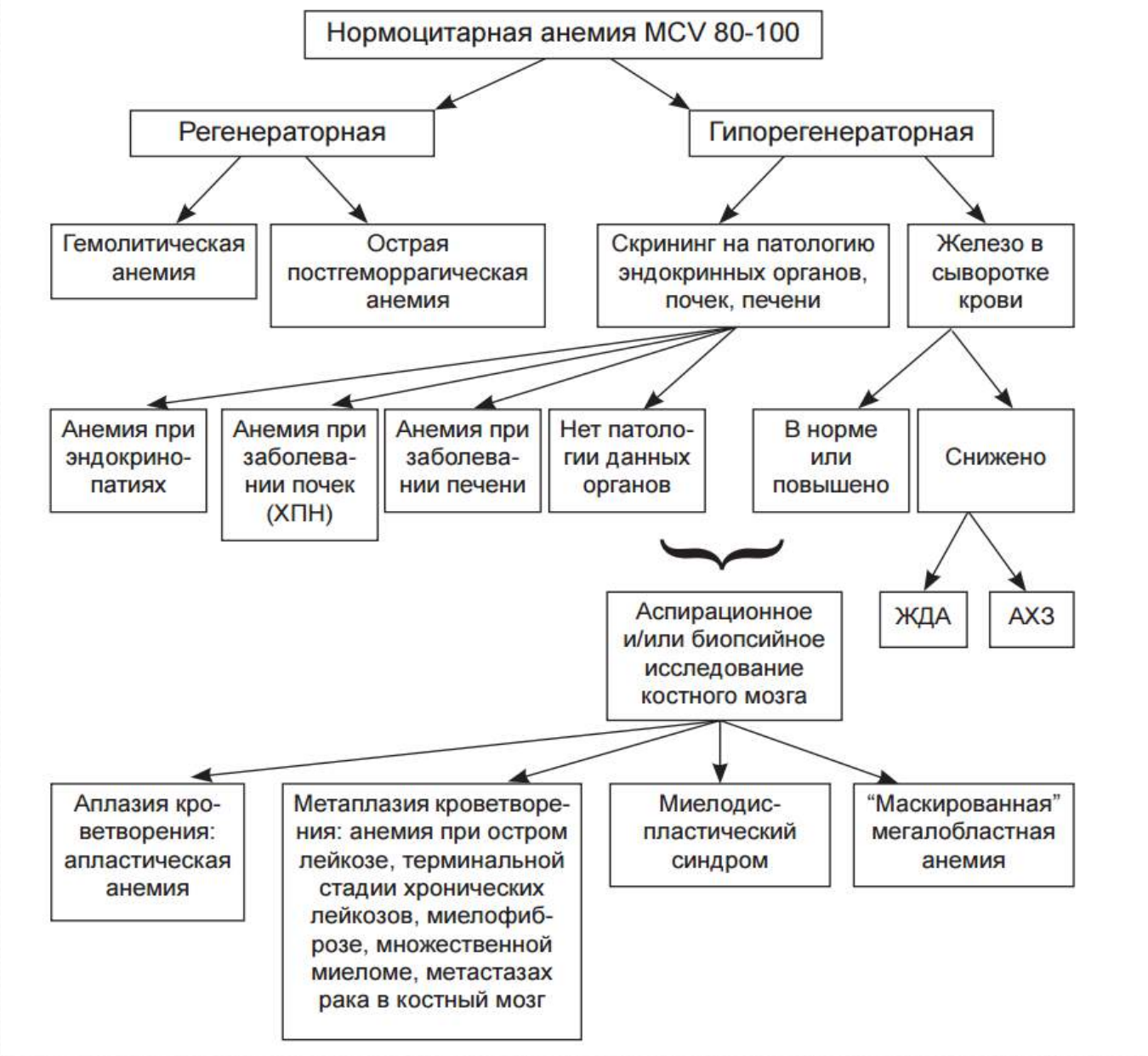
Макроцитарные анемии – анемии, сопровождающиеся увеличением размеров эритроцитов (MCV > 100 фл). Основными причинами являются:

1) мегалобластный эритропоэз;
2) избыточное количество ретикулоцитов (при гемолизе и острой кровопотери);
3) дисплазия кроветворения (миелодиспластический синдром);
4) метаболические нарушения, в том числе связанные и с накоплением Hb в эритроцитах;

Для дифференциальной диагностики проводятся следующие тесты:

- определение количества ретикулоцитов (для выявления острой постгеморрагической или гемолитической анемий, имеющих нормобластный эритропоэз);
- определение концентрации B_{12} и фолиевой кислоты в сыворотке крови (для выявления B_{12} и фолиеводефицитной анемий);
- пункция костного мозга (для поиска признаков дисплазии кроветворения и повышенного числа бластных клеток, указывающих на наличие миелодиспластического синдрома);
- при постановке диагноза МДС необходимо цитогенетическое исследование с целью выявления клональных хромосомных аномалий;

Нормоцитарные анемии

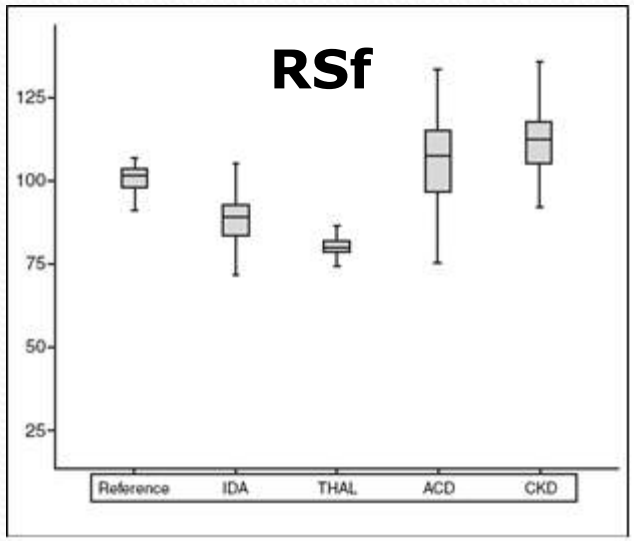


Фактор размера эритроцитов (RSF)

$$RSF = \sqrt{MCV \times MRV}$$

Норма:
RSF 90.5 - 108.2 fL (DxH800)

***RSF** является аналогом показателя CHr (содержание гемоглобина в ретикулоците)*



У пациентов с анемиями, вызванными проблемами в эритропоэзе (ЖДА и талласемия) наблюдалось снижение RSF , а у пациентов с анемией хронических заболеваний и заболеваний почек RSF был повышен [1]

Таким образом, RSF позволяет:

1)точно разделить причины возникновения анемии (ЖДА или АХЗ)

2)определить эритропоэтическую активность костного мозга

3)провести раннюю диагностику функционального железодефицита

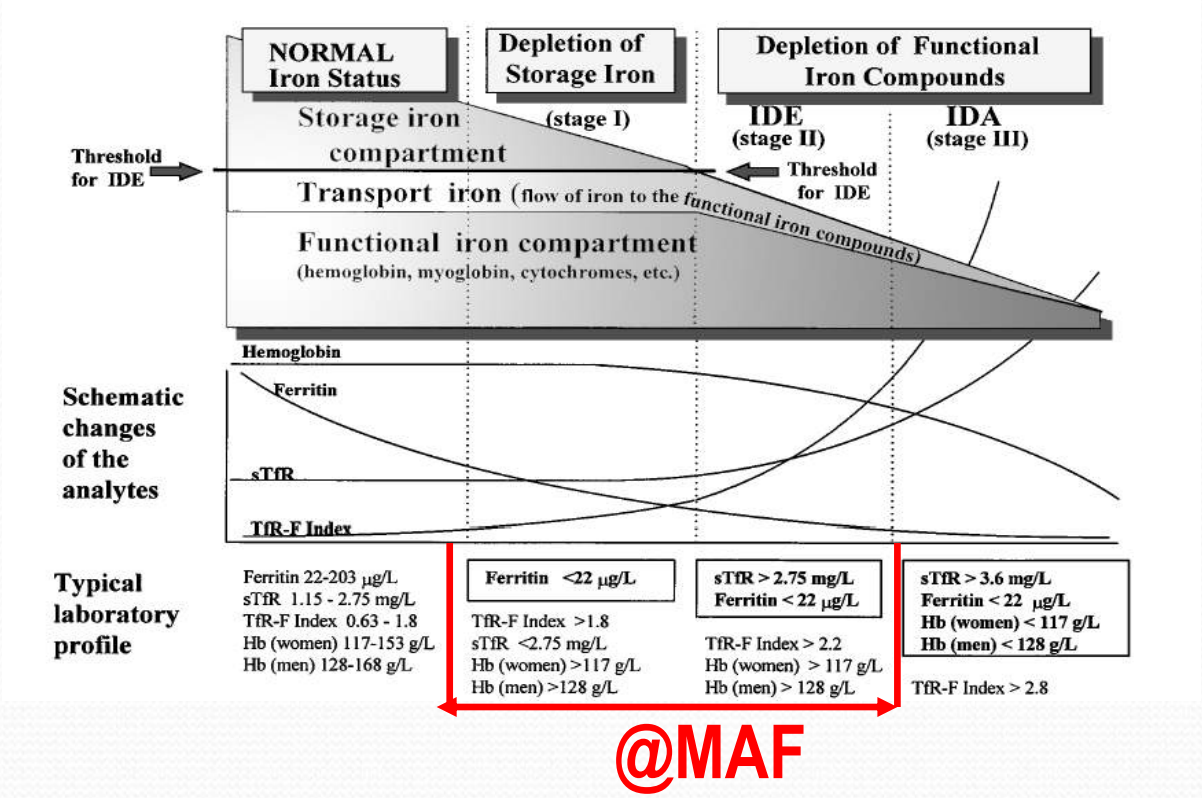
Фактор микроцитарной анемии (MAF)

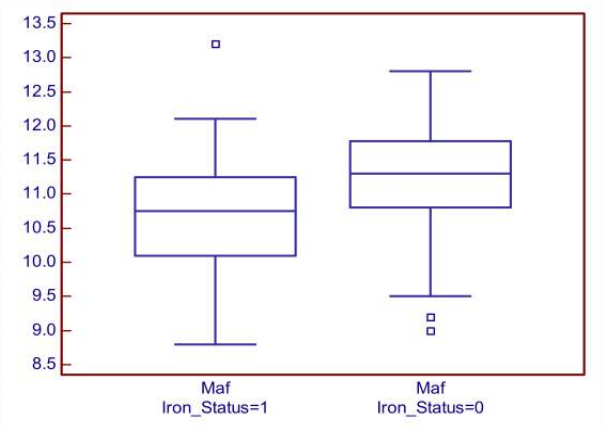
MAF = (Hb x MCV)/100

Норма

MAF 10.3 - 15.3 (DxH800)

Латентный дефицит железа – нормальный Hb, низкий ферритин





Латентный дефицит железа

норма

Низкий MAF – необходимо провести тестирование уровня сывороточного ферритина

Гемоглобин низкой плотности (LHD)

$$LHD\% = 100\sqrt{1 - [1/(1 + e^{1.8(30-MCHC)})]}$$

Гемоглобин низкой плотности применяется при диагностике микроцитарных анемий и для мониторинга терапии эритропоэтином.

LHD > 5,5% (DxH 800) соответствует уровню гипохромных эритроцитов >10 %, что является индикатором железодефицитного состояния

Средний объем сфероцитарных клеток (MSCV)

Тромбоцитарное звено

Offline

Menu

Patient Results

Specimen ID	Tube Pos.	Patient Name	Patient ID	Age	Gender	Diagnosis	Location
SS-89338190839	-----				Unknown		

CDR

Filter: Custom

CBC FINAL RELEASED

05/25/2007 04:24:31 PM			CDR1	
Test	Result	Flags	Previous	Days
UWBC	6.8			
WBC	6.8			
RBC	4.66			
HGB	14.3			
HCT	40.8			
MCV	87.5			
MCH	30.7			
MCHC	35.1			
RDW	14.0			
RDW-SD	41.6			
PLT	286			
MPV	7.8			

DIFF FINAL RELEASED

05/25/2007 04:24:31 PM			CDR1	
Test	Result	Flags	Previous	Days
NE%	64.4			
LY%	23.9			
MO%	6.8			
EO%	4.0			
BA%	0.9			
NRBC%	0.8			
NE#	4.4			
LY#	1.6			
MO#	0.5			
EO#	0.3			
BA#	0.1			
NRBC#	0.1			

RETIC FINAL RELEASED

05/25/2007 04:24:31 PM			CDR1	
Test	Result	Flags	Previous	Days
RET%	1.18			
RET#	0.0551			
MRV	107.3			
IRF	0.35			

Susp/Sys/Def Msgs

Suggested Actions

none

WBC

35 100 200 300 400 fL

RBC

36 100 200 300 fL

Plt

2 10 20 30 fL

5PD1 NRBC1 RETIC1

V

RLSn

View All VCSn Graphics

Rules Triggered

INF/DAT Filename: G:\2007-05-25T16-24-31_89338190839_128.inf

View Log | Additional Data | Comment | Show Delta | Transmit | More

Last Event: Maximum number of Partial Voteout reached. DevOp 06/26/2007 02:17:30 PM

Тромбоцитоз и тромбоцитопения

Вид тромбоцитоза	В каких случаях встречается
Первичный	• Истинная полицитемия; • Идиопатический тромбоцитоз; • Метастазы злокачественных опухолей в костный мозг; • Некоторые виды хронического лейкоза. Как правило, критерием диагностики этих заболеваний является повышение тромбоцитов и лейкоцитов.
Вторичный	• Ревматоидный артрит и ревматическая лихорадка; • Аутоиммунные заболевания соединительной ткани; • Тяжелые артриты и полиартриты; • Инфицирование паразитарными возбудителями; • Тяжелые бактериальные и вирусные инфекционно-воспалительные процессы любой локализации (пневмония, менингит, гепатит, энцефалит, энтероколит и др.); • Гнойно-септические состояния и причины (фурункулез, флегмоны, абсцессы, различные виды сепсиса); • Гемолитическая и железодефицитная анемия. В таком случае регистрируются высокие тромбоциты и низкий гемоглобин; • Злокачественные опухоли любой локализации и их метастазы; • Кровопотеря на фоне кровотечений, травм и оперативных вмешательств; • Туберкулез и амилоидоз внутренних органов; • Отсутствие селезенки; • Прием глюкокортикоидных и препаратов половых гормонов.
Относительный	Обезвоживание организма на фоне: • Интоксикаций; • Рвоты; • Поноса; • Недостаточного употребления жидкости; • Повышенных потерь жидкости.

Стадии тромбоцитопении:

1ст. – 75-150*10^9/л

1ст. – 50-75*10^9/л

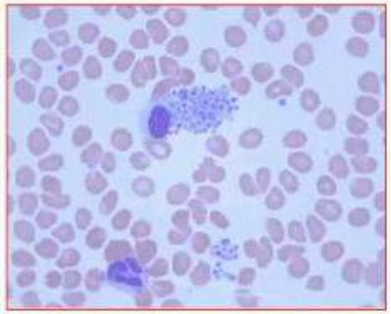
1ст. – 25-50*10^9/л

1ст. – <25*10^9/л

PLT<20*10^9/л – показания к трансфузии тромбоцитарного концентрата

ЭДТА-индуцированная ложная тромбоцитопения

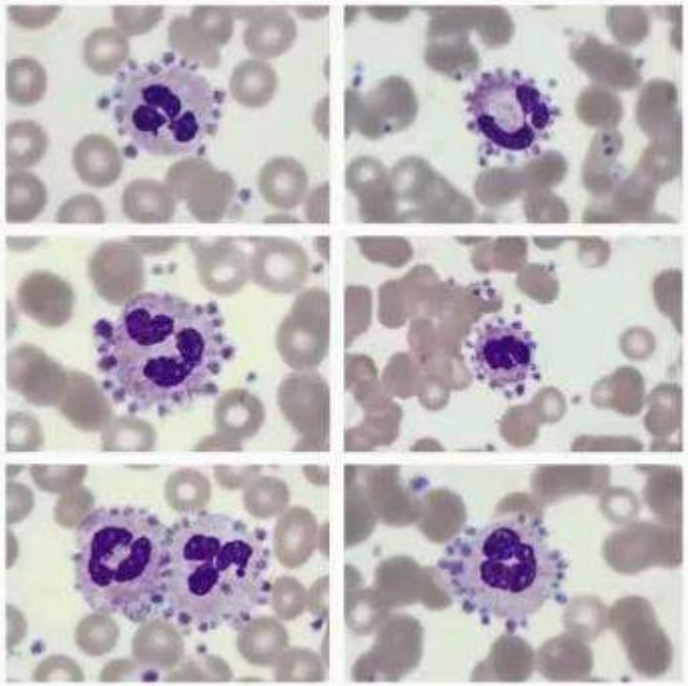
Пробирки с ЭДТА

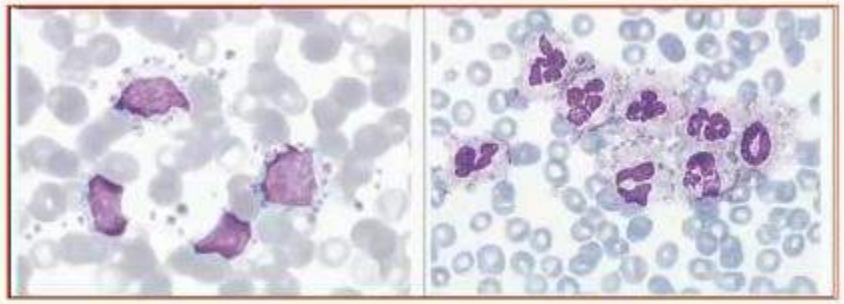


Агрегация тромбоцитов

Пробирки с цитратом
Именно для оценки количества тромбоцитов в образце

Тромбоцитарный сателлизм





Чаще всего происходит адгезия тромбоцитов к нейтрофилам, однако при ряде патологий возможно присоединение и к другим популяциям лейкоцитов.

Холодовая агглютинация

Холодовые агглютинины – это антитела, которые чаще всего принадлежат к классу IgM, вызывающие агрегацию эритроцитов при воздействии низких температур.
При высоких титрах холодовых агглютининов происходит задействование тромбоцитарного звена.

Решение проблемы – анализ образца после термальной обработки. Сигнал о наличии данного состояния – высокий уровень MCHC.

Гепарин-индуцированная тромбоцитопения

При **гепарин-индуцированной тромбоцитопении 1 типа** происходит прямое (неиммунное) взаимодействие молекул гепарина с мембраной тромбоцита, вызывающее впоследствии активацию и агрегацию тромбоцитов с развитием тромбоцитопении. При своевременной отмене гепарина количество тромбоцитов восстанавливается спонтанно в течение 2-4 недель и не требует какого-либо дополнительного лечения.

Гепарин-индуцированная тромбоцитопения 2 типа — редкая иммунноопосредованная реакция, возникающая в течение первых 4—15 суток от первого применения гепарина, характеризующаяся выработкой специфичных антител и проявляющаяся резким падением уровня тромбоцитов ниже 100 х 10^9/л и парадоксальными тромбозами.

Характеристика	ГИТ 1 тип	ГИТ 2 тип
Механизм	Неиммунный	Иммунный
Количество тромбоцитов	≥100 х 10^9/л / ≥50% от исходного уровня	≤100 х 10^9/л / ≤50% от исходного уровня
Манифестация	В течение первых 4 дней	В течение 5—14 дней
Тромбозы	Редко	Часто
Лечение	Отмена гепарина	Назначение альтернативных антикоагулянтов

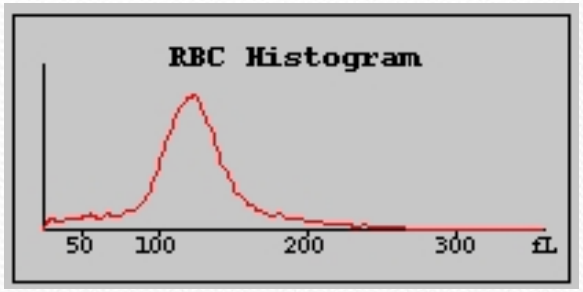
Средний объем нейтрофилов и моноцитов (MNEV и MMOV)

Для диагностики анемий, связанных с дефицитом витамина B_{12} или фолата, обычно используется MCV, как один из ключевых показателей. Однако, только у половины пациентов с недостатком фолата и B_{12} был выявлен высокий MCV, в основном из-за влияния в остальных случаях дефицита железа, АХЗ и других типов анемии

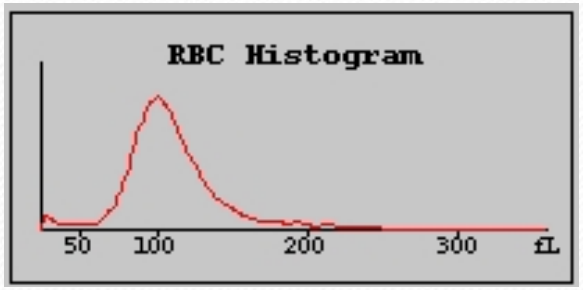
Средний объем нейтрофилов (MNEV) и средний объем моноцитов (MMOV) для диагностики дефицита B_{12} и фолата.

	Ne		Ly		Mo		Eo	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
V	148	16.65	93	14.47	164	17.83	142	13.50
C	151	4.14	120	6.79	129	4.27	153	3.81
MALS	145	9.84	66	15.42	86	13.35	202	8.03
UMALS	139	11.07	67	17.59	92	12.32	214	9.74
LMALS	146	11.27	60	19.03	77	18.20	187	9.77
LALS	177	28.45	39	10.85	94	27.74	147	43.72
AL2	154	10.54	100	13.73	162	15.83	128	8.78

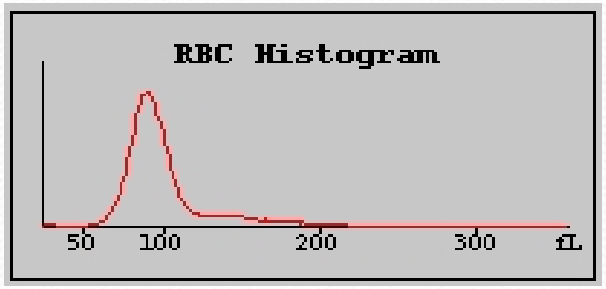
Средний объем нейтрофилов и моноцитов (MNEV и MMOV)



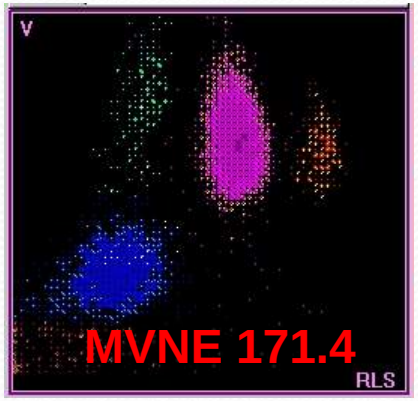
MCV 116.9



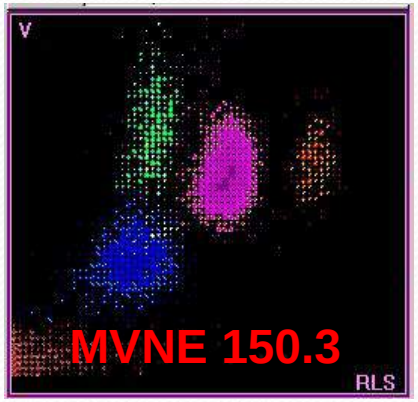
MCV 101.8



MCV 90

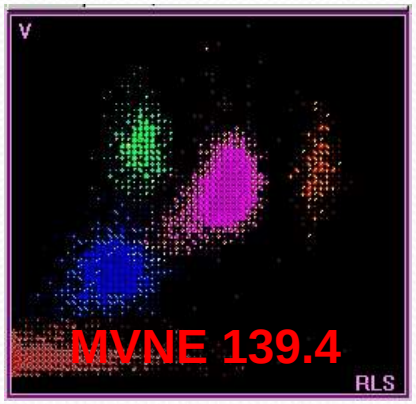


Vit B12 = 32



Vit B12 = 1139

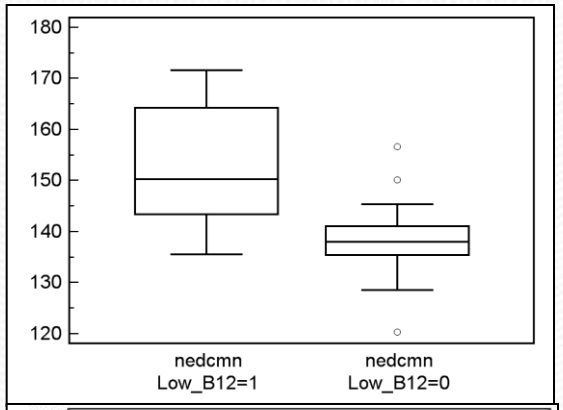
Через 2 недели терапии



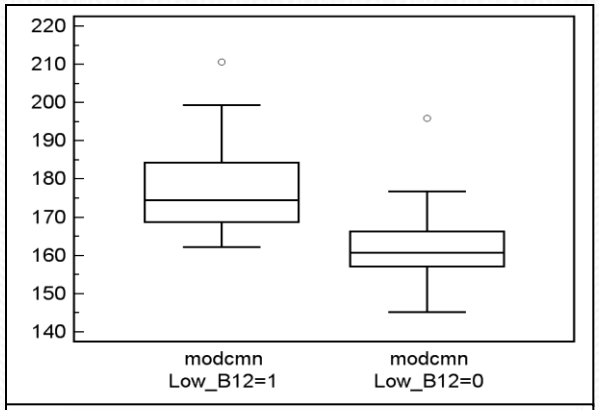
Vit B12 = 421

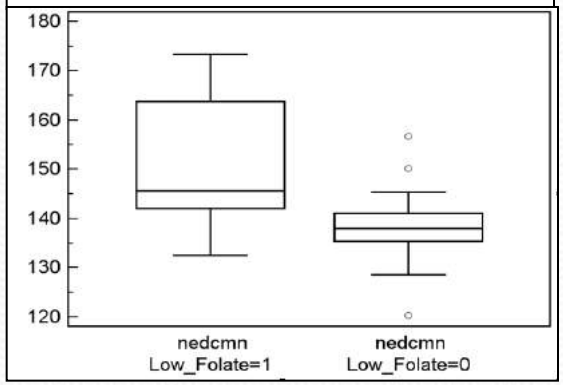
Через 7 недель терапии

Средний объем нейтрофилов и моноцитов (MNEV и MMOV)

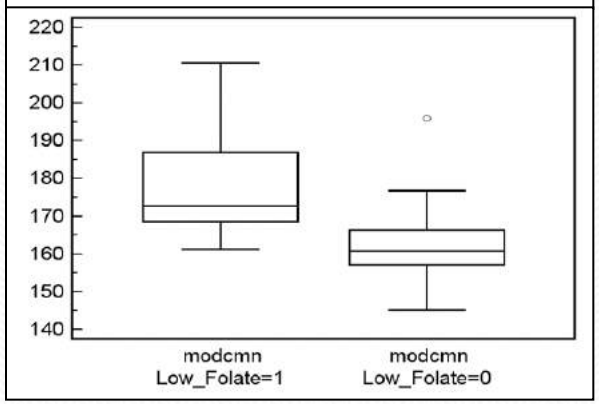


Дефицит витамина B12





Дефицит фолата



Средний объем нейтрофилов

Средний объем моноцитов

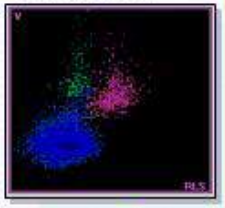
Таким образом средний объем нейтрофилов (MNEV) и средний объем моноцитов (MMOV) могут быть использованы для детекции мегалобластных анемий.

Эти показатели более чувствительны, чем MCV, поскольку они не подвержены влиянию дефицита железа.

Концепция Hemato-Flow как новый уровень развития клеточного анализа и возможность оптимизации лабораторного процесса в гематологии

Лабораторный процесс без HematoFlow

CBC/Diff результат



±75%

Нормальные значения WBC

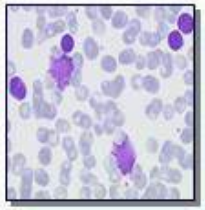
Валидация

Выдача результата

Аномальные значения WBC

±25%

Приготовление мазка



Окраска

Подсчет

±2%

Консультация специалиста

Выдача результата

Выдача результата

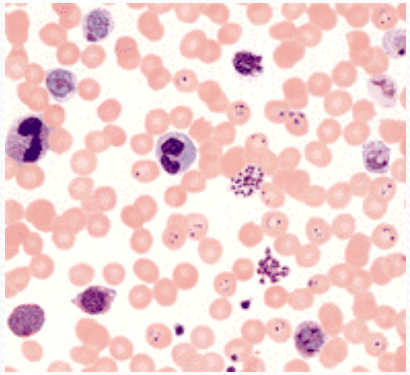
Современные гематологические анализаторы

Лейкоцитарная формула ограничена 5 субпопуляциями лейкоцитов.

Детекция количественных, но не качественных аномалий.

Для подтверждения наличия аномальных циркулирующих клеток требуется микроскопическое исследование мазков крови.

Недостатки микроскопии



a	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1.000	n = 10.000
0	0 - 3.6	0 - 1.8	0 - 0.7	0 - 0.4	0 - 0.1
1	0.0 - 5.4	0.1 - 3.6	0.3 - 2.3	0.5 - 1.8	0.8 - 1.3
2	0.2 - 7.0	0.6 - 5.0	1.0 - 3.6	1.2 - 3.1	1.7 - 2.3
3	0.6 - 8.5	1.1 - 6.4	1.7 - 4.9	2.0 - 4.3	2.6 - 3.4
4	1.1 - 9.9	1.7 - 7.7	2.5 - 6.1	2.9 - 5.4	3.6 - 4.5
5	1.6 - 11.3	2.4 - 9.0	3.3 - 7.3	3.7 - 6.5	4.5 - 5.5
6	2.2 - 12.6	3.1 - 10.2	4.1 - 8.5	4.6 - 7.7	5.5 - 6.5
7	2.9 - 13.9	3.9 - 11.5	4.9 - 9.6	5.5 - 8.8	6.5 - 7.6
8	3.5 - 15.2	4.6 - 12.7	5.8 - 10.7	6.4 - 9.9	7.4 - 8.6
9	4.2 - 16.4	5.4 - 13.9	6.6 - 11.9	7.3 - 10.9	8.4 - 9.6
10	4.9 - 17.6	6.2 - 15.0	7.5 - 13.0	8.2 - 12.0	9.4 - 10.7
15	8.6 - 23.5	10.4 - 20.7	12.0 - 18.4	12.8 - 17.4	14.3 - 15.8
20	12.7 - 29.2	14.7 - 26.2	16.6 - 23.8	17.6 - 22.6	19.2 - 20.8
25	16.9 - 34.7	19.2 - 31.6	21.3 - 29.0	22.3 - 27.8	24.1 - 25.9
30	21.2 - 40.0	23.7 - 36.9	26.0 - 34.2	27.2 - 32.9	29.1 - 31.0

Неудовлетворительная воспроизводимость результатов.

Влияние качества приготовления мазков, распределения ядерных клеток на стекле.

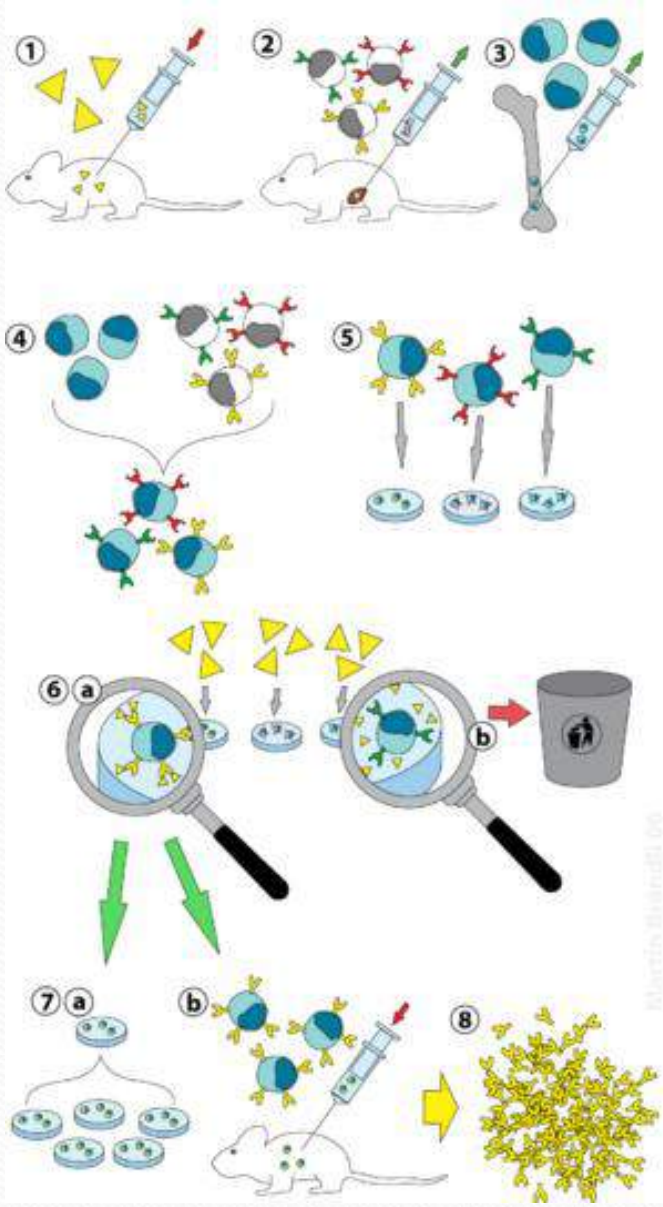
Субъективная оценка патологических клеток.

Уровень квалификации персонала.

Временные затраты на приготовление мазка крови и его просмотр.

Невозможность выделения субпопуляций лимфоцитов и моноцитов.

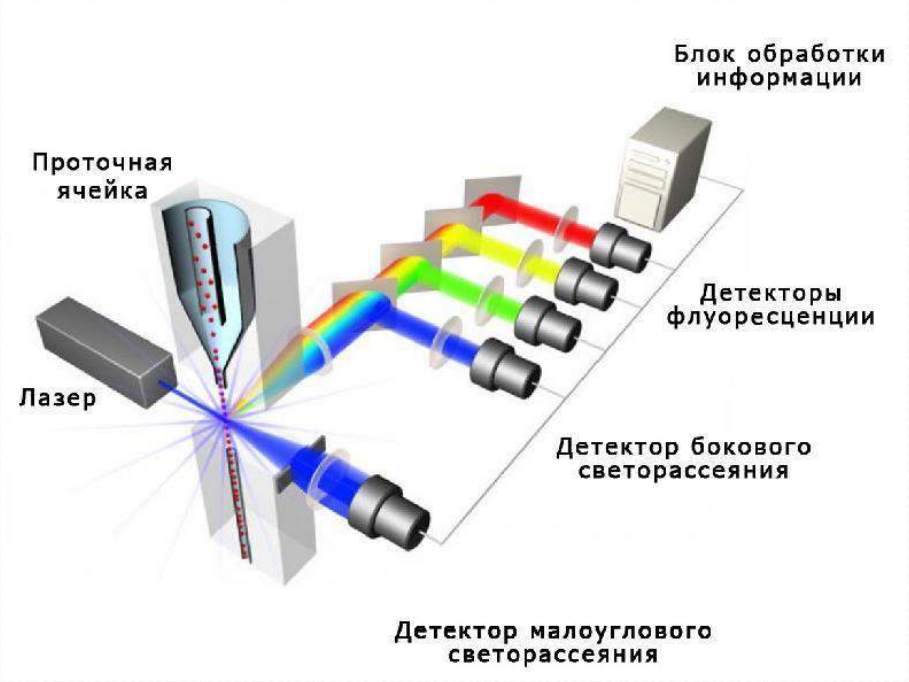
Гибридомная технология получения моноклональных антител



(1) иммунизация животных;
(2) выделение В-лимфоцитов из селезенки;
(3) культура клеток миеломы;
(4) слияние В-лимфоцитов и клеток миеломы;
(5) сегрегация клеточных линий;
(6) скрининг и селекция линий, производящих антитела;
(7) размножение гибридомы *in vitro* **(a)** или *in vivo***(b)**;
(8) получение антител.

Проточная цитометрия

- Короткое время анализа, благодаря его огромной производительности. Современные цитофлюориметры могут регистрировать несколько параметров для каждой отдельной клетки со скоростью до 10^5 клеток в секунду.
- Анализ большого количества клеток (до 10^7).
- Использование логических ограничений допускают детектирование отдельных субпопуляций клеток.
- Объективное измерение интенсивности флюоресценции, за счет высокоэффективных и высокочувствительных фотоприемников.
- Способность обнаружить и охарактеризовать редкие события, встречающиеся с частотой 10^{-5} -10^{-7}.



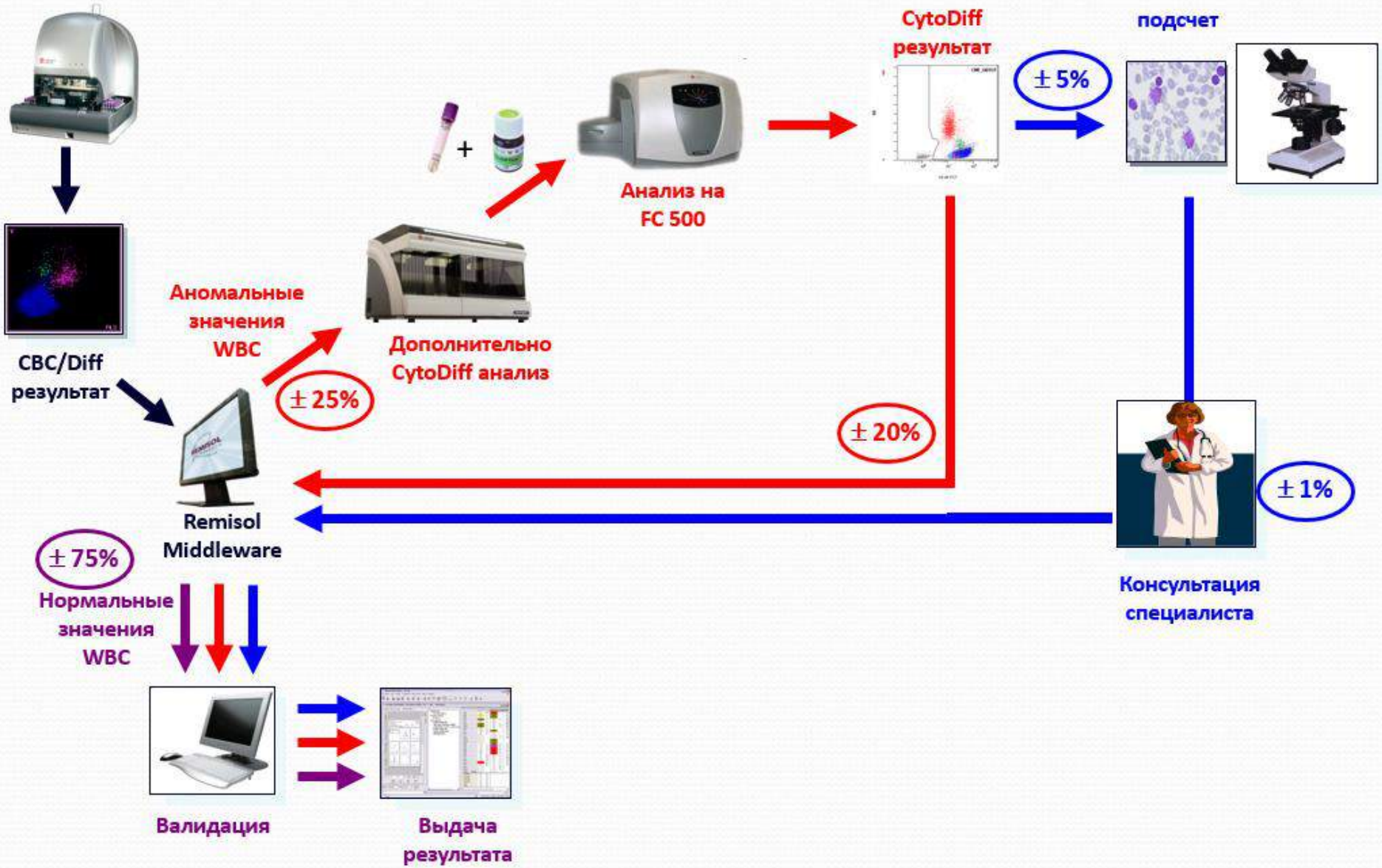
Hemato-Flow

HematoFlow - комплексный подход с внедрением проточного цитометра в рутинную гематологическую лабораторию

CytoDiff - пятицветный коктейль из 6 антител, который позволяет идентифицировать 16 клеточных популяций

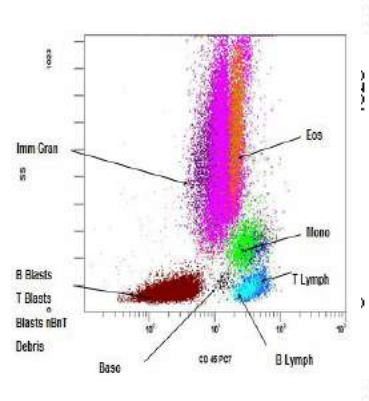
CD36-FITC	Моноциты, Эритроциты, Тромбоциты
CD2-PE	Т- Лимфоциты, NK клетки, Т - бласты
CD294-PE	Эозинофилы, Базофилы, Активированные Т клетки
CD19-ECD	В- Лимфоциты, В- бласты
CD16-PC5	Нейтрофилы, провоспалительные моноциты, CD 16+ Т/NK клетки
CD45-PC7	Все лейкоциты

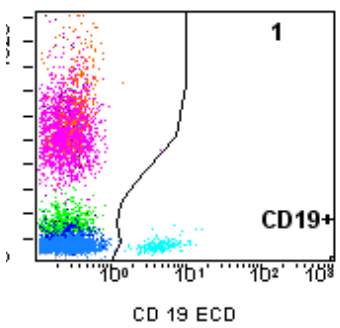
Лабораторный процесс с Hemato-Flow



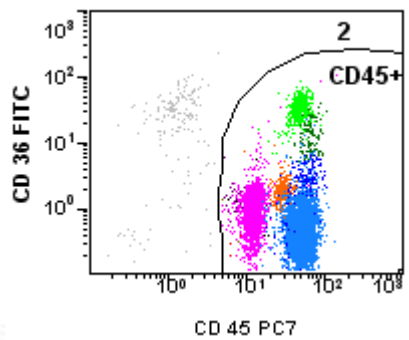
Процедура автоматического гейтирования

All Cells

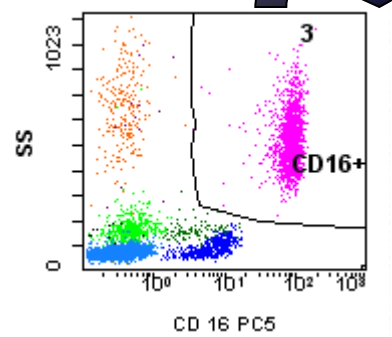




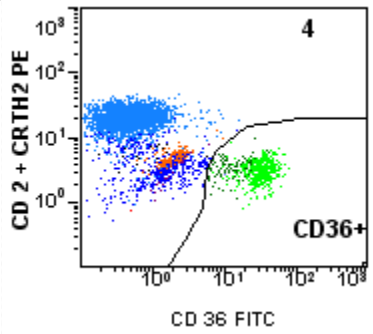
Previous less B Cell



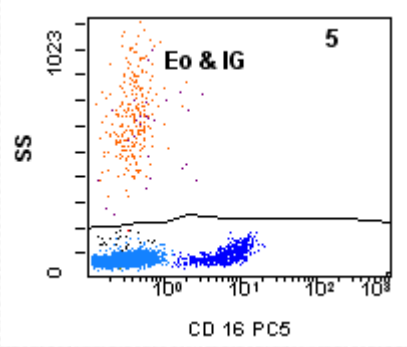
Previous less Non-WBC



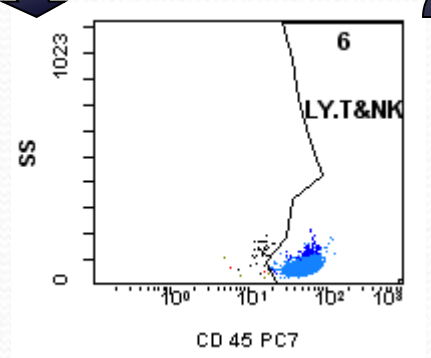
Previous less Mature Ne



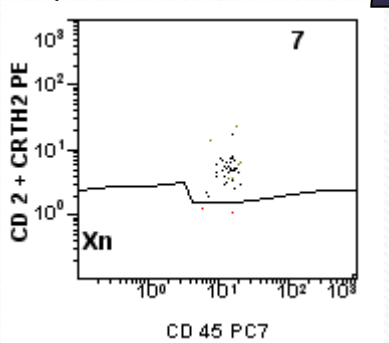
Previous less Mono



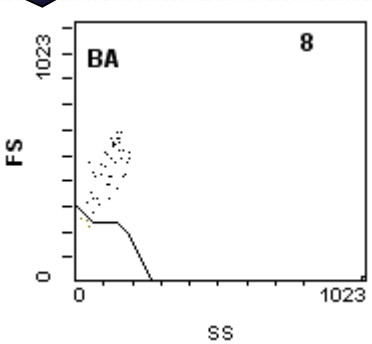
Previous less IG & Eo



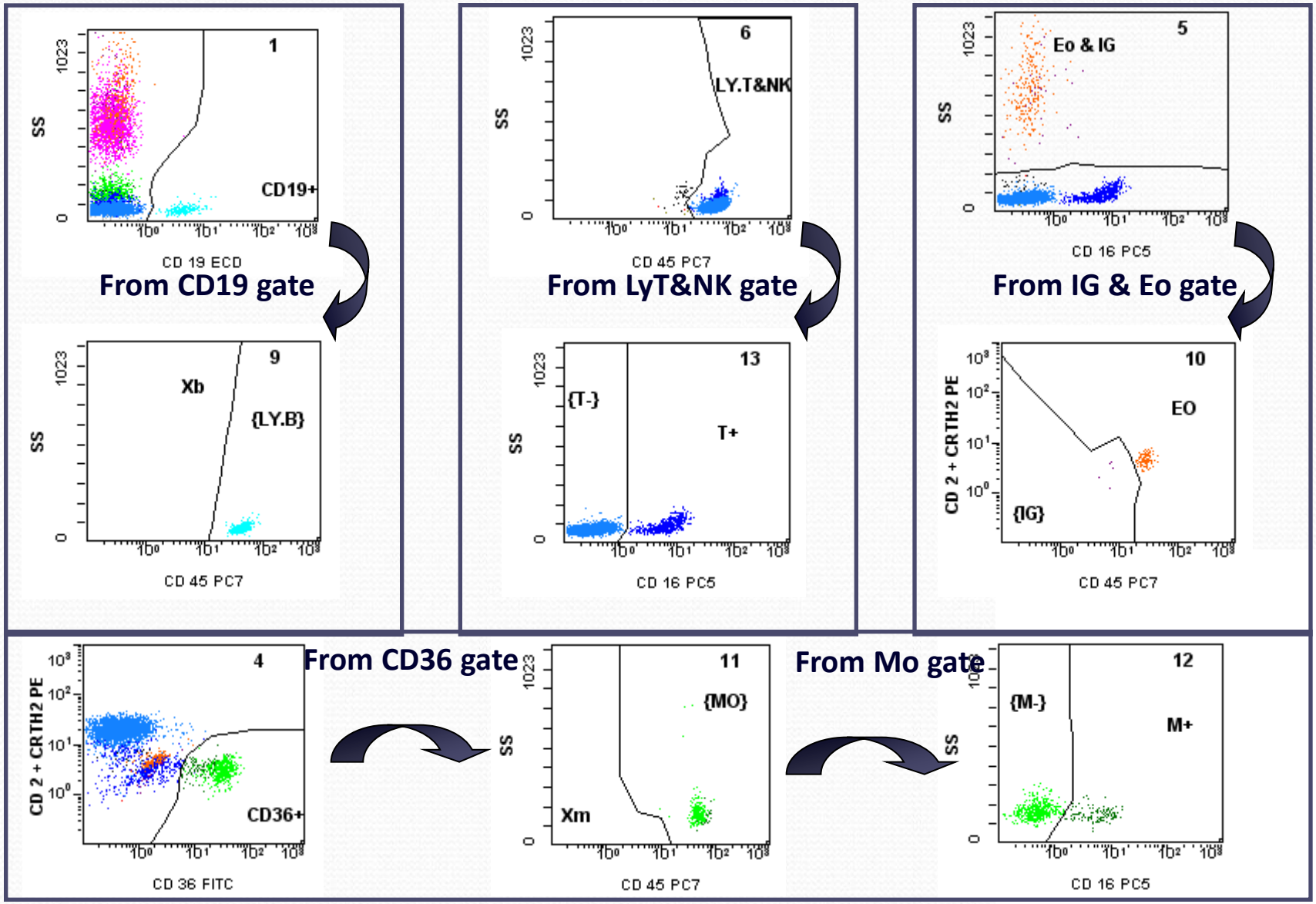
Previous less Ly T & NK



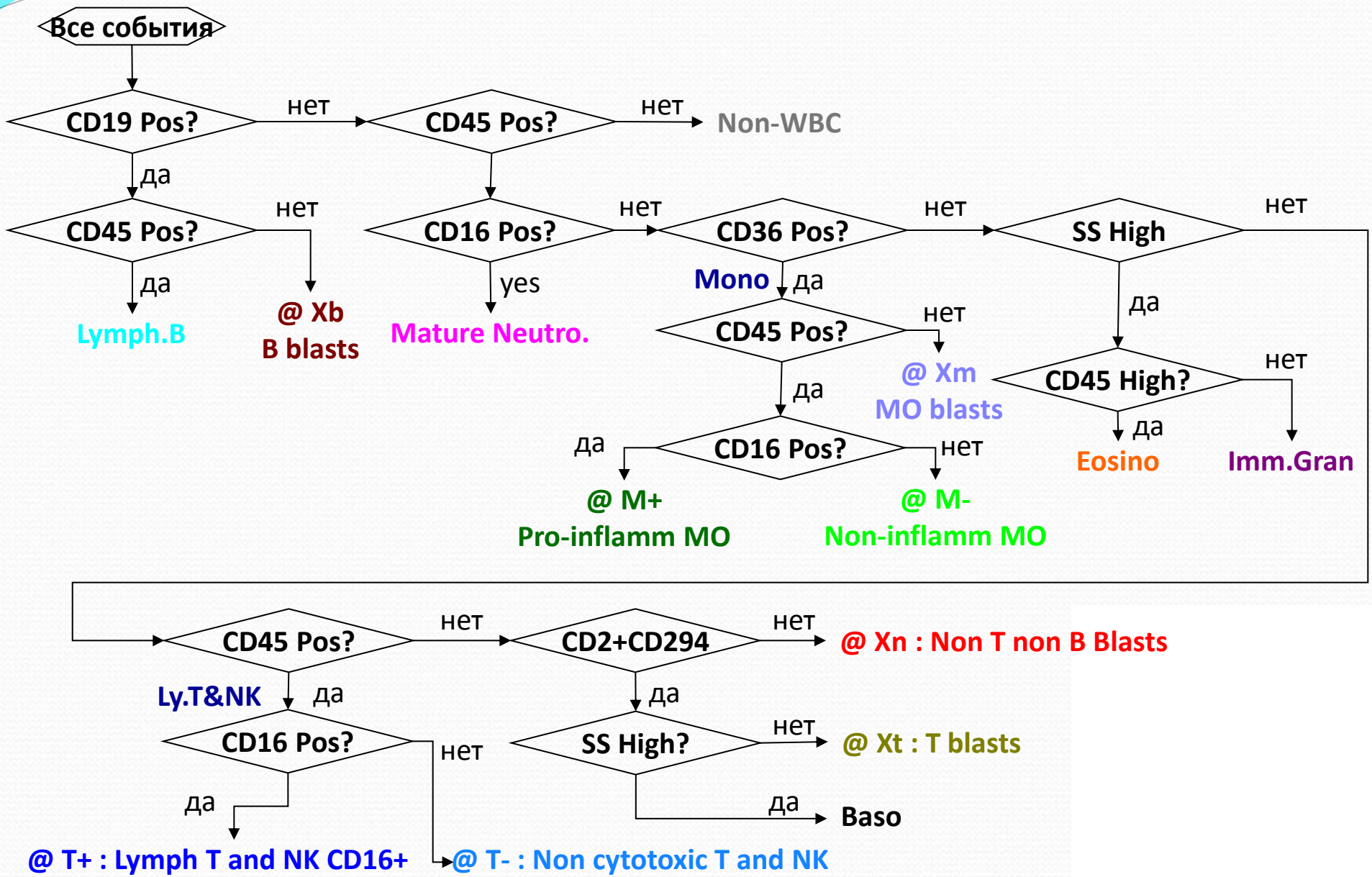
Previous less BlastnBnT



Процедура автоматического гейтирования



Алгоритм гейтирования



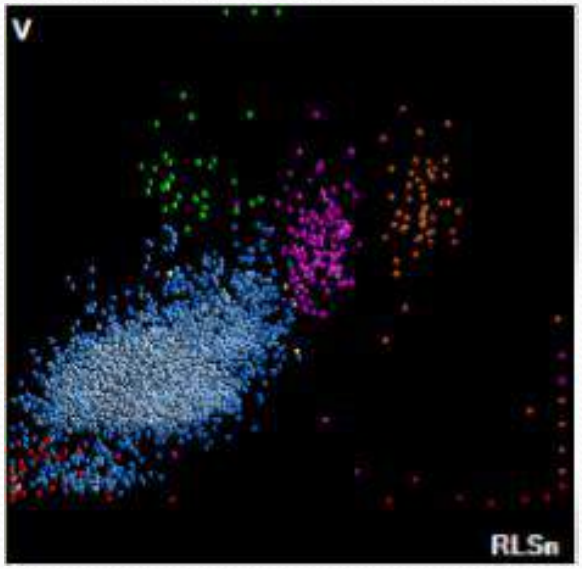
Моноциты при ВИЧ-инфекции

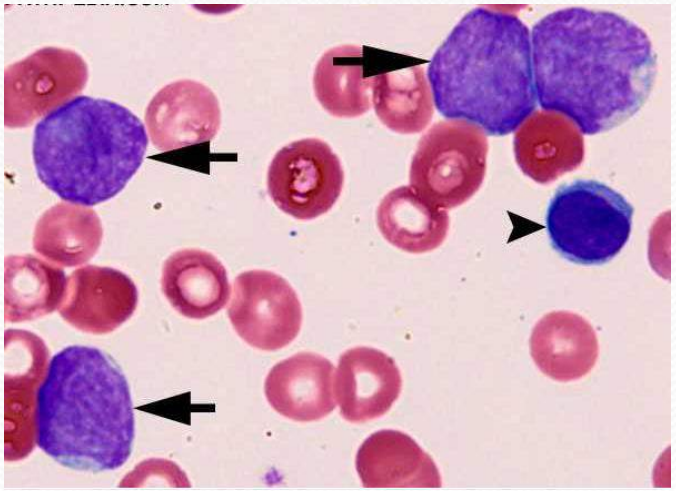
CD16+ моноциты более восприимчивы к ВИЧ инфекции и могут быть долгосрочным резервуаром вирусных частиц.

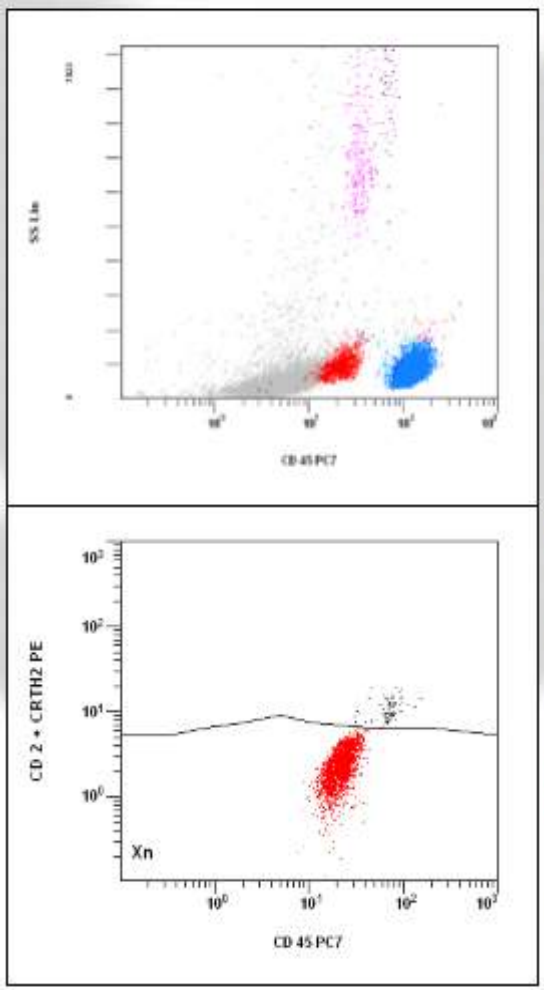
CD16+ моноциты, которые экспрессируют рецептор CCR5, чаще подвергаются ВИЧ-инфекции по сравнению с CD16- моноцитами. Этот эффект связан с ускоренным проникновением вируса через CCR5.

CD14++ моноциты экспрессируют боле высокий уровень низкомолекулярной формы APOBEC3G, который ассоциирован с анти-ВИЧ активностью, тогда как CD16+ моноциты экспрессируют высокомолекулярную форму APOBEC3G, не имеющую анти-ВИЧ активности.

Острый миелоидный лейкоз М0







Color	Name	% Gated
	T-	71.15
	T+	5.57
	Lymph.B	6.14
	Lymph.T&NK	76.72
	Lymph.Total	82.86
	M-	0.18
	M+	0.05
	Mono.Total	0.22
	Imm Gran	0.75
	Eosino.Total	0.27
	Neutro.Mature	3.11
	Neutro.Total	3.85
	Xb	0.04
	Xt	0.00
	Xm	0.00
	Xn	12.32
	Baso.Total	0.45
	Total Diff	100.00

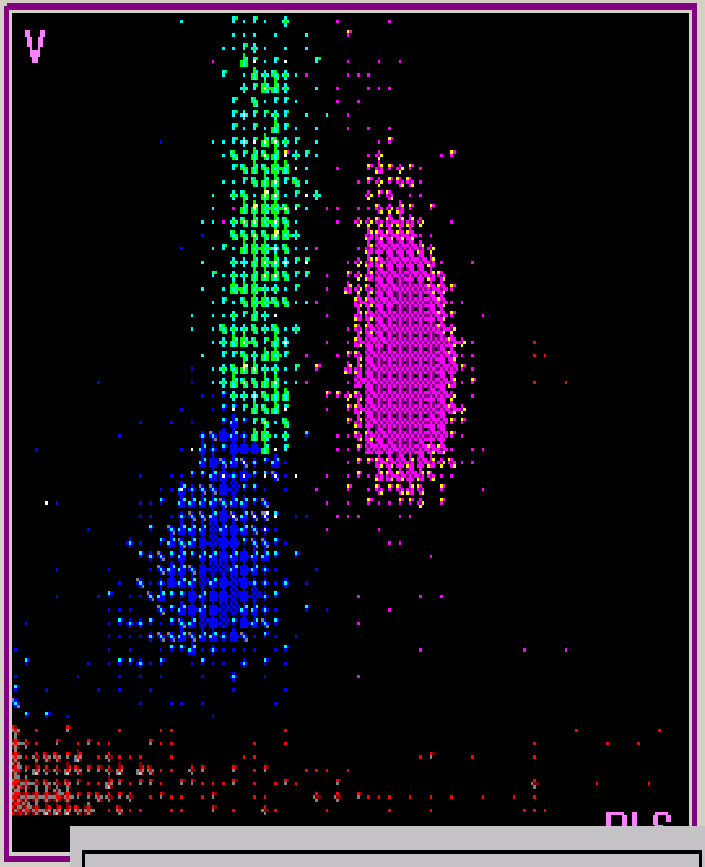
WBC	5.0		
NE %	69.0	NE #	3.4
LY %	17.4	LY #	0.9
MO %	13.2	MO #	0.7
EO %	0.1	EO #	0.0
BA %	0.3	BA #	0.0
NRBC %	0.0	NRBC #	0.0

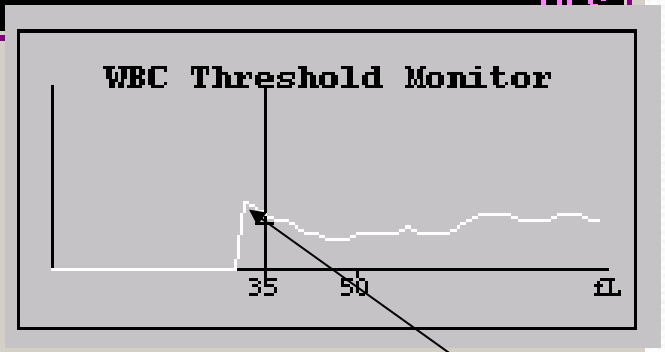
	NE		LY		MO		EO	
	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD
V	154	25.47	93	21.89	188	34.73	151	4.12
C	148	6.58	117	9.82	121	6.55	157	2.73
S	149	11.80	76	17.49	96	8.55	204	4.66

Temp (°F)	78.44	Setting	Normal

	Displayed	Analyzed	Total
Count	6115	6117	8192

	Actual	Low	High
Time	8.3	11.3	14.1





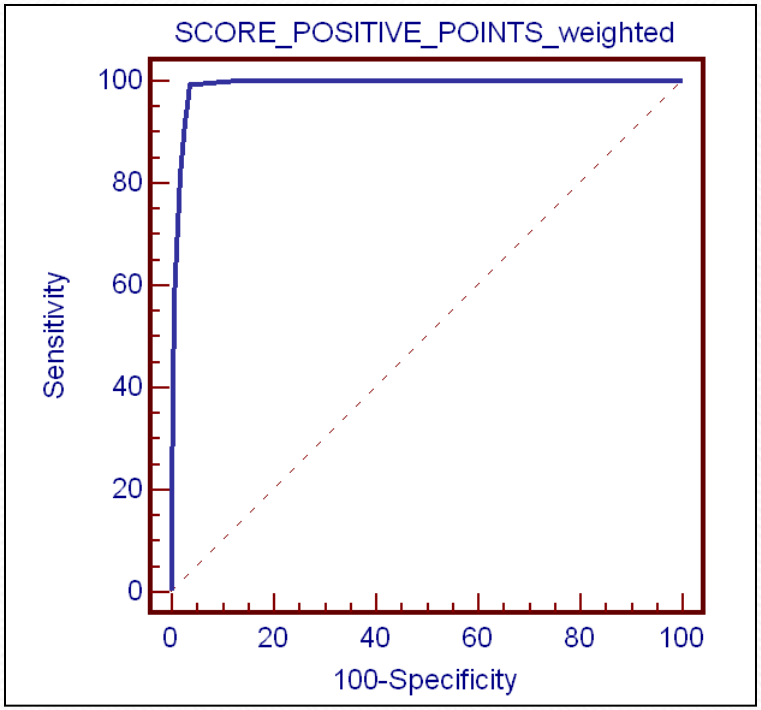
Тромбоциты 102

Пик на 35 fl

Малярия

@Malaria factor = @SD Vol Ly x @SD Vol Mo / 100

- @Malaria Factor > 3.7
- @SDVol Mo> 23.2
- @MVol Mo> 180
- Plt < 150
- Наличие пика на гистограмме на уровне 35 fl



Чувствительность 99.3%

Специфичность 96.3%

AUC 0.991

Выгоды для лаборатории

- Уменьшение доли ручного труда
- Оптимизация рабочего процесса
- Стандартизация
- Многообразие правил
- Более объективные и надежные результаты

Спасибо за внимание

По всем имеющимся вопросам можно связаться со мной по телефону +79315436887 или написать на электронный адрес a_trost@medgroupp.ru

С уважением,
Специалист по продукции ООО «Медикал Групп»
Трост Андрей