

Утверждаю  
Заместитель Министра  
здравоохранения и социального  
развития Российской Федерации  
Р.А.ХАЛЬФИН  
21 марта 2007 г. N 2050-РХ

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

### ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ АНАЛИЗАТОРЫ. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ АНАЛИЗА КРОВИ

#### Список сокращений

АА	Апластическая анемия
АИГА	Аутоиммунная гемолитическая анемия
АХЗ	Анемия хронических заболеваний
ЖДА	Железодефицитная анемия
НТЖ	Насыщение трансферрина железом
ОЖСС	Общая железосвязывающая способность сыворотки
ОПГА	Острая постгеморрагическая анемия
ХПН	Хроническая почечная недостаточность
ЭПО	Эритропоэтин
эЭПО	Эндогенный эритропоэтин
рЭПО	Рекомбинантный эритропоэтин
CHr	Содержание Hb в ретикулоцитах
CRC	Скорректированный подсчет ретикулоцитов
FSC	Прямое светорассеяние
HGB	Концентрация гемоглобина в крови
HFR	Ретикулоциты с высокой флуоресценцией
HLR%	Процент незрелых ретикулоцитов
HLR#	Абсолютное количество незрелых ретикулоцитов
Ht, HCT	Гематокрит
% Нуро	Процент гипохромных эритроцитов
IRF	Фракция незрелых ретикулоцитов
LFR	Ретикулоциты с низкой флуоресценцией
MCV	Средний объем эритроцитов
MCVr (MRV)	Средний объем ретикулоцитов
MCH	Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах
MCHC	Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах
MFR	Ретикулоциты со средней флуоресценцией
MSRV (MSCV)	Средний объем сферических ретикулоцитов
	9
PLT	Количество тромбоцитов (10 /л)
SFL	Канал специфического флуоресцентного сигнала
SSC	Боковое светорассеяние
sTfR	Растворимые рецепторы к трансферрину
	12
RBC	Количество эритроцитов (10 /л)
RDW-CV	Показатель анизоцитоза эритроцитов
Ret	Ретикулоциты
	9
RET#	Количество ретикулоцитов (10 /л)
Ret-He	Содержание Hb в ретикулоцитах
RET%	Количество ретикулоцитов (%)
RPI	Индекс продукции ретикулоцитов
	9
WBC	Количество лейкоцитов (10 /л)

#### Введение

В эру использования современных технологий автоматизированного анализа крови стало реальным предоставлять значительно больше клинической информации о состоянии кроветворной системы и реагировании ее на различные внешние и внутренние факторы. Анализ результатов исследования крови составляет неотъемлемое звено в диагностическом процессе и последующем мониторинге на фоне проводимой терапии.

Высокотехнологические гематологические анализаторы способны измерять более 32 параметров крови, осуществлять полный дифференцированный подсчет лейкоцитов по 5-ти основным популяциям: нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты, что делает возможным в случае отсутствия от референсных значений этих показателей не проводить ручной подсчет лейкоцитарной формулы.

Аналитические возможности гематологических анализаторов:

высокая производительность (до 100 - 120 проб в час)

небольшой объем крови для анализа (12 - 150 мкл)

анализ большого количества (десятки тысяч) клеток

высокая точность и воспроизводимость

оценка 18 - 30 и более параметров одновременно

графическое представление результатов исследований в виде гистограмм, скатерограмм.

Гематологические анализаторы имеют систему обозначения - флаги или "сигналы тревоги" - указывающую на отклонение параметров от установленных границ. Они могут касаться как увеличения или уменьшения количества тех или иных клеток, так и изменения их функционального состояния, которое отражается на характеристиках измеряемых прибором клеток. Во всех этих случаях необходим строгий визуальный контроль окрашенных препаратов с соответствующими комментариями.

Диагностические возможности гематологических анализаторов:

оценка состояния гемопоэза

диагностика и дифференциальная диагностика анемий

диагностика воспалительных заболеваний

оценка эффективности проводимой терапии

мониторинг за мобилизацией стволовых клеток из костного мозга.

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

### Преаналитический этап гематологических исследований

Контроль преаналитических факторов в гематологических исследованиях является ключевым для обеспечения качественных результатов тестов. Отклонения от стандартов при взятии пробы, транспортировке и хранении образца, интерферирующие вещества, а также факторы, связанные с пациентом, могут привести к неверным или неточным результатам анализов и, следовательно, к постановке ошибочного диагноза. До 70% лабораторных ошибок связаны именно с преаналитическим этапом исследования крови. За счет снижения числа ошибок на любом этапе преаналитической подготовки можно существенно улучшить качество гематологических анализов, снизить количество повторных проб, сократить расходы рабочего времени и средств на обследование пациентов.

Снижение до минимума возможных ошибок и обеспечение высокого качества гематологических исследований возможно за счет стандартизации преаналитического и аналитического этапов работы.

Взятие крови

На точность и правильность результатов оказывает влияние техника взятия крови, используемые при этом инструменты (иглы, скарификаторы и др.), а также пробирки, в которые берется, а в последующем хранится и транспортируется кровь.

- Кровь для клинического анализа берут у пациента из пальца, вены или из мочки уха, у

новорожденных - из пупка.

- Кровь следует брать натощак (после примерно 12 часов голодания, 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 материала следует проводить в резиновых перчатках, соблюдая правила асептики.

Венозная кровь. Венозная кровь считается лучшим материалом для клинического исследования крови. При известной стандартизации процессов взятия, хранения, транспортировки венозной крови удастся добиться минимальной травматизации и активации клеток, примеси тканевой жидкости, при этом всегда имеется возможность повторить и/или расширить анализ, например, добавив исследование ретикулоцитов.

Достоверность и точность гематологических исследований, проводимых из венозной крови, во многом определяется техникой взятия крови.

Подготовка пациента к взятию крови из вены включает несколько этапов. Место венепункции нужно продезинфицировать марлевой салфеткой или специальной безворсовой салфеткой, смоченной 70° спиртом, и подождать до полного высыхания антисептика (30 - 60 секунд). Применение ватных тампонов и других волокнистых материалов подобного рода может привести к засорению волокнами счетной и гемоглобиновой камер, что влечет снижение точности и воспроизводимости измерения. Не рекомендуется использовать 96° спирт, так как он дубит кожу, поры кожи закрываются, и стерилизация может быть неполной.

Не рекомендуется вытирать и обдуть место прокола, пальпировать вену после обработки. Рука пациента должна покоиться на твердой поверхности, быть вытянута и наклонена немного вниз так, чтобы плечо и предплечье образовывали прямую линию. Необходимо следить, чтобы в момент взятия крови кулак пациента был разжат. Жгут следует накладывать не более чем на 1 - 2 минуты, тем самым обеспечивается минимальный стаз, при котором клетки крови не повреждаются. Игла должна быть достаточно большого диаметра и иметь короткий срез, чтобы не травмировать противоположную стенку вены во избежание тромбоза. После взятия крови необходимо приложить сухую стерильную салфетку к месту венепункции, а затем наложить давящую повязку на руку или бактерицидный пластырь.

- Кровь для гематологических исследований должна поступать свободным током непосредственно в пробирку, содержащую антикоагулянт К ЭДТА. Взятие крови шприцом без антикоагулянта с

2

последующим переливанием в пробирку нежелательно из-за формирования микростушков и гемолиза. При взятии капиллярной крови необходимо использовать специальные пробирки с ЭДТА для капиллярной крови.

Рационально применение пробирок для взятия венозной крови небольшого объема (4 - 5 мл) диаметром 13 и высотой пробирки 75 мм. Взятие венозной крови облегчается применением закрытых вакуумных систем, например, BD Vacutainer (R) производства компании Becton Dickinson. Под влиянием вакуума кровь из вены быстро поступает в пробирку (рис. 1 - не приводится), что упрощает процедуру взятия и сокращает время наложения жгута.

Вакуумная система состоит из трех основных элементов, соединяющихся между собой в процессе взятия крови: стерильной одноразовой пробирки с крышкой и дозированным содержанием вакуума, стерильной одноразовой двусторонней иглы, закрытой с обеих сторон защитными колпачками, и одно- или многоразового иглодержателя (рис. 2 - не приводится). Пробирки, входящие в закрытую вакуумную систему, содержат различные добавки и антикоагулянты, в том числе для проведения гематологических исследований. Метод взятия крови с помощью закрытых вакуумных систем имеет ряд преимуществ, основными из которых являются обеспечение высокого качества пробы и предотвращение любого контакта с кровью пациента, а значит, обеспечение безопасности медицинского персонала и других пациентов за счет существенного снижения риска заражения гемоконтактными инфекциями.

ЭДТА (К ЭДТА или К ЭДТА) - предпочтительный антикоагулянт при

2

3

подсчете форменных элементов крови с использованием автоматических гематологических анализаторов. Использование Na ЭДТА не

2

рекомендуется вследствие его плохой растворимости в крови. При использовании рекомендованных концентраций К EDTA и К EDTA и при

2 3

проведении анализа на гематологических анализаторах в пределах от 1 до 4 ч после взятия крови существенных различий результатов между образцами, взятыми с этими двумя антикоагулянтами, не зафиксировано. Не следует использовать пробирки с выпаренным раствором ЭДТА, приготовленные в условиях лаборатории. При испарении на дне пробирки образуются крупные кристаллы ЭДТА, которые очень медленно растворяются в крови. Это может приводить к образованию фибриновых нитей в верхней части пробы крови. Многие компании выпускают пробирки с сухим напылением ЭДТА (особенно для капиллярной крови). Особенности технологии приготовления этих пробирок приводят к равномерному распределению ЭДТА по стенкам.

некоторых пациентов может наблюдаться небольшая спонтанная агрегация тромбоцитов или реже так называемая Д А-зависимая псевдотромбоцитопения (иммунного характера), причем эти явления прогрессируют по мере увеличения времени, прошедшего после взятия крови. таких лиц точный подсчет числа эритроцитов может быть осуществлен при взятии крови с цитратом в качестве антикоагулянта.

Следует помнить, что применение в качестве антикоагулянтов гепарина или цитрата натрия сопровождается структурными изменениями клеток и поэтому не рекомендуется для использования как при автоматизированном, так и морфологическом исследовании крови.

итрат натрия в основном используется для определения скорости оседания эритроцитов (СО ) по методу Вестергрена или Панченкова. Для этого венозная кровь набирается в пробирки с 3,8% цитратом натрия в соотношении :1. С этой же целью может использоваться венозная кровь, взятая с Д А (1,5 мг мл) и затем разведенная цитратом натрия в соотношении :1. Сразу после заполнения пробирки кровью до указанного на ней объема пробу следует осторожно перемешать плавным переворачиванием и вращением пробирки в течение не менее 2 минут (пробирку с Д А 8 - 10 раз, пробирку с цитратом натрия для определения СО - также 8 - 10 раз) (рис. 3 - не приводится). Пробирки нельзя встряхивать - это может вызвать пенообразование и гемолиз, а также привести к механическому лизису эритроцитов.

Для кратковременного хранения и перемешивания проб крови существуют различные приспособления. Одним из наиболее удобных приспособлений является отамикс -1 фирмы ( атвия), который позволяет подобрать наиболее оптимальный режим перемешивания проб крови (рис. - не приводится).

Капиллярная кровь. Для гематологических исследований капиллярную кровь рекомендуется брать в следующих случаях:

- при ожогах, занимающих большую площадь поверхности тела пациента
- при выраженном ожирении пациента
- при установленной склонности к венозному тромбозу
- у новорожденных.

Для взятия пробы капиллярной крови используют стерильные скарификаторы-копья одноразового применения (например, BD ТМ

Genie фирмы "Becton Dickinson", фирмы "Гем", ЗАО Медикон ЛТД и др.) или лазерные перфораторы. Между объемом получаемой крови и глубиной прокола имеется прямая зависимость. В связи с этим скарификатор должен выбираться в зависимости от места прокола и количества крови, необходимого для выполнения различных исследований. С этой целью фирма BD выпускает скарификаторы BD ТМ

Genie с лезвиями разных размеров (рис. 5 - не приводится).

Пункция пальца не должна проводиться у младенцев, так как это может привести к повреждению кости. У новорожденных кровь берется из пятки, при этом рекомендуется использовать специальные ТМ

атравматичные скарификаторы BD Quickheel производства той же фирмы (рис. 6 - не приводится). Перед проколом кожа пальца пациента обрабатывается стерильным тампоном, смоченным 70°

спиртом. Кожа в месте прокола должна быть сухой, розовой и теплой. Место пункции необходимо просушить естественным способом для удаления остатков спирта, поскольку он может вызвать гемолиз.

Применение ватных тампонов и других волокнистых материалов не рекомендовано, поскольку это приводит к засорению волокнами счетных и гемоглобиновой камер. В результате точность и воспроизводимость измерения падает.

Первую каплю крови, полученную после прокола кожи, следует удалить тампоном, поскольку эта капля содержит примесь тканевой жидкости. Капли крови должны свободно вытекать, нельзя давить на палец и массировать зону вокруг прокола, так как при этом в кровь попадает тканевая жидкость, что существенно искажает результаты исследования. После взятия крови к раневой поверхности прикладывается новый стерильный тампон, смоченный 70° спиртом. Тампон следует удерживать, пока не прекратится кровотечение.

После прокола капиллярная кровь помещается в специальный микрокапилляр или специальные пластиковые пробирки одноразового пользования, обработанные антикоагулянтом К ЭДТА (фирмы 2 "Deltalab", "Sarstedt", BD Microtainer (R) и др.) (рис. 7, 8 - не приводятся).

При прикосновении края пробирки к месту пункции капли крови начинают стекать в нее под действием капиллярного эффекта. После завершения сбора крови пробирку следует плотно закрыть. Необходимым условием для обеспечения качественной пробы является ее обязательное немедленное перемешивание с антикоагулянтом осторожным переворачиванием пробирки до 10 раз. В случае последовательного взятия капиллярной крови в несколько микропробирок необходимо соблюдать определенный порядок их заполнения. Последовательность взятия крови такова: в первую очередь заполняются пробирки с ЭДТА, затем с другими реактивами и в последнюю очередь заполняются пробирки для исследования сыворотки крови.

Основные рекомендации при работе с капиллярной кровью:

- При взятии крови в пробирку с антикоагулянтом не допускается стекание крови по коже пальца, стенке пробирки и любой другой поверхности, так как мгновенно происходит контактная активация прогресса 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 (тканевого тромбoplastина).

Следует отметить, что при взятии капиллярной крови возможен ряд особенностей, которые бывает весьма трудно стандартизировать:

- физиологические - холодные, цианотичные пальцы;

- методические - малый объем исследуемой крови и в связи с этим необходимость разведения образца для анализа на гематологическом анализаторе и др.

Все это приводит к значительным разбросам в получаемых результатах и, как следствие, к необходимости повторных исследований для уточнения результата.

**Доставка, хранение и подготовка проб к исследованию**

Для обеспечения качественного результата исследований нужно четко контролировать время и условия хранения проб до выполнения анализа.

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

- Непосредственно после взятия крови исключается возможность спонтанной агрегации тромбоцитов, примерно 25 мин. необходимо для адаптации тромбоцитов к антикоагулянту. При анализе, проведенном позже чем через 6 - 8 часов после взятия образца, уменьшается достоверность результатов. Более продолжительное хранение крови не рекомендуется, т.к. изменяются некоторые характеристики клеток (сопротивляемость клеточной мембраны), снижается объем лейкоцитов, повышается объем эритроцитов, что в конечном итоге приводит к ошибочным результатам измерения и неправильной интерпретации результатов. Только

концентрация гемоглобина и количество тромбоцитов остаются стабильными в течение суток хранения крови.

- Кровь нельзя замораживать. 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. Однако при этом следует учитывать, что происходит набухание клеток и изменение параметров, связанных с их объемом. У практически здоровых людей эти изменения не носят критического характера и не сказываются на количественных параметрах, но при наличии патологических клеток последние могут изменяться или даже разрушаться в течение нескольких часов с момента взятия крови.

- Непосредственно перед исследованием кровь должна быть тщательно перемешана в течение нескольких минут для разведения антикоагулянта и равномерного распределения форменных элементов в плазме. Длительное постоянное перемешивание образцов на ротомиксе до момента их исследований не рекомендуется вследствие возможного травмирования и распада патологических клеток.

- Исследование крови на приборе проводится при комнатной температуре. Кровь, хранившуюся в холодильнике, необходимо вначале согреть до комнатной температуры, так как при низкой температуре увеличивается вязкость, а форменные элементы имеют тенденцию к склеиванию, что, в свою очередь, приводит к нарушению перемешивания и неполному лизису. Исследование холодной крови может быть причиной появления "сигналов тревоги" вследствие компрессии лейкоцитарной гистограммы.

- Приготовление мазков крови рекомендуется делать не позднее 1 - 2 часов после взятия крови.

При выполнении гематологических исследований на значительном удалении от места взятия крови неизбежно возникают проблемы, связанные с неблагоприятными условиями транспортировки. Тряска, вибрация, постоянное перемешивание, нарушения температурного режима, возможные проливы и загрязнения проб могут оказывать существенное влияние на качество анализов. Для устранения этих причин при перевозках пробирок с кровью рекомендуется использовать герметично закрытые пластиковые пробирки (BD Vacutainer (R) производства компании "Becton Dickinson", Deltalab, Sarstedt) и специальные транспортные изотермические контейнеры (фирма "Гем").

#### Влияние преаналитических факторов, зависящих от пациента

На результаты гематологических исследований могут влиять факторы, связанные с индивидуальными особенностями и физиологическим состоянием организма пациента. Изменения клеточного состава периферической крови наблюдаются не только при различных заболеваниях, они также зависят от возраста, пола, диеты, курения и употребления алкоголя, менструального цикла, беременности, физической нагрузки, эмоционального состояния и психического стресса, циркадных и сезонных ритмов; климатических и метеорологических условий; положения пациента в момент взятия крови; приема фармакологических препаратов и др. Так, например, число эритроцитов и концентрация гемоглобина у новорожденных выше, чем у взрослых. С увеличением высоты над уровнем моря значительное повышение наблюдается для гематокрита и гемоглобина (до 8% на высоте 1400 м). Физические упражнения могут приводить к существенным изменениям числа лейкоцитов, обусловленным гормональными сдвигами. У больных при переходе из положения лежа в положение стоя показатели гемоглобина и число лейкоцитов могут увеличиваться на 6 - 8%, а показатели гематокрита и число эритроцитов возрастать на 15 - 18%. Этот эффект обусловлен переходом жидкости из сосудистого русла в ткани в результате повышения гидростатического давления. Выраженная диарея и рвота могут приводить к значительной дегидратации и гемоконцентрации. После регидратации наблюдается снижение гемоглобина и гематокрита, что может быть ошибочно принято за кровопотерю.

Для устранения или сведения к минимуму влияния этих факторов кровь для повторных анализов необходимо брать в тех же условиях, что при первом исследовании.

## Автоматизированное исследование клеток крови

Автоматические счетчики крови оценивают размеры, структурные, цитохимические и другие характеристики клеток. Они анализируют около 10000 клеток в одном образце и имеют несколько различных каналов подсчета клеточных популяций и концентрации гемоглобина. На основании количества определяемых параметров и степени сложности их можно условно разделить на основных класса:

I класс - автоматические гематологические анализаторы, определяющие до 20 параметров, включая расчетные показатели красной крови и тромбоцитов, гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, а так же частичную дифференцировку лейкоцитов на три популяции - лимфоциты, моноциты и гранулоциты. К анализаторам I класса относятся гематологические анализаторы, поставляемые в рамках приоритетного национального проекта «Здоровье» в 2006 г. в клиничко-диагностические лаборатории амбулаторно-поликлинического звена здравоохранения: E-600 фирмы «Солана» (Италия), Advia 60 фирмы Bayer (Германия), CO-TE AsT фирмы «Вестачема» (Франция).

II класс - высокотехнологичные гематологические анализаторы, позволяющие проводить развернутый анализ крови, в том числе полную дифференцировку лейкоцитов по 5-ти параметрам (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты), гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, скатерограммы («Селена-60», «Селена-Du 700», «К-8222»).

III класс - сложные аналитические системы, выполняющие не только развернутый анализ крови с дифференцировкой лейкоцитов по 5 параметрам, но и подсчет и анализ ретикулоцитов, некоторых субпопуляций лимфоцитов; при необходимости комплектуются блоком для автоматического приготовления и окраски мазков из заданных образцов крови («Унеликс-2100», «Селена H750», «Авта 2120», «Селена 120»).

В основе работы анализаторов I-го класса лежит кондуктометрический метод. Анализаторы II и III-го классов используют в своей работе комбинации разных методов.

### Кондуктометрические гематологические анализаторы

Технология автоматического подсчета клеток была разработана в 1970 г. в «Солана» и «Селена». Апертуро-импедансный метод (метод Культера или кондуктометрический 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. Если через узкий канал, заполненный электропроводящим раствором, проходит клетка крови, то в этот момент сопротивление электрическому току в канале возрастает (рис. 10 - не приводится). Несмотря на то, что изменение сопротивления невелико, современные электронные приборы легко его улавливают. 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.

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

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

Подсчет эритроцитов и тромбоцитов, расчет величины гематокрита, эритроцитарных и тромбоцитарных индексов

Разделение эритроцитов и тромбоцитов в современных анализаторах проводится по измерению амплитуды электрического сигнала: тромбоциты (небольшие по размеру клетки) при прохождении измерительного канала генерируют электрические импульсы низкой амплитуды, а сравнительно большие клетки - эритроциты и лейкоциты - импульсы высокой амплитуды (рис. 11 -

не приводится). После лизиса эритроцитов в суспензии остаются лейкоциты. З первого счета импульсов высокой амплитуды вычитают импульсы высокой амплитуды второго счета (лейкоциты). Азница импульсов высокой амплитуды до и после лизиса соответствует количеству эритроцитов -  $BC (e B oo Ce)$ .

стройство, которое разделяет импульсы по величине амплитуды, называется дискриминатор. В современных анализаторах применяются многоканальные дискриминаторы, позволяющие получить детальную информацию о размерах клеток в виде гистограмм, поскольку каждый канал соответствует определенному объему клеток.

При суммировании амплитуд импульсов, получаемых при подсчете количества эритроцитов, получается величина, отражающая общий объем, занимаемый эритроцитами, то есть гематокрит  $Hc (e a oc)$ . азделив гематокритную величину на концентрацию эритроцитов ( $BC$ ), получается полезная характеристика эритроцитов - средний объем  $C (ea so p sa o e)$ .

Очевидно, что аналогичные показатели можно получить и для тромбоцитов: концентрация тромбоцитов -  $T (pa ee)$ , тромбокрит -  $CT (pa ee c)$ , средний объем тромбоцитов -  $(ea pa ee o e)$ .

Поскольку в норме концентрация эритроцитов в крови на порядка превышает концентрацию лейкоцитов, то вклад лейкоцитов в общее количество подсчитываемых клеток пренебрежимо мал по сравнению с эритроцитами, поэтому в некоторых анализаторах за количество эритроцитов принимают общее подсчитанное количество клеток. Такое допущение справедливо, за исключением случаев явных лейкоцитозов.

#### Подсчет и дифференцировка лейкоцитов

Определение количества лейкоцитов возможно только после лизиса эритроцитов. Эта задача оказалась легко решаемой, так как свойства мембран эритроцитов и лейкоцитов существенно различаются. Эритроциты легко лизируются под воздействием многих поверхностно-активных веществ, при этом лейкоциты, хотя и претерпевают некоторые изменения, остаются целыми. Поэтому при подсчете лейкоцитов, прежде чем пропустить разведенную суспензию крови через апертуру датчика, к ней добавляют лизирующий раствор или гемолитик, эритроциты разрушаются до очень мелких фрагментов, которые при подсчете лейкоцитов генерируют электрические импульсы очень низкой амплитуды, не влияющие на результат анализа.

азделение неизмененных лейкоцитов кондуктометрическим методом на основные субпопуляции невозможно в виду близости их объемов, однако можно подобрать такую композицию растворителя и гемолитика, что различные формы лейкоцитов претерпевают изменения размеров в разной степени и, благодаря этому, могут разделяться данным методом.

менение объема клетки зависит от многих факторов, включающих величину и форму ядра, объем цитоплазмы, наличие внутриклеточных включений и т.д., поэтому размер трансформированных клеток не соответствует размерам клеток при визуальном просмотре их в окрашенном мазке крови (таблица 1)

Таблица 1

Соотношение размеров клеток в окрашенных мазках крови и в приборах после обработки их лизирующим реагентом		
Тип клеток	Размер клеток при визуальном анализе мазков крови	Размер клеток после обработки лизатом
Лимфоциты	малый	малый
Базофилы	средний	средний, малый
Эозинофилы	средний	средний, большой
Моноциты	наибольший	средний
Нейтрофилы	средний	большой, средний
Патологические формы клеток	различный	различный <*>
<*> Дальнейшая идентификация патологических форм клеток проводится визуально		



Полученные после анализа лейкоциты распределяются на гистограмме следующим образом (рис. 12 - не приводится)

- Область малых объемов ( 5 - 0 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" ( 0 - 120 фл), которая лучше всего коррелирует с моноцитами (по этой причине в некоторых анализаторах клетки в этой области указываются как моноциты). Однако, учитывая тот факт, что коэффициент корреляции с моноцитами  $R = 0,5 - 0,8$  сравнительно невысок, более корректным является название параметра "средние лейкоциты" или "средние клетки" ( ID). Практически в область средних клеток могут частично попадать базофилы, эозинофилы, различные патологические формы.

#### Высокотехнологические гематологические анализаторы

Высокотехнологические гематологические анализаторы способны осуществлять дифференцированный счет лейкоцитов по 5-ти (5Di ) основным популяциям, используя различные принципы дифференцирования клеток нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты, оценивать наличие незрелых гранулоцитов, анализировать ретикулоциты и их субпопуляции, проводить оценку стволовых гемопоэтических клеток и субпопуляций лимфоцитов. многофункциональные функции современных гематологических анализаторов стали возможны, благодаря развитию новых технологий, которые отличаются у разных фирм-производителей.

Так, в анализаторах фирмы Beckman-Coulter ( H 500, H 50) (С А - Франция) используется трехмерный анализ дифференцировки лейкоцитов (VCS-технология), который включает в себя одновременный компьютерный анализ клеток по объему (Volume) (рис. 1 - не приводится), электропроводности (Conductivity) (рис. 14 - не приводится) и дисперсии лазерного света (Scatter) (рис. 15 - не приводится).

Полученные по трем каналам данные с помощью электроники комбинируются и анализируются, в результате чего происходит распределение клеток по дифференцировочным кластерам и, таким образом, лейкоциты разделяются на пять основных популяций лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы и базофилы (рис. 16 - не приводится). Результатом отображения объемного графика на плоскости является лейкоцитарная скатерограмма, на которой каждый тип клеток имеет свою зону расположения.

В анализаторах серии Cell-Dyn для дифференцировки лейкоцитов применяется технология A SS - ulti An le olari ed Scatter Separation - мультипараметрическая система лазерного светорассеивания - регистрация интенсивности рассеивания клетками поляризованного лазерного луча под разными углами. Этот метод заключается в компьютерном анализе дисперсии лазерного счета клетками крови (рис. 1 (а, б) - не приводится). Рассеивание клеткой поляризованного лазерного луча под разными углами дает сведения о таких ее свойствах, как

- размер клеток - для чего оценивается прохождение поляризованного лазерного луча под малым углом рассеивания (близким к  $0^\circ$ );

- структура и степень сложности клеток - оценивается по анализу рассеивания поляризованных лазерных лучей, направленных под углом до  $90^\circ$ ;

- ядерно-цитоплазматическое соотношение - оценивается по анализу рассеивания поляризованных лазерных лучей, направленных под углом до  $10^\circ$ ;

- оценка формы клеточного ядра - осуществляется благодаря анализу светорассеивания поляризованных лазерных лучей под углом  $0^\circ$ ;

- для оценки клеточной зернистости и дифференцировки эозинофилов используется оценка светорассеивания деполаризованного луча под углом в  $0^\circ$ .

В приборах серии Tec nicon, ADVIA120, 2120, entra D 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. Использование пероксидазной реакции

основано на различной ее активности в лейкоцитах. Так, эозинофилы и нейтрофилы имеют интенсивную пероксидазную активность, моноциты - слабую, в лимфоцитах она не выявляется.

Проточная цитохимическая техника включает регистрацию рассеянного и поглощенного светового луча. В лейкоцитарном канале после лизиса эритроцитов и стабилизации лейкоцитов происходит цитохимическая реакция, далее лейкоциты дифференцируются по двум признакам: размеру клеток, определяемому методом рассеивания лазерного луча, и пероксидазной активности - по поглощению клеткой светового потока (рис. 18 - не приводится). Дифференцировка базофилов от других гранулоцитов проводится в базоканале. Цитоплазма всех лейкоцитов за исключением базофилов подвергается лизису после обработки пробы специфическим лизатом. Затем в канале осуществляется измерение дисперсии лазерного света под углами  $2^\circ - 3^\circ$  и  $5^\circ - 15^\circ$ , что позволяет различить клетки в зависимости от формы ядер. (Рис. 19 - не приводится.)

Сравнивая информацию, получаемую с Perox- и Basis-каналов, компьютер осуществляет дифференцировку лейкоцитов на 5 основных популяций, а также сигнализирует в виде флагов о присутствии в крови активированных лимфоцитов, незрелых гранулоцитов, бластов, эритробластов.

В гематологических анализаторах серии XT и XE 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 (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, моноциты и лимфоциты), так и для подсчета ретикулоцитов (рис. 20 - не приводится).

Анализ клеток происходит в проточной кювете при пересечении луча лазера длиной 633 нм (рис. 21 - не приводится). После контакта лазерного луча с окрашенной клеткой происходит рассеивание последнего под большим и малым углами и возбуждение флуоресцентного красителя. Данные сигналы улавливаются фотоумножителями и регистрируются в виде трех параметров (рис. 22 - не приводится):

1. Светорассеивание под малым углом (FSC) - отклонение лазерного луча под малым (до  $10^\circ$ ) углом, которое зависит от размера (объема, только при условии сферической формы частицы) и формы клетки;

2. Боковое светорассеивание (SSC) - рассеивание под углом до  $90^\circ$  зависит от рефрактерного индекса (или плотности) клетки и характеризует сложность внутриклеточных структур;

3. Детекция специфического флуоресцентного сигнала (SFL), которая регистрируется также как боковое светорассеивание под углом  $90^\circ$  и позволяет судить о содержании РНК/ДНК в клетках.

На основании полученных сигналов все клетки распределяются по соответствующим кластерам (зонам) в соответствии с их размером, структурой и количеством ДНК (рис. 23 - не приводится). Таким образом, происходит дифференцировка лейкоцитов на 4 популяции: лимфоциты, моноциты, эозинофилы и нейтрофилы вместе с базофилами (рис. 24 - не приводится).

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 (рис. 25 - не приводится), с последующим дискриминантным анализом всех элементов по размеру и сложности структуры и количеству ДНК (рис. 26 - не приводится).

Кроме того, приборы оборудованы каналом для выделения незрелых гранулоцитов и атипичных лимфоцитов.

Таким образом, использование приборов с полным дифференцированным подсчетом лейкоцитов (5Diff) позволяет повысить точность дифференциального подсчета лейкоцитов, провести скрининг нормы и патологии, динамический контроль за лейкоцитарной формулой и резко сократить ручной подсчет лейкоцитарной формулы, оставляя примерно до 15 - 20% образцов крови для световой микроскопии.

#### Определение гемоглобина

В классическом гемиглобинцианидном методе (метод Драбкина)

Fe гемоглобина окисляется до Fe метгемоглобина феррицианидом, затем метгемоглобин переводится в стабильный цианметгемоглобин цианидом. Оптическая плотность CNmetHb измеряется при 540 нм, при которой имеется максимум поглощения. Гемиглобинцианидный метод рекомендован Международным комитетом по стандартизации в гематологии Всемирной Организации Здравоохранения и используется в мировой практике более 30 лет.

В гематологических анализаторах к методам определения гемоглобина предъявляется ряд специфических требований. Во-первых, время реакции должно быть в десятки раз меньше для обеспечения высокой производительности анализаторов. Во-вторых, для оптимизации конструкции анализаторов гемоглобин должен измеряться в том же гемолизате, который используется для подсчета лейкоцитов, и, следовательно, компоненты, обеспечивающие гемоглобиновую реакцию, не должны негативно влиять на подсчет лейкоцитов.

Многие гематологические анализаторы измеряют концентрацию гемоглобина модифицированным гемиглобинцианидным методом. Высокая скорость реакции достигается путем быстрого лизиса эритроцитов,

+3

денатурирования и окисления гемоглобина до Fe с помощью поверхностно-активных веществ. Последующая реакция с цианидом формирует устойчивую форму со спектром поглощения, похожим на спектр гемиглобинцианида в методе Драбкина, и максимумом поглощения около 545 нм. Достоинством метода является его простота, высокая скорость реакции и стабильность конечного продукта. Применение циановых методов в гематологических автоанализаторах имеет два существенных недостатка, связанных с тем, что цианид из флаконов постепенно выпаривается в виде синильной кислоты. Во-первых, это может оказывать вредное воздействие на персонал при плохой вентиляции помещения. Во-вторых, это приводит к ухудшению реакции и изменению калибровки по гемоглобину через 2 - 3 месяца после подсоединения к прибору флакона с гемолитиком.

Учитывая недостатки модифицированных гемиглобинцианидных методов, в последние годы в большинстве новых моделей гематологических анализаторов используются бесциановые методы. Одной из первых бесциановый SLS (натрий лаурил сульфат)-метод использовала фирма Sysmex. Этот метод оказался не совместимым с определением лейкоцитов в одном канале, для его реализации используется дополнительный реагент и канал измерения.

В других современных бесциановых методах используются компоненты гемихромной реакции, которые совместимы с подсчетом лейкоцитов и их дифференциацией на три популяции. Высокая скорость реакции достигается путем быстрого лизиса эритроцитов,

+3

денатурирования и окисления гемоглобина до Fe с помощью окислителей в присутствии поверхностно-активных веществ. При этом в качестве лигандов атомов железа гема используются отличные от цианида вещества.

Оптимальной областью фотометрирования является максимум спектральной кривой поглощения. Для гемиглобинцианида - это 540 нм (рис. 27 - не приводится), которая и есть рабочая длина волны для этого метода. Измерение в максимуме кривой, где смягчаются требования к точности установки длины волны, снижает требования к точности изготовления и стабильности оптических фильтров. Максимум кривой поглощения гемихрома находится на длине волны 533 нм. Однако измерение на этой длине волны возможно только в спектрофотометрах. В фотометрических ячейках гематологических анализаторов, как правило, применяются полосовые светофильтры с типовыми длинами волн. Ближайшая к 533 нм типовая длина волны 540 нм, на которой и проводится фотометрирование с учетом коэффициента пересчета для 540 нм. При переходе с цианового на бесциановый метод, как правило, требуется корректировка калибровки гемоглобина в пределах 0 - 5%.

Качество результатов исследования крови на гематологическом анализаторе определяется следующими факторами:

- точностью дозирования цельной или разведенной крови;

- точностью дозирования изотонического раствора при проведении процедуры разведения крови;
- точностью определения объема суспензии, пропущенного через датчики подсчета клеток;
- точностью самого подсчета клеток;
- точностью определения размеров клеток;
- корректностью математических методов обработки первичных результатов измерений.

Во избежание случаев несовместимости реагентов следует использовать изотонический раствор и гемолитик от одного изготовителя. При смене реагентов одного производителя на реагенты другого производителя необходимо проверить калибровку анализатора по контрольной крови, обращая особое внимание на Hb и CV НСТ, и при необходимости нужно делать перекалибровку этих показателей. Калибровка других показателей, как правило, не меняется.

При эксплуатации гематологических анализаторов важную роль играет качество электрической сети и заземления. Внезапное отключение электропитания приводит к сбоям в работе приборов и необходимости вмешательства инженеров сервисной службы. В том случае, если электрическое питание пропадает в момент забора пробы или анализа и появляется спустя несколько часов (5 - 20 ч), последствия могут оказаться значительно более серьезными - может выйти из строя гидравлика, засориться сгустками крови капиллярные трубки, апертура и т.д. Поэтому прибор должен работать с источником бесперебойного питания, который должен обеспечить возможность окончания анализа и промывку прибора, т.е. работу прибора в течение нескольких минут.

Периодически необходима калибровка по стандартным материалам, так как электронные и механические компоненты прибора, датчиков, насосов и т.д. со временем подвергаются старению и меняют свои технические параметры. Для осуществления калибровки необходимо пользоваться только качественными контрольными материалами

Важно

Гематологические анализаторы очень чувствительны к длительным отключениям и перебоям в работе, что связано с подсыханием шлангов, проростом микрофлоры, кристаллизацией из растворов. При длительной остановке (на период отпуска, переезда или отсутствия реагентов) обязательным является заполнение шлангов консервирующими растворами с последующей многократной отмывкой от них.

Общее правило - не прерывать работу гематологического анализатора на длительный срок.

Автоматизированные гематологические анализаторы,  
поставляемые в КД в рамках Приоритетного национального  
проекта " доровье"

Для оснащения клиничко-диагностических лабораторий поликлиник предпочтение отдано автоматизированным гематологическим анализаторам, работа которых основана на кондуктометрическом методе, который позволяет получить до 18 параметров крови с определением трех популяций лейкоцитов (лимфоциты, клетки средних размеров, гранулоциты).

При использовании такого анализатора определяют

#### Эритроцитарные параметры

- RBC (количество эритроцитов)
- H B (концентрация гемоглобина)
- НСТ (гематокрит)
- CV (средний объем эритроцита)
- CH (среднее содержание гемоглобина в эритроците)
- СНС (средняя концентрация гемоглобина в эритроците)
- RD (ширина распределения эритроцитов по объему)

#### Тромбоцитарные параметры

- Т (количество тромбоцитов)
- V (средний объем тромбоцита)

- PCT (тромбокрит)
- PD (ширина распределения тромбоцитов по объему)

#### ейкоцитарные параметры

- ВС (количество лейкоцитов)
- (гранулоциты, % и - относительное и абсолютное количество)
- L (лимфоциты, % и - относительное и абсолютное количество)
- MO (моноциты, % и - относительное и абсолютное количество)

истограммы (распределение клеток по объему)

- Эритроцитарная
- Тромбоцитарная
- ейкоцитарная.

Автоматизированный гематологический анализатор ME -6400 /

Прибор производства фирмы i o o e Corpora io , пония, определяет 18 параметров крови (рис. 28 - не приводится).

В приборе существует пять режимов разведения: нормальный, режим низкого, высокого и очень высокого разведения, режим предварительного разведения.

В нормальном режиме разведения измеряется образец объемом 30 мкл.

Для режимов измерения крови с предварительным разведением можно указать объем исследуемой крови (10 или 20 мкл). Этот режим удобен при работе с малым объемом крови, особенно у детей и пожилых людей.

При наличии лейкоцитоза образец крови может быть измерен в режиме высокого или более высокого разведения. В режиме высокого разведения образец крови объемом 10 мкл разводится втрое больше обычной пропорции разведения. В режиме более высокого разведения 5 мкл образца крови разводится в пропорции, в шесть раз большей обычной пропорции разведения.

В случаях низкого содержания в крови лейкоцитов и тромбоцитов образец измеряется в режиме низкого разведения, при котором 55 мкл крови разводится в пропорции, вдвое меньшей обычной пропорции. Пересчет с высоким/низким разведением недоступен для образцов в режиме предварительного разведения.

В анализаторе предусмотрено два типа автоматического пересчета клеток крови - при наличии сигналов тревоги ( флагов ) и при тромбоцитопении. При этом автоматически производится двойной подсчет образца крови, выводятся и сохраняются средние значения исследуемых параметров. В случае серьезных отклонений (более 10%) между показаниями двух подсчетов автоматически выполняется третий и используется среднее значение двух самых близких по значениям подсчетов. При тромбоцитопении анализатор также автоматически производит пересчет образца, при этом пересчитываются также такие показатели, как ВС, НСТ, PLT, MC , PCT, MCH, MCHC и D . Оператор может самостоятельно установить порог, при котором происходит повторный счет клеток крови (например, 50,000/мкл, либо 100,000/мкл).

Прибор снабжен системой закодированных флагов, которые появляются на экране при наличии отклонений в измерении или изменении гистограмм распределения клеток. Следует внимательно изучить названия флагов, т.к. они помогают определить возможные причины их появления. Помимо количественных характеристик клеток крови в анализаторе отображается распределение клеток по объему в виде гистограмм, анализ которых имеет диагностическое значение.

Время исследования крови в закрытом режиме - примерно 90 сек./образец (от начала измерения до вывода данных), в открытом режиме - 60 сек.

Таблица 2

Измеренные параметры	Диапазон измерений	Воспроизводимость образца венозной крови (CV – коэффициент вариации)
WBC: количество лейкоцитов	От 0 до 59 x 3 10 /мкл <*>	CV до 2,0% (для WBC в пределах 4,0 – 9,0 x 3 10 /мкл)
LY%: процентное содержание лимфоцитов	0 – 99,9%	CV до 5,0% (для LY% в пределах 20 – 45%)
MO%: процентное содержание моноцитов	0 – 99,9%	CV до 12,0% (для MO% в пределах 2 – 10%)
GR%: процентное содержание гранулоцитов	0 – 99,9%	CV до 5,0% (для GR% в пределах 40 – 70%)
LY: число лимфоцитов	От 0 до 59 x 3 10 /мкл <*>	
MO: число моноцитов	От 0 до 59 x 3 10 /мкл <*>	
GR: число гранулоцитов	От 0 до 59 x 3 10 /мкл <*>	
RBC: количество эритроцитов	От 0 до 14,9 x 6 10 /мкл	CV < 1,5% 6 (5,0 x 10 /мкл)
HGB: концентрация гемоглобина	0 – 29,9 г/дл	CV < 1,5% (HGB < 16 г/дл)
HCT: гематокрит	0 – 99,9%	
MCV: средний объем эритроцита	20 – 199 фл	CV < 1,0% (MCV в пределах 70 – 120 фл)
MCH: среднее количество гемоглобина в эритроците	10 – 50 пг	
MCHC: средняя концентрация гемоглобина в эритроците	10 – 50 г/дл	
RDW: ширина распределения эритроцитов по объему	0 – 50%	
PLT: количество тромбоцитов	0 – 1490 x 3 10 /мкл	CV < 4,0% 3 (PLT > 3,0 x 10 /мкл)
PCT: тромбокрит	0 – 2,9%	
MPV: средний объем тромбоцитов	0 – 20,0 фл	
PDW: ширина распределения тромбоцитов по объему	0 – 50%	

-----  
 <\*> В случае пересчета при критическом значении:  $0 - 599 \times 10^3$  /мкл.

Гематологический анализатор E-6400 сохраняет в памяти данные подсчета 400 образцов крови и гистограммы последних 50 образцов. Результаты гематологического исследования могут быть автоматически распечатаны на принтере или переданы на персональный компьютер. В анализаторе предлагается несколько автоматических программ контроля качества, полученные данные могут быть выведены и распечатаны в виде таблиц и графиков для каждого исследуемого параметра.

#### Гематологический анализатор ADVIA 60

Прибор, поставляемый фирмой BA ER, - автоматический гематологический анализатор с возможностью исследований цельной крови по 18 параметрам с производительностью до 60 проб в час (рис. 2 - не приводится). Прибор позволяет проводить дифференцирование популяции лейкоцитов по трем группам в процентном и абсолютном значениях.

Малый объем цельной крови, требуемый для анализа (10 мкл), делает прибор удобным для работы с детьми, так как позволяет провести процедуру отбора крови наименее травматично и наиболее точно с использованием капилляров и микропробирок с антикоагулянтом (ЭДТА).

Реагенты упакованы в герметичные пакеты с клапанами, объединенные в единый картридж (Titease), что препятствует взаимодействию с атмосферным воздухом, защищает реагенты от повреждений и загрязнений, сохраняет стабильность (рис. 3 - не приводится). За один цикл измерения прибор выполняет до 10 подсчетов клеток для обеспечения необходимой точности исследования пробы. Прибор обеспечивает высокую стабильность калибровки до нескольких месяцев.

Таблица

ТОЧНОСТЬ И ИНТЕРВАЛЫ ТОЧНОСТИ ОСНОВНЫХ ПАРАМЕТРОВ  
 АНАЛИЗА КРОВИ ADVIA 60

Параметр	Точность (CV)	Диапазон линейности (с пределом отклонения)	Перенос пробы
WBC	< 2,5% при $10 \times 10^9$ /л	От 0,5 до $80 \times 10^9$ /л: 3%	< 0,5%
RBC	< 2% при $5 \times 10^{12}$ /л	От 0,2 до $7,5 \times 10^{12}$ /л: 2%	< 0,5%
Hb	< 1,5% при 15 г/дл	От 2,5 до 23 г/дл: 2%	< 0,5%
HCT	< 2% при 45%	От 11,6 до 55%: 3%	
PLT	< 5% при $300 \times 10^9$ /л	От 10 до $1,000 \times 10^9$ /л: 6%	< 0,5%
Лимфоциты	< 5% при 40%		
Моноциты	< 10% при 10%		
Гранулоциты	< 5% при 50%		

ADVIA 60 имеет возможность хранения данных калибровки, контроля качества исследований и результатов исследований крови пациентов. Печатаются результаты анализов с гистограммами и карты контроля качества производится на стандартном внешнем матричном принтере. Имеется возможность отображения флагов патологических образцов и ошибок счета, а также ввода и распечатки лабораторных норм.

Прибор ADVIA 60 долгое время присутствует на рынке лабораторного оборудования под

маркой разных производителей, он зарекомендовал себя как надежный, простой в обращении и обслуживании анализатор, подходящий для разных клинико-диагностических лабораторий в качестве основного или дополнительного гематологического анализатора.

#### Гематологический анализатор COULTER Ac T

Гематологический анализатор COULTER (R) Ac\*<sup>TM</sup> diff (фирма Beckman Coulter, Франция) – надежная, простая в эксплуатации система, оптимальная для лабораторий с небольшим и средним объемом исследований.

Данная модель автоматического гематологического анализатора обеспечивает исследование крови по 18 параметрам, включая дифференцировку лейкоцитарной формулы по трем основным популяциям (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) и получение гистограмм распределения по размерам клеток для эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов.

Рис. 31. Гематологический анализатор COULTER (R) Ac\*<sup>TM</sup> diff .

изображение не приводится.

#### Применяемые технологии и методы исследования

- метод Култера для подсчета и определения размеров клеток;
- Трехкратный подсчет каждого образца;
- запатентованный метод "S EE O" (уносящего потока) для предотвращения повторного счета клеток при анализе образца;
- Непрерывный автоматический мониторинг состояния апертур;
- Продленный по времени счет тромбоцитов в случае их низкой концентрации в образце.

Простое и удобное управление анализатором, использование интернациональных символов при выборе режимов исследования позволяют работать на данной системе операторам с разным уровнем подготовки. Автоматическая очистка иглы пробоотборника, система автоматической промывки, мониторинг состояния апертур, отсутствие необходимости в ежедневном обслуживании обеспечивают повышенную надежность работы системы и уровень безопасности для оператора, гарантируют точность получаемых результатов.

#### Система реагентов

Для анализатора предлагается полностью готовая к использованию система реагентов компании Beckman Coulter Inc. di Ac T ak (изотонический и лизирующий раствор) и Ac T RI SE (раствор для промывки системы). К набору реагентов di Ac T ak прилагается специальная программная карта, которая используется при инициации новой упаковки реагентов и может быть использована для хранения контрольных данных.

Для мобильных лабораторий компания Beckman Coulter предлагает специальный набор реагентов di Ac T Tainer, который включает все необходимые компоненты - изотонический, лизирующий и промывающий раствор.

Рис. 32. Реагенты для гематологического анализатора  
COULTER (R) Ac\*<sup>TM</sup> diff .

изображение не приводится.

Для проведения контрольных испытаний компанией предлагаются два типа контрольных реагентов - 4C Plus Cell Control и 4C ES Cell Control.

#### Система управления данными

- Автоматическое или ручное присвоение цифрового кода пациенту.
- Три определяемых пользователем диапазона нормальных значений для анализа разных групп пациентов.



- хранение в памяти прибора результатов анализов до 250 образцов.
- хранение данных контроля качества по трем уровням контрольных образцов.
- Графики еви Дженнинга.

Линейность		
Параметры	Диапазон линейности	Ошибка
WBC	$0,0 - 99,9 \times 10^3$ клеток/мкл	+/- 0,3 или +/- 5,0%
RBC	$0,0 - 7,00 \times 10^6$ клеток/мкл	+/- 0,05 или +/- 5,0%
Hgb	0,0 - 25,0 г/дл	+/- 0,2 или +/- 3,0%
Plt	$0,0 - 999 \times 10^3$ клеток/мкл	+/- 10 или +/- 10,0%
Указанный диапазон линейности сохраняется при использовании стабилизированных образцов и отсутствии интерференции		
Точность		
Параметры	Диапазон	% CV
WBC	$6,0 - 15,0 \times 10^3$ клеток/мкл	< 3,0
RBC	$3,00 - 6,00 \times 10^6$ клеток/мкл	< 3,0
Hgb	12,0 - 18,0 г/дл	< 2,0
MCV	80,0 - 100,0 фл	< 3,0
Plt	$200 - 500 \times 10^3$ клеток/мкл	< 7,0
MPV	5,0 - 20 фл	< 3,0
RDW	12,0 - 15,0%	< 3,0
LY	20 - 50%	< 1,5 (S.D)
MO	2,0 - 10%	< 1,5 (S.D)
GR	30,0 - 70,0%	< 3,0 (S.D)

Представленные данные основаны на результатах 1 повтора одного образца.

Гемоглобинометр фотометрический портативный " иниГ "

ис. . Гемоглобинометр фотометрический портативный для измерения общего гемоглобина в крови гемиглобинцианидным методом АГФ-0 540-" иниГ ", торговая марка " иниГ 540".

исунок не приводится.

Гемоглобинометр иниГ 540 представляет собой специализированный фотометр, предназначенный для определения общего гемоглобина крови гемиглобинцианидным методом с фотометрированием на длине волны 540 нм.

Диапазон измеряемой прибором оптической плотности составляет от 0 до 0, что соответствует концентрации общего гемоглобина крови от 0 до 60 г/л. В приборе используется стандартная пробоподготовка - 20 микролитров крови, разведение 1:250. Суммарная погрешность определения гемоглобина (с учетом погрешностей дозаторов и погрешностей биохимического метода), полученная при сравнительных медицинских испытаниях, не превышает 2% (коэффициент вариации) во всем диапазоне измеряемых концентраций. При этом собственная погрешность гемоглобинометра как фотометра - не более 1%, а воспроизводимость, оцененная по коэффициенту вариации, - не более 0,25%.

Гемоглобинометр иниГ 540 является средством измерения медицинского назначения. Он проходит первичную поверку при выпуске с завода-производителя, которую производит Ростест-Москва. Поверка прибора в эксплуатации осуществляется по инструкции, утвержденной ВНИИОФИ в феврале 2005 года.

Главной отличительной особенностью гемоглобинометра иниГ 540 является то, что он не требует периодических калибровок, сохраняет заводскую калибровку неограниченно долго, в том числе при отключении питания.

Два фактора обеспечивают это качество прибора

1. Высокая воспроизводимость характеристик раствора гемиглобинцианида, который сохраняет свои свойства при надлежащем хранении долгие годы, в том числе коэффициента пересчета оптической плотности в концентрацию гемоглобина (или фактора калибровки).

2. Конструкция гемоглобинометра иниГ 540 обеспечивает высокую надежность фотометрических параметров прибора. иниГ 540 снабжен функцией саморегулирования, он обладает многолетней стабильностью измерений.

Другая отличительная особенность гемоглобинометра - полностью автоматизированная процедура фотометрирования.

Для определения гемоглобина достаточно опустить кювету с фотометрической пробой в прибор, и через мгновение на дисплее отобразится значение концентрации. Пересчет оптической плотности раствора в концентрацию производится автоматически. Перед измерением прибор не нужно включать, "прогревать", подстраивать или калибровать. Гемоглобинометр автоматически выключится при вынимании кюветы до следующего измерения.

Третья особенность гемоглобинометра иниГ 540 - его портативность и низкое энергопотребление.

Корпус прибора, выполненный из светлого химически стойкого пластика, имеет размеры 180 x 128 x 40 мм. Масса прибора без батарей не превышает 100 граммов. Питание от сети через адаптер или от встроенных батарей. Срок батарей - 100000 измерений или 4 года работы.

Для контроля работоспособности гемоглобинометра используется контрольная стеклянная мера, паспортизованная для каждого прибора.

Внутрилабораторный и внешний контроль качества может проводиться с помощью обычных контрольных материалов - контрольных растворов гемоглобина.

Методика измерений

1) Подготовить пробирки, поместив в каждую из них по 5 мл трансформирующего раствора (раствор Драбкина).

2) Во время взятия крови в каждую пробирку перенести по 20 мкл капиллярной крови и тщательно перемешать раствор.

Через 20 минут (время лизирования) провести серию измерений. Для этого

а) перелить в оптическую кювету реакционную смесь из очередной пробирки;

б) опустить оптическую кювету в фотометрическую ячейку прибора, при этом автоматически произойдет фотометрирование реакционной смеси, сопровождаемое звуковым сигналом, и на индикаторе появится число, соответствующее концентрации гемоглобина.

4) аписать результат измерения.

Основные параметры автоматизированного анализа крови и факторы, влияющие на их значения

Гематологические анализаторы позволяют не только автоматизировать процесс подсчета клеток крови, повысить производительность труда в лабораториях, улучшить качество и точность измерения, но и получить дополнительные, высоко информативные характеристики клеток крови. Для правильной их интерпретации специалисты клинической лабораторной диагностики, а также врачи других специальностей должны иметь представление о нормальном кроветворении, знать клиническую симптоматику различных заболеваний и патологических процессов, возможные причины, приводящие к отклонениям в гемограмме, ориентироваться в системе расстановки флагов, имеющейся в каждом анализаторе, гистограммах и скатерограммах. При анализе гемограммы следует учитывать возможные причины ложных результатов. Только в этом случае можно профессионально прокомментировать и при необходимости помочь клиницистам в интерпретации полученных результатов исследования крови.

Любые изменения общего анализа крови трактуются как патологические и требуют тщательного обследования пациента. Изменения в гемограмме при многих заболеваниях могут иметь неспецифический характер. В этих случаях их используют для динамического наблюдения за больным, а также по ним ориентируются при прогнозировании исходов заболевания. При системных заболеваниях кроветворной системы исследование общего анализа крови приобретает первостепенное диагностическое значение. Оно определяет дальнейшую стратегию обследования пациента с последующим выбором схемы лечения и необходимо для мониторинга проводимой терапии.

В гематологических анализаторах различных фирм-производителей нормальные показатели крови могут существенно варьировать в зависимости от норм, используемых в той или иной стране. Следуя инструкции прибора, перед началом работы на анализаторе рекомендуется изменить их в соответствии с нормами, принятыми в нашей стране (таблица ).

Таблица

Нормальные показатели периферической крови у взрослых		
Показатель	Нормальные значения	
	мужчины	женщины
Гемоглобин, г/л	130,0 - 160,0	120,0 - 140,0
Эритроциты (RBC) $\times 10^{12}$ /л	4,0 - 5,0	3,9 - 4,7
Гематокрит, %	40 - 48	36 - 42
Средний объем эритроцита (MCV), фл, куб. мкм	80,0 - 100,0	
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	27,0 - 31,0	
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), г/дл (%)	30,0 - 38,0	
Ширина распределения RBC по объему (RDW - CV) (%)	11,5 - 14,5	
Ретикулоциты, промилле (%)	2,0 - 10,0 промилле	

	(0,2 - 1,2%)
9 Лейкоциты x 10 /л	4,0 - 9,0
9 нейтрофилы, % (10 /л): палочкоядерные сегментоядерные	1,0 - 6,0 (0,040 - 0,300) 47,0 - 72,0 (2,000 - 5,500)
эозинофилы	0,5 - 5,0 (0,020 - 0,300)
базофилы	0 - 1,0 (0 - 0,065)
лимфоциты	19,0 - 37,0 (1,200 - 3,000)
моноциты	3,0 - 11,0 (0,090 - 0,600)
плазматические клетки	-
9 Тромбоциты (10 /л)	180,0 - 320,0
Средний объем тромбоцита (MPV), фл	7,4 - 10,4
Ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW), %	10 - 20
Тромбокрит (PCT), %	0,15 - 0,40
СОЭ, мм/час	2,0 - 10,0      2,0 - 15,0

#### Эритроцитарные параметры

RBC (red blood cells) - количество эритроцитов крови  
12

(x 10 /л). Определение количества эритроцитов осуществляется путем вычитания из общего числа клеток в цельной крови тромбоцитов и лейкоцитов. Для исключения из счета тромбоцитов, которые имеют существенно меньшие размеры по сравнению с эритроцитами и лейкоцитами, используются пороговые значения. Считаются все частицы размером более 36 фл. Лейкоциты считаются в лизате после разрушения эритроцитов. Коэффициент вариации для данного параметра составляет 1 - 2%, а в некоторых приборах - менее 1%. Следует отметить, что иногда лейкоциты включаются в подсчет вместе с эритроцитами, так как их влияние в норме незначительно. Их количество на 3 порядка (несколько тысяч) существенно меньше числа эритроцитов (несколько миллионов). В случаях гиперлейкоцитоза при таком способе ошибка измерения эритроцитов возрастает (таблица 4).

Таблица 4

Возможные ошибки измерения эритроцитов	
Ложное повышение	Ложное понижение
<ul style="list-style-type: none"> <li>- гигантские тромбоциты (с объемом более 30 фл)</li> <li>- криоглобулинемия</li> <li>- высокий лейкоцитоз</li> </ul> <p>9 (более 50 x 10 /л)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- агглютинация эритроцитов</li> <li>- выраженный микроцитоз эритроцитов</li> <li>- гемолизированные образцы крови</li> </ul>

Присутствие криоглобулинов может вызвать увеличение ВС, RBC или Т и концентрации Н В. В таких случаях следует прогреть образец крови до °С в течение 0 минут и немедленно провести измерение. Криоглобулинемия может наблюдаться у больных миеломой, макроглобулинемией Вальденстрема, злокачественными новообразованиями, лейкозом, лимфопролиферативными и аутоиммунными заболеваниями, вирусным гепатитом, сахарным диабетом.

Агглютинация эритроцитов может привести к занижению показателей RBC, увеличению CV. Это можно проверить по повышенным значениям CH и CHC

Нормобласты ( RBC) - большинство гематологических анализаторов подсчитывает все ядродержащие клетки, поэтому при наличии нормобластов в периферической крови они определяются как лейкоциты и могут быть причиной увеличения ВС и лимфоцитов, т.к. нормобласты имеют размер малого лимфоцита. В этих случаях необходим строгий визуальный контроль и коррекция истинного количества лейкоцитов.

Например: Общее количество лейкоцитов при подсчете в анализаторе -  $45 \times 10^9$  /л. В лейкоцитарной формуле на 100 лейкоцитов имеется 50 нормобластов. Рассчитываем истинное количество лейкоцитов в крови:

150 клеток (общее количество лейкоцитов и нормобластов, полученное при подсчете лейкоцитарной формулы) -  $45 \times 10^9$  /л (количество клеток в 1 мкл, полученное при подсчете в камере или на анализаторе)

100 клеток (лейкоциты) - X (истинный лейкоцитоз крови)

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

Таким образом, истинное число лейкоцитов в крови составляет  $30 \times 10^9$  /л.

В анализаторах фирмы Sys ex ( E-2100, T-2000i) и Bayer (ADVIA 2120) при наличии нормобластов в крови коррекция лейкоцитов проводится автоматически. Следует отметить, что порог чувствительности определения нормобластов в анализаторе Sys ex E-2100 составляет менее 20 мкл, что с помощью микроскопического исследования определить представляется невозможным.

Нормобласты появляются в периферической крови при онкогематологических заболеваниях, анемиях (гемолитические, В - и 12 фолиеводефицитные), тяжелых септических состояниях и интоксикациях. Появление нормобластов в послеоперационном периоде является плохим прогностическим признаком, предсказывающим возможный летальный исход. Наличие в крови нормобластов может расцениваться как маркер гипоксии и воспаления.

Н В ( e o lobin) - концентрация гемоглобина (г дл или г л) в большинстве гематологических анализаторов определяется фотометрически гемиглобинцианидным или гемихромными методами. Коэффициент вариации при этом не превышает 2%.

Таблица 5

Возможные ошибки измерения гемоглобина	
Ложное повышение	Ложное понижение

<ul style="list-style-type: none"> <li>- высокий лейкоцитоз 9 (более 50 x 10 /л)</li> <li>- присутствие нестабильных гемоглобинов (HbS, HbC)</li> <li>- гиперлипидемия</li> <li>- гипербилирубинемия</li> <li>- криоглобулинемия</li> <li>- гемолиз (in vivo)</li> <li>- парапротеинемия</li> <li>- резистентные к лизису эритроциты</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- образование микростушков в пробе крови</li> </ul>
---	--

Основные причины завышения результатов определения гемоглобина обусловлены мутностью образца крови, которая может быть следствием:

- Гиперлипидемии и гипербилирубинемии, приема жирной пищи. Различное влияние липидемии на определение гемоглобина в приборах связано с техническими особенностями, а не с методологией. Величина результирующей ошибки сильно зависит от оптической системы прибора: размера выходного отверстия из кюветы для образцов и расстояния до фотодиода.

В общих случаях измерение HGB на анализаторах уступает по точности определению гемоглобина ручным методом. Наиболее надежные результаты определения концентрации гемоглобина гемиглобинцианидным методом могут быть получены на спектрофотометре или фотометре при добавлении в холостую пробу 20 мкл сыворотки крови больного.

- Присутствия нелизированных эритроцитов.

- Гиперлейкоцитоза. Для снижения ошибки измерения рекомендуется обработать кровь лизатом, отцентрифугировать образец и провести измерение гемоглобина в надосадочной жидкости фотометрическим методом.

В зависимости от концентрации гемоглобина выделяют три степени тяжести анемии: легкую (HGB > 90 г/л), среднюю (HGB 70 - 90 г/л), тяжелую (HGB < 70 г/л).

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

Снижение концентрации гемоглобина имеет место при анемиях, гипергидратации.

НСТ (hematocrit) - гематокрит. Показатель отражает сумму прямо измеренных объемов эритроцитов в единице объема крови. Проблемы "остаточной" плазмы (плазмы, оставшейся между эритроцитами при центрифугировании) в гематологических анализаторах по сравнению с гематокритной центрифугой не существует. Коэффициент вариации для автоматического метода - менее 1% в сравнении с 1 - 2% при определении показателя методом центрифугирования.

Таблица 6

Возможные ошибки измерения гематокрита	
Ложное повышение	Ложное понижение
<ul style="list-style-type: none"> <li>- гигантские тромбоциты (с объемом более 30 фл)</li> <li>- криоглобулинемия</li> <li>- высокий лейкоцитоз 9 (более 50 x 10 /л)</li> <li>- гипергликемия (&gt; 600 мг/дл)</li> <li>- диабетический кетоацидоз</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- агглютинация эритроцитов</li> <li>- выраженный микроцитоз эритроцитов (&lt; 36 фл)</li> </ul>

Выраженная агглютинация эритроцитов может привести к получению неправильных значений НСТ, т.к. агглютинаты эритроцитов могут восприниматься прибором как лейкоциты и не

учитываться при расчете гематокрита. В таких случаях рекомендуется определение гематокрита на гематокритной центрифуге.

Повышение гематокрита наблюдается при реактивных и опухолевых эритроцитозах, уменьшении объема циркулирующей плазмы (ожоговая болезнь, дегидратация). Снижение гематокритной величины имеет место при анемиях, беременности (второй триместр), гипергидратации.

При гипергликемии и диабетическом кетоацидозе отмечается гиперосмолярность плазмы крови. При разведении крови *in vitro* изотоническим раствором происходит быстрое набухание эритроцитов, что и вызывает завышение НСТ. В этих случаях определение гематокрита на гематокритной центрифуге является более точным.

Показатели гематокрита и гемоглобина являются важными параметрами общего состояния здоровья, повышение которых, например, у спортсменов может свидетельствовать о приеме препаратов, вызывающих экзогенную стимуляцию костного мозга (введение эритропоэтина).

MCV (mean corpuscular volume) – средний объем эритроцита, выражается в кубических микрометрах (куб. мкм) или фемтолитрах

-15  
(1 фл = 1 куб. мкм или  $1 \times 10^{-15}$  /л). MCV определяется большинством гематологических анализаторов благодаря прямой зависимости амплитуды электрического импульса от объема клетки. Вычисляется MCV делением суммы клеточных объемов на число эритроцитов.

В то же время MCV – это средний показатель объема всей популяции эритроцитов, содержащихся в диапазоне от 36 - 360 фл. Поэтому необходимо иметь в виду, что MCV может иметь нормальное значение при наличии у пациента одновременно выраженного макро- и микроцитоза, большом количестве аномальных эритроцитов (например, при серповидно-клеточной анемии, выраженном пойкилоцитозе). В этом случае особую диагностическую важность приобретает анализ эритроцитарной гистограммы и морфология клеток в мазках крови.

При наличии агглютинации эритроцитов прибор воспринимает агрегаты как одну большую клетку, если размер их меньше верхнего порога эритроцитарного канала, что приводит к увеличению MCV. Сохранение крови *in vitro* и измерение таких проб при 37 °С способствует получению правильных результатов.

MCV является важным показателем в дифференциальной диагностике анемий. На основании MCV анемии разделяют на нормоцитарные (MCV 80 - 100 фл), микроцитарные (MCV менее 80 фл) и макроцитарные (MCV более 100 фл).

Таблица 7

Возможные ошибки измерения MCV	
Ложное повышение	Ложное понижение
<ul style="list-style-type: none"> <li>- холодовые агглютинины</li> <li>- диабетический кетоацидоз</li> <li>- гиперосмолярность плазмы</li> <li>- гипернатриемия</li> <li>- высокий лейкоцитоз 9 (более <math>50 \times 10^9</math> /л)</li> <li>- длительное хранение крови (более 8 часов)</li> <li>- ретикулоцитоз</li> <li>- макротромбоцитоз</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- повышенное содержание фрагментов эритроцитов в крови вследствие механического гемолиза</li> <li>- коагулопатия потребления</li> </ul>

MCV – показатель, отражающий изменения, возникающие в эритроцитах при длительном хранении крови. Изменения в мембране эритроцитов возникают раньше, чем в лейкоцитах и тромбоцитах, поэтому хранение крови более 8 часов вызывает увеличение MCV.

MCV меняется в течение жизни: у новорожденных достигает 128 фл, в первую неделю

снижается до 100 - 112 фл, к 1 году составляет 77 - 79 фл, в возрасте 4 - 3 лет нижняя граница нормы (80 фл) стабилизируется.

MCH (mean corpuscular hemoglobin) - среднее содержание гемоглобина в эритроците (пг). Рассчитывается по формуле:

$$\text{MCH} = \frac{\text{Гемоглобин (г/л)}}{\text{Количество эритроцитов} \times 10^{12}}.$$

MCH характеризует среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците в абсолютных единицах. В норме MCH составляет 27 - 31 пг. MCH - более объективный параметр, чем устаревший цветовой показатель, который не отражает синтез гемоглобина и его содержание в эритроците.

Возможные ошибки измерения. Параметр MCH является расчетным, поэтому к ложно повышенным результатам приводят все факторы, влияющие на увеличение значений гемоглобина и снижение количества эритроцитов. Ложно пониженные результаты MCH получаются вследствие ошибок, связанных с неправильным определением числа эритроцитов (завышения их количества) и занижением концентрации гемоглобина.

Изменения MCH лежат в основе разделения анемий на нормохромные (MCH - 27 - 31 пг), гипохромные (MCH менее 27 пг) и гиперхромные (MCH более 31 пг). Снижение MCH наблюдается при анемиях, обусловленных нарушением синтеза гемоглобина (железодефицитной анемии, порфирии), повышение - при макроцитарных и, особенно, мегалобластных анемиях.

MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration) - средняя концентрация гемоглобина в эритроците (г/дл). Вычисляется по формуле:

$$\text{MCHC} = \frac{\text{Гемоглобин (г/дл)}}{\text{Гематокрит (\%)}} \times 100 \text{ (г/дл)}.$$

Различия между двумя последними индексами заключаются в том, что MCH указывает на массу гемоглобина в одном эритроците и выражается в долях грамма (пикограммах). MCHC показывает концентрацию гемоглобина в одном эритроците, т.е. соотношение содержания гемоглобина к объему клетки. Он отражает насыщение эритроцита гемоглобином. В норме MCHC составляет 30 - 38 г/дл. В отличие от MCH MCHC не зависит от клеточного объема и является чувствительным показателем нарушения процессов гемоглобинообразования.

Возможные ошибки измерения. Поскольку параметр MCHC является расчетным, то к ложно завышенным результатам приводят все факторы, влияющие на завышение значений гемоглобина и занижение гематокрита (последний связан с измерением объема эритроцитов). Ложно пониженные результаты MCHC получаются вследствие неправильного определения MCV (завышения их значения) и занижения концентрации гемоглобина.

Снижение значения MCHC наблюдается при заболеваниях, сопровождающихся нарушением синтеза гемоглобина.

Повышение MCHC выше 38 г/дл встречается редко (врожденный сфероцитоз), т.к. это может закончиться кристаллизацией гемоглобина и гемолизом эритроцита. Чаще всего увеличение MCHC свидетельствует об ошибках, допущенных при измерении пробы (погрешности определения гемоглобина или MCV). Поэтому данный параметр часто используется в качестве индикатора ошибок, допущенных на аналитическом или преаналитическом этапах работы.

Анализаторы серии "Technicon" непосредственно измеряют концентрацию гемоглобина в каждом отдельном эритроците и строят гистограммы распределения клеток не только по объему, но и по концентрации гемоглобина. При этом возрастает точность определения этого параметра и вводится новый показатель - ширина распределения эритроцитов по концентрации гемоглобина (HDW - hemoglobin distribution width), который характеризует гетерогенность эритроцитарного пула.

LHD (low hemoglobin density), % - гемоглобин низкой плотности - новый параметр, который



коррелирует с процентом гипохромных эритроцитов. При наличии более 10% гипохромных эритроцитов показатель LHD > 5,5%.

Показатель LHD является индикатором железодефицитного состояния.

Нуро% - процент гипохромных эритроцитов, имеет значение в диагностике гипохромных анемий и мониторинге терапии эритропоэтином. Более 10% гипохромных эритроцитов является индикатором железодефицитного состояния.

RDW (red cell distribution width) - показатель гетерогенности эритроцитов по объему, характеризует степень анизоцитоза. Этот показатель вычисляется большинством современных гематологических анализаторов на основании гистограммы распределения эритроцитов как коэффициент вариации объема эритроцитов:

$$\text{RDW-CV (\%)} = \frac{\text{SD}}{\text{MCV}} \times 100,$$

где SD - стандартное среднеквадратическое отклонение объема эритроцита от среднего значения. На этот показатель влияет MCV, поэтому как при микроцитозе, так и при макроцитозе отмечается тенденция к увеличению RDW-CV.

Рис. 34. Схематическое изображение распределения эритроцитов по объему (MCV), на основании которого рассчитывается показатель анизоцита (RDW).

Рисунок не приводится.

В гематологических анализаторах фирмы Sysmex имеется еще один расчетный показатель RDW - это RDW-SD, который независим от MCV и представляет собой прямое измерение ширины эритроцитарной гистограммы на уровне 20% пика кривой. При этом высота пика RBC-гистограммы принимается за 100%. Норма RDW-SD - 42 +/- 5 фл. Клинически значимое значение RDW-SD > 60 фл.

Рис. 35. Схематическое изображение RDW-SD.

Рисунок не приводится.

Оба показателя RDW определяют вариабельность эритроцитов по объему. Повышение RDW предполагает присутствие смешанной популяции клеток (нормоциты и микроциты или макроциты и нормоциты). RDW-SD является более чувствительным показателем при наличии минорной популяции макроцитов или микроцитов, т.к. он измеряет нижнюю часть кривой распределения эритроцитов по объему. В то же время этот показатель будет изменяться при высоком ретикулоцитозе в силу их большого объема, что расширяет основание кривой распределения эритроцитов. RDW-CV менее чувствителен к присутствию небольшой популяции микроцитов или макроцитов или ретикулоцитов, но лучше отражает общие изменения в размере эритроцитов при макроцитарной или микроцитарной анемии.

Анизоцитоз улавливается прибором значительно быстрее, чем при визуальном просмотре мазка крови, так как прибор измеряет непосредственно объем клеток, а морфолог под микроскопом видит клетку в плоскости и может пропустить начальные изменения объема. Кроме того, оценка степени анизоцитоза под микроскопом сопровождается целым рядом ошибок. При высыхании в мазках диаметр эритроцитов уменьшается на 10 - 20%. В толстых препаратах он меньше, чем в тонких. Показатель RDW характеризует колебания объема клеток внутри популяции и не связан с абсолютной величиной объема эритроцитов. Поэтому при наличии в крови популяции эритроцитов с измененным, но достаточно однородным размером (например, микроциты), значения RDW могут быть в пределах нормы (11,5 - 14,5%). В то же время при выраженном анизоцитозе эритроцитов показатель MCV, характеризующий средний объем всей

клеточной популяции, является нормальным, а RDW будет повышенным. Таким образом, сочетанное использование двух параметров - RDW и MCV - позволяет точнее характеризовать изменения в периферическом звене эритронов.

FRC - (fragment red cells) (RBC-F) - подсчет фрагментов эритроцитов, используется для оценки тромботических микроангиопатий.

Гистограмма - это графическое распределение различных видов клеток по их количеству и объему. Для построения гистограмм гематологические анализаторы подсчитывают миллионы клеток в одном образце, сортируют импульсы по амплитуде и распределяют частицы объемом от 24 до 360 фл по 256 каналам, каждый из которых соответствует объему частиц.

#### Эритроцитарная гистограмма

Как правило, регистрируемая кривая подчиняется закону нормального (гауссова) распределения. Гистограмма должна начинаться и заканчиваться на базовой линии и между нижним и верхним дискриминатором. По горизонтали откладывается объем измеряемой клетки в фл (1 фл = 10<sup>-15</sup> /л), вертикальная ось на графике фиксируется как 100% шкала.

Нормальная эритроцитарная гистограмма имеет симметричную (куполообразную) форму (рис. 36 - не приводится). На некоторых анализаторах при уменьшении количества эритроцитов амплитуда гистограммы уменьшается.

При появлении патологических или нескольких популяций эритроцитов форма гистограммы меняется. Несмотря на то, что пороговое значение для эритроцитов составляет 36 фл, дополнительная область от 24 до 36 фл позволяет выявить клетки небольших размеров. Аномальное распределение эритроцитов представлено на рисунках 37 (не приводится) и 38 (не приводится).

Рис. 39. Эритроцитарная гистограмма имеет несколько пиков (не приводится)

#### Ретикулоцитарные параметры

Ретикулоциты представляют собой незрелые эритроциты, содержащие остатки РНК и образующиеся после потери нормобластами ядер.

В связи с появлением высокотехнологичных гематологических анализаторов стало возможным получать, помимо классических, дополнительные информативные ретикулоцитарные параметры. Аббревиатура ретикулоцитарных показателей в анализаторах различных фирм-производителей различна. В тексте приводятся обозначения, используемые в приборах Sysmex XE-2100, Sysmex XT-2000i, GEN-S.

#### Классические параметры ретикулоцитов

RET% - относительное количество ретикулоцитов (в %);

RET# - абсолютное количество ретикулоцитов ( $\times 10^9$  /л);

Ложное повышение
- включения в эритроцитах (тельца Жолли, малярийные паразиты)
- высокий лейкоцитоз
- аномальные формы гемоглобина
- гипертромбоцитоз
- гигантские тромбоциты

Ретикулоцитоз с резким увеличением фракции незрелых ретикулоцитов на фоне активного эритропоэза отражает повышенную регенераторную способность костного мозга. Сохраняющийся ретикулоцитоз может свидетельствовать о продолжающемся кровотечении.

Ретикулоцитопения - индикатор угнетения эритропоэза. Нормализация абсолютного

количества ретикулоцитов (RET#) - показатель восстановления пролиферативной активности эритрокариоцитов

#### Объемные

MCVr (Mean Cell Volume Reticulocytes) - средний объем ретикулоцитов (фл);

MSRV (Mean Sphered Reticulocyte Volume) - средний объем сферических ретикулоцитов, фл.

- Низкий объем ретикулоцитов объясняет появление микроцитов в периферической крови.

- Объемные показатели ретикулоцитов могут использоваться в диагностике ЖДА, мониторинге ответа на терапию железосодержащими препаратами, фолиевой кислотой, витамином В<sub>12</sub>.

12

- Изменение MSRV у спортсменов указывает на злоупотребление препаратами, стимулирующими эритропоз.

#### Характеризующие степень зрелости ретикулоцитов

LFR% - популяция малых зрелых RET (87 - 99%);

MFR% - популяция средних RET (2 - 12%);

HFR% (1 - 2%) - популяция больших незрелых RET.

MFR+HFR определяется как фракция незрелых ретикулоцитов - IRF (Immature Reticulocyte Fraction) (2 - 14%). Фракция незрелых ретикулоцитов может служить индикатором активности эритропоза.

Увеличение фракции незрелых ретикулоцитов свидетельствует об ускоренном выбросе незрелых клеток из костного мозга. Фракция незрелых ретикулоцитов повышается значительно раньше (как правило, на 2 дня) RET% и может служить наиболее чувствительным маркером в мониторинге за состоянием эритропоэтической активности костного мозга и эффективности лечения витамином В<sub>12</sub>, фолиевой кислотой

12

препаратами железа и ЭПО.

#### Ретикулоцитарные индексы (RPI и CRC)

В случае изменения только гематокрита рассчитывается индекс CRC (Corrected Reticulocyte Count) - скорректированный подсчет ретикулоцитов по формуле:

$$CRC = RET (\%) \times \frac{Ht}{0,45},$$

где:

Ht - гематокрит больного;

RET% - количество ретикулоцитов (%), измеренное в крови при данном гематокрите;

0,45 - идеальный гематокрит.

Если у больного одновременно с низким гематокритом (Ht) в периферической крови присутствуют незрелые ретикулоциты (MFR и HFR), то рассчитывается индекс продукции ретикулоцитов RPI (Reticulocyte production index):

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

Величина RPI широко варьирует в зависимости от степени тяжести анемии, продукции ЭПО и других факторов. Снижение данного индекса менее 2 указывает на низкую пролиферативную активность эритрокариоцитов.

Расчет данных индексов позволяет дать правильную оценку характера эритропоза и, таким образом выбрать адекватную программу лечения больных. На рисунке 40 (не приводится) приведен пример, иллюстрирующий обоснованность расчета индекса продукции ретикулоцитов.

Исследование ретикулоцитов используется для:

- оценки активности эритропоэза при состояниях, сопровождающихся гемолизом или кровопотерей;
  - детекции нарушения регенераторной способности костного мозга при дефиците железа, витаминов В<sub>12</sub>, В<sub>6</sub>, 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).

### Тромбоцитарные параметры

9

PLT (platelet) - количество тромбоцитов ( $\times 10^9$  /л). В отличие от ручного подсчета тромбоцитов, где проводится предварительный лизис эритроцитов, автоматические счетчики крови анализируют тромбоциты и эритроциты без предварительной обработки. Это создает проблему дифференцирования больших форм тромбоцитов (макротромбоцитов) и сравнимых с ними по объему эритроцитов (микроцитов), их фрагментов (шизоцитов), а также фрагментов цитоплазмы лейкоцитов (клеточный дебрис).

Существует несколько механизмов, предупреждающих подсчет одних элементов вместо других. Например, в приборах, использующих кондуктометрический метод, анализируется не только высота электрического импульса, но и его форма. Существует система дискриминаторов, определяющих высоту электрического сигнала, пропорциональную размеру частицы, и ширину (длительность) импульсов. Все импульсы, соответствующие размерам частиц от 1,8 до 30,0 фл, подсчитываются как тромбоциты. Если доля частиц с объемами в области 30 фл превышает запрограммированный порог, то выводится на экран сообщение "Micro RBC", либо "Macro PLT". При этом достоверность определения количества тромбоцитов снижена.

Таблица 8

Возможные ошибки измерения тромбоцитов	
Ложное повышение	Ложное понижение
<ul style="list-style-type: none"> <li>- микроцитоз</li> <li>- криоглобулинемия</li> <li>- гемолизированные образцы крови</li> <li>- наличие фрагментов эритроцитов и лейкоцитов</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- агрегация тромбоцитов</li> <li>- тромбоцитарный "сателлизм" (прилипание тромбоцитов к лейкоцитам) (рис. 41 - не приводится)</li> <li>- гигантские тромбоциты</li> <li>- агглютинация эритроцитов</li> <li>- тромбообразование</li> <li>- взятие крови с гепарином или цитратом</li> <li>- гипертромбоцитоз</li> </ul> <p>9 (более <math>1,000 \times 10^9</math> /л)</p>

При агглютинации или агрегации эритроцитов тромбоциты могут оказаться внутри агрегатов, что приводит к снижению количества PLT. Гипертромбоцитоз (более  $1,000 \times 10^9$  /л) может превышать допустимый порог измерения PLT, что приведет к занижению показателя PLT. Это зависит от пределов линейности конкретного прибора. Гемолизированные образцы крови содержат струму эритроцитов, что приводит к повышению показателей PLT. При взятии

крови с использованием гепарина или цитрата натрия в качестве антикоагулянта отмечается более выраженная агрегация тромбоцитов, что приведет к заниженному значению PLT.

Многие исследователи предлагают использовать только один стандартный антикоагулянт – К ЭДТА в концентрации 1,5 – 2,2 мг на 2

1 мл крови. Однако и это не спасает от появления артефактов. При наличии аутоантител к тромбоцитам ЭДТА индуцирует агрегацию тромбоцитов, что проявляется псевдотромбоцитопенией. Тщательно выполненный подсчет тромбоцитов методом фазово-контрастной микроскопии обычно используется в качестве референсного метода, но и он характеризуется большим коэффициентом вариации – 7 – 23%. Для большинства современных гематологических анализаторов коэффициент вариации подсчета PLT не превышает 2 – 4%.

MPV (mean platelet volume) - средний объем тромбоцитов выражается в фемтолитрах (фл) или куб. мкм. В норме этот показатель варьирует от 7,4 до 10,4 фл и имеет тенденцию к увеличению с возрастом: с 8,6 - 8,9 фл у детей 1 - 5 лет до 9,5 - 10,6 фл у людей старше 70 лет. "Молодые" кровяные пластинки имеют больший объем, поэтому при ускорении тромбоцитопоэза средний объем тромбоцитов возрастает. В течение первых двух часов после взятия крови с ЭДТА происходит набухание тромбоцитов с изменением их объема и соответственно увеличением MPV. При наличии макротромбоцитов порог измерения для тромбоцитов может быть превышен, и они не подсчитываются, что приводит к занижению MPV. Небольшие фрагменты эритроцитов и лейкоцитов могут препятствовать измерению MPV. Тромбоциты могут быть в агглютинах эритроцитов, что приведет к ошибочным результатам MPV. Это можно проверить по аномальным значениям MCH и MCHC.

Увеличение MPV наблюдается при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре, гипертиреозе, атеросклерозе, сахарном диабете, у курильщиков и лиц, страдающих алкоголизмом. Транзиторная макротромбоцитемия 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), % - ширина распределения тромбоцитов по объему. Этот параметр определяется на основании гистограммы распределения тромбоцитов (рис. 42 - не приводится). PDW количественно отражает гетерогенность популяции этих клеток по размерам (степень анизоцитоза тромбоцитов). В норме этот показатель составляет 10 - 20%.

Увеличение PDW может быть признаком присутствия агрегатов тромбоцитов, микроэритроцитов, фрагментов эритроцитов. PDW изменяется при миелопролиферативных заболеваниях.

PCT (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.

MPC - (mean platelet component) - средний тромбоцитарный компонент. Новый параметр в анализаторах серии Advia 120, Advia 2120 характеризует плотность и гранулярность тромбоцитов. Норма -259 +/- 6,6.

MPC коррелирует с активностью тромбоцитарного звена и может использоваться среди других показателей в качестве предвестника острых ишемических осложнений, а также риска развития тромбоза.

#### Тромбоцитарная гистограмма

В норме тромбоцитарная кривая характеризуется унимодальностью и асимметричностью. Нормальная тромбоцитарная гистограмма представлена на рис. 43 (не приводится). Гистограмма

должна начинаться с базовой линии в области значений менее 2 фл и заканчиваться в зоне 20 - 30 фл. Количество тромбоцитов более 20 фл невелико.

Наличие в пробе патологических тромбоцитов (макро- или микро-), шизоцитов, микроэритроцитов, фрагментов лейкоцитов меняет форму тромбоцитарной гистограммы, что требует определенной корректировки получаемых результатов. Примеры измененных тромбоцитарных гистограмм и возможные причины, вызывающие данные изменения, приведены на рис. 44, 45, 46 (рисунки не приводятся).

Анизоцитоз тромбоцитов не влияет на результаты счета тромбоцитов.

Множественные пики на тромбоцитарной гистограмме могут наблюдаться при агрегации тромбоцитов, при этом результат подсчета тромбоцитов может быть ложно занижен. Для исключения ошибочного результата рекомендуется повторить исследование с цитратом натрия, который предотвращает свертывание крови в случае несовместимости образца с ЭДТА.

При выявлении патологической тромбоцитарной гистограммы следует анализировать окрашенный мазок крови.

#### Лейкоцитарные параметры

WBC (white blood cells) - количество лейкоцитов крови  
9

( $\times 10^9$  /л). Измерение лейкоцитов проводится после полного лизиса эритроцитов специальным реагентом. Все частицы размером более 35 фл считаются как лейкоциты. Тромбоциты, размер которых меньше порогового значения 35 фл, исключаются из подсчета. Коэффициент вариации (CV) при автоматическом определении этого показателя составляет 1 - 3%, в то время как при ручном подсчете 6,5 - 15% в зависимости от числа лейкоцитов.

Ошибки подсчета числа лейкоцитов при автоматическом анализе возможны в сторону завышения числа лейкоцитов 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", "Plumb").

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

Следует обращать внимание на изменение формы RBC гистограммы.

Таблица 9

Возможные ошибки измерения лейкоцитов	
Ложное повышение	Ложное понижение
<ul style="list-style-type: none"> <li>- нормобласты в периферической крови</li> <li>- криоглобулинемия</li> <li>- агрегаты тромбоцитов</li> <li>- резистентные к лизису эритроциты</li> <li>- малярия (эритроциты с гаметоцитами распознаются как лейкоциты)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- хранение крови более 24 часов</li> <li>- грубое перемешивание крови</li> </ul>

#### Подсчет лейкоцитарной формулы

Многие современные гематологические анализаторы определяют от 6 до 10 показателей лейкоцитарной формулы с учетом относительного и абсолютного количества клеток, так называемые 3Diff или 5Diff.

Гематологические анализаторы, определяющие 18 параметров крови, дифференцируют все WBC на три популяции (3Diff) и определяют как относительное, так и абсолютное их содержание:

- Лимфоциты, %, - LYM% или LY%;
- Лимфоциты, кл/мкл, - LYM или LY#;
- Гранулоциты, %, - GRN% или GR%;

- Гранулоциты, кл/мкл, - GRN или GR#;
- Моноциты, %, - MON% или MO%;
- Моноциты, кл/мкл, - MON или MO#.

Главным преимуществом автоматического подсчета лейкоцитарной формулы является повышение точности результатов за счет измерения большого количества клеток по сравнению с микроскопическим исследованием. Ограниченное число клеток, анализируемое при подсчете мазка крови, неравномерное распределение лейкоцитов в препарате, использование нестандартных методов подсчета являются главными причинами расхождения результатов обоих методов. В то же время при микроскопическом исследовании врач дифференцирует лейкоциты не только по их размерам, но и оценивает в полном объеме морфологию клетки (ядерно-цитоплазматическое отношение, структуру распределения хроматина и особенности окраски ядра, наличие зернистости в цитоплазме), что позволяет ему с гораздо большей точностью отнести клетку к тому или иному виду лейкоцитов.

Для получения наиболее точных результатов дифференциального анализа лейкоцитов рекомендуется исследование образцов крови проводить в промежутке времени от 30 минут до 5 часов после взятия материала. При использовании предварительного разведения крови - от 5 минут до 1 часа.

На дифференциальный подсчет популяций лейкоцитов влияют те же факторы, что и на общее количество лейкоцитов. Появление "сигналов тревоги" указывает на наличие патологических изменений в исследуемом образце и требует микроскопии окрашенного мазка крови.

Некоторые факторы, влияющие на дифференциальный подсчет лейкоцитов:

LY и LY%: нормобластоз, резистентные к лизису эритроциты (например, эритроциты, содержащие малярийный плазмодий) могут быть причиной ошибочного измерения LY.

MON и MON%: крупные лимфоциты, атипичные лимфоциты, бластные клетки и избыточное количество базофилов могут оказывать влияние на точность подсчета MO.

GRN и GRN%: избыток эозинофилов, метамиелоцитов, промиелоцитов, бластных клеток и плазматических клеток может быть причиной ошибочного подсчета GR и GR%.

#### Лейкоцитарная гистограмма

На лейкоцитарной гистограмме показано распределение клеток по объему после обработки лейкоцитов специальным лизатом и лизиса эритроцитов. Субпопуляции лейкоцитов попадают в три главные области гистограммы распределения WBC, которые отделены с помощью пороговых значений (дискриминаторов) (рис. 47 - не приводится). Если результаты подсчета попадают в область нормальных значений, то никаких маркеров, предупреждающих о возможной патологии, не появляется.

Форма гистограммы изменяется при нарушении распределения лейкоцитов по популяциям или недостаточном лизисе эритроцитов. Некоторые варианты аномального распределения популяций лейкоцитов представлены на рис. 48 - 52 (не приводятся).

Таким образом, гематологические анализаторы позволяют выявлять патологические состояния, однако не способны их дифференцировать. Необходимо учитывать, что 3Diff-анализаторы в некоторых случаях (например, при микроформах бластов) не в состоянии отличить патологические клетки от нормальных клеток и поэтому не могут быть использованы для скрининга нормы. Гематологические анализаторы, дифференцирующие лейкоциты на три популяции (3Diff), могут с успехом использоваться для динамического наблюдения за состоянием крови пациентов.

#### Интерпретация результатов автоматизированного гематологического анализа

Использование эритроцитарных показателей в дифференциальной диагностике анемий  
Анемия - это состояние, характеризующееся снижением концентрации гемоглобина и в большинстве случаев количества эритроцитов и гематокрита в единице объема крови.

Критериями ВОЗ для диагностики анемии считаются:

у мужчин число эритроцитов < 4,0 млн./мкл, Hb < 130 г/л, Ht < 39%;  
у женщин число эритроцитов < 3,8 млн./мкл, Hb < 120 г/л, Ht < 36%;  
у беременных Hb < 110 г/л, Ht < 33%.

Анемии разнообразны по генезу, часто имеют смешанный патогенез. В большинстве случаев анемия - не самостоятельная нозологическая форма, а проявление основного заболевания. Она сопутствует диффузным болезням соединительной ткани (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, системные васкулиты), заболеваниям желудочно-кишечного тракта, печени, почек (хроническая почечная недостаточность), злокачественным новообразованиям, хроническим инфекционным заболеваниям и воспалительным процессам.

На основании эритроцитарных индексов была создана классификация, согласно которой анемии подразделяются на микроцитарные гипохромные, нормоцитарные нормохромные и макроцитарные гиперхромные (рис. 53). Одинаковые по патогенезу анемии могут относиться к различному морфологическому варианту. Так, анемии хронических заболеваний могут быть как нормоцитарными, так и микроцитарными; смешанная железодефицитная анемия (ЖДА) и В-дефицитная анемия могут быть нормоцитарными. Тем не менее, морфологический вариант анемии имеет важнейшее значение для проведения дифференциальной диагностики.

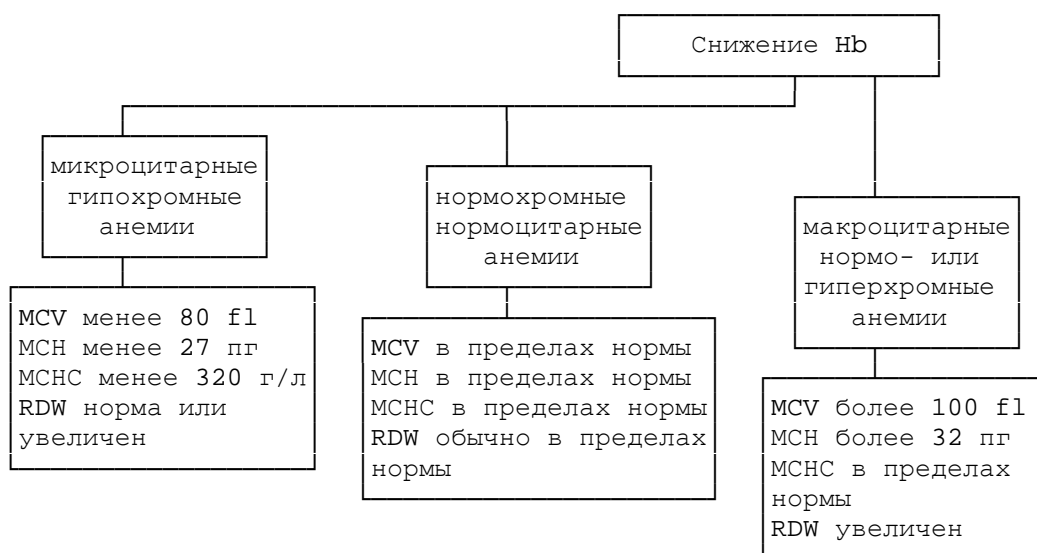


Рис. 53. Классификация анемий на основании эритроцитарных индексов

#### Нормоцитарные нормохромные анемии

Нормоцитарные нормохромные анемии сопровождают многочисленные заболевания. Патогенез этих анемий связан с:

- низкой продукцией эритропоэтина или резистентностью эритроидных клеток к эритропоэтину (хроническая почечная недостаточность, эндокринные заболевания);
- поражением костного мозга (метастазы злокачественных новообразований, специфическая лейкозная инфильтрация костного мозга, апластическая анемия);
- перераспределительным железодефицитом (анемия хронических заболеваний - АХЗ);
- острой кровопотерей (постгеморрагическая анемия);
- некоторыми видами гемолитических анемий.

#### Анемия при хронической почечной недостаточности

Анемия - один из наиболее характерных синдромов, сопровождающих течение хронической почечной недостаточности (ХПН). Патогенез анемии при хронической почечной недостаточности достаточно сложный: снижение продукции ЭПО, повышенный гемолиз, постоянные кровопотери



и дефицит железа, связанные с гемодиализом, действие уремических токсинов и другие факторы. Основное значение в развитии анемии принадлежит абсолютному или относительному дефициту эндогенного эритропоэтина (ЭПО). Согласно многочисленным литературным данным, дефицит ЭПО вызывает ускоренный апоптоз эритроидных клеток в костном мозге.

Лабораторные показатели крови

- Анемия (нормохромно-нормоцитарная).
- Ретикулоцитоз или ретикулоцитопения, реже нормальное количество.
- Тромбоцитопения.
- Количество лейкоцитов варьирует.
- Снижение концентрации ЭПО.

При ХПН анемия имеет характер нормоцитарной нормохромной (рис. 54, 55 - не приводятся). Количество ретикулоцитов при нефрогенной анемии обычно нормальное или незначительно повышено, что зависит от степени активности костномозгового эритропоэза. Отмечается повышение фракции незрелых ретикулоцитов (IRF), это характеризует наличие активного эритропоэза в костном мозге, несмотря на дефицит ЭПО. Возможно, при постоянных кровопотерях, связанных с гемодиализом, компенсаторно активируется костномозговой эритропоэз.

На фоне длительного гемодиализа, вследствие кровопотерь или приема эритропоэтина анемия может трансформироваться в гипохромную микроцитарную, что является свидетельством развития ЖДА и требует соответствующего лечения. При развитии гипохромной микроцитарной анемии отмечается снижение гемоглобина в ретикулоцитах (Ret-Hb).

Апластическая анемия

Апластическая анемия (АА) - группа врожденных и приобретенных заболеваний, характеризующихся резким угнетением костномозгового кроветворения, торможением процессов пролиферации и дифференцировки клеточных элементов с развитием глубокой панцитопении в периферической крови. Клиническая картина определяется анемическим и геморрагическим синдромами.

Лабораторные показатели крови

- Анемия.
- Ретикулоцитопения.
- Лейкопения.
- Тромбоцитопения.

В периферической крови отмечается выраженная нормохромная микроцитарная анемия с резким снижением концентрации гемоглобина

(25 - 80 г/л), количества эритроцитов ( $0,7 - 2,5 \times 10^{12}$  /л), умеренным анизоцитозом с тенденцией к макроцитозу, пойкилоцитозу. Снижение эритропоэтической активности костного мозга проявляется снижением не только относительного, но и абсолютного содержания ретикулоцитов (RET#), фракции незрелых ретикулоцитов (IRF).

Характерным для АА является выраженная лейкопения с абсолютной нейтропенией и относительным лимфоцитозом. В случае присоединения инфекции и может наблюдаться сдвиг влево до миелоцитов. Резко

выражена тромбоцитопения (до  $2,0 - 25,0 \times 10^9$  /л), иногда в мазках периферической крови тромбоциты могут отсутствовать (рис. 56, 57 - не приводятся).

Анемии хронических заболеваний

Анемии, сопровождающие инфекционные, ревматические и опухолевые заболевания, получили условное название "анемии хронических заболеваний" (АХЗ). Частота их при указанных состояниях достигает 100%. АХЗ занимают по распространенности второе место после железодефицитной анемии (ЖДА).

В патогенезе АХЗ основное значение имеют:

- нарушение метаболизма железа;

- действие гуморальных ингибиторов эритропоэза;
- укорочение продолжительности жизни эритроцитов;
- относительная недостаточность ЭПО.

Развивается перераспределительный или функциональный дефицит железа вследствие накопления и блокады освобождения железа в тканевых макрофагах, что приводит к снижению доставки железа к эритрокариоцитам костного мозга, нарушению эритропоэза и развитию анемии.

Лабораторные показатели крови

- Анемия (нормохромно-нормоцитарная или гипохромная микроцитарная).
- Нормальное количество ретикулоцитов.
- Количество лейкоцитов и тромбоцитов варьирует.

Чаще анемия при АХЗ носит нормохромный нормоцитарный, несколько реже умеренно гипохромный микроцитарный характер (рис. 58, 59 - не приводятся). Количество ретикулоцитов нормальное или сниженное.

Для постановки диагноза АХЗ необходимо исключить другие причины анемического синдрома, проводя прежде всего дифференциальный диагноз с микроцитарными гипохромными анемиями (ЖДА, сидеробластные анемии, талассемии). АХЗ характеризуется снижением или нормальным количеством сывороточного железа и увеличением концентрации ферритина, что отличает АХЗ от ЖДА. В большинстве случаев повышены белки острой фазы

**Острая постгеморрагическая анемия**

Острая постгеморрагическая анемия - состояние, которое развивается в результате быстрой потери значительного объема крови. Независимо от патогенеза заболевания при острой постгеморрагической анемии включаются физиологические механизмы, направленные на восстановление объема циркулирующей крови, что отражается на лабораторных показателях крови.

Лабораторные показатели крови

- Анемия (нормохромно-нормоцитарная или макроцитарная).
- Ретикулоцитоз.
- Полихромазия.
- Лейкоцитоз.
- Тромбоцитоз.

Во время первой фазы (1 - 2 дня) происходит спазм периферических сосудов, снижение объема сосудистого русла и поступление крови в системную циркуляцию из депо. Это приводит к тому, что, несмотря на абсолютное уменьшение массы эритроцитов, содержание гемоглобина и эритроцитов после кровопотери приближается к исходному и не отражает истинной степени анемизации.

Во второй фазе развивается гемодилюция - поступление в кровеносную систему тканевой жидкости, в результате восстанавливается объем циркулирующей плазмы. Именно в этой фазе развивается анемия, которая носит первоначально нормохромный нормоцитарный характер (рис. 60, 61 - не приводятся).

Через 3 - 5 дней после кровотечения развивается ретикулоцитоз с резким увеличением фракции незрелых ретикулоцитов (IRF), что на фоне активного эритропоэза отражает регенераторную способность костного мозга, которая становится максимальной к 7 - 10 дню. Появление полихроматофильных макроцитов приводит к увеличению MCV, и анемия может стать макроцитарной нормохромной. При сочетании ретикулоцитоза и повышенного MCV можно ошибочно диагностировать гемолитическую анемию.

После остановки кровотечения нормализация количества ретикулоцитов отмечается через 2 - 3 недели. Сохраняющийся ретикулоцитоз может свидетельствовать о продолжающемся кровотечении. Непосредственно после кровотечения может развиваться транзиторная тромбоцитопения, но спустя несколько часов возникает тромбоцитоз и лейкоцитоз.

**Микроцитарная гипохромная анемия**

Патогенез микроцитарных гипохромных анемий обусловлен нарушением синтеза

гемоглобина в эритрокариоцитах. Причинами могут служить:

- дефицит железа в организме (железодефицитная анемия);
- нарушение синтеза порфиринов;
- нарушение образования глобиновых цепей (талассемии).

#### Железодефицитная анемия

Широкая распространенность железодефицитных состояний диктует поиск комплекса наиболее информативных лабораторных показателей, среди которых немаловажную роль играют эритроцитарные параметры. Железодефицитная анемия (ЖДА) связана с нарушением синтеза гемоглобина в результате снижения запасов железа в организме (таблица 10).

Таблица 10

Наиболее частые причины железодефицитной анемии		
Снижение потребления железа	Повышенные потери железа	Повышенная потребность в железе
<ul style="list-style-type: none"><li>- Вегетарианская диета</li><li>- Нарушение всасывания (мальабсорбция)</li><li>- Недостаточное питание</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Острое кровотечение</li><li>- Хроническая кровопотеря (меноррагии, кровопотери из желудочно-кишечного тракта)</li><li>- Донорство</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Беременность</li><li>- Лактация</li><li>- Быстрый рост в пубертатном периоде</li><li>- Терапия рЭПО</li></ul>

Изменения лабораторных показателей зависят от стадии ЖДА и регенераторной способности костного мозга. Развитию анемии предшествует период латентного дефицита железа (тканевой дефицит железа без анемии). В зависимости от состояния эритропоэтической активности костного мозга различают регенераторную и гипорегенераторную стадии, а в соответствии с лабораторными показателями - три степени тяжести ЖДА:

- легкую - содержание гемоглобина более 90 г/л;
- среднюю - 70 - 90 г/л;
- тяжелую - менее 70 г/л.

Лабораторные показатели крови

- Анемия (микроцитарная гипохромная).
- Ретикулоцитоз или нормальное содержание, ретикулоцитопения.
- Снижение концентрации ферритина, сывороточного железа, повышение ОЖСС, трансферрина, растворимых рецепторов к трансферрину.

Регенераторная стадия. Количество эритроцитов обычно находится в пределах нормы. Отмечается снижение концентрации гемоглобина, MCH (менее 27 пг), MCHC (менее 30 г/дл), MCV (менее 80 фл). Показатель анизоцитоза RDW может оставаться нормальным, что свидетельствует о преобладании однородных клеток с малым объемом, либо немного увеличен.

Эритроцитарная гистограмма имеет обычную форму и лишь смещается влево (рис. 62 - не приводится). Морфологическим признаком ЖДА является гипохромия эритроцитов и микроцитоз (рис. 63 - не приводится). Выраженное снижение объема эритроцитов отражается на форме тромбоцитарной гистограммы, она не заканчивается на базисной кривой, а поднимается правой своей частью вверх (рис. 64 (а, б) - не приводится).

Относительное и абсолютное количество ретикулоцитов при ЖДА в пределах нормы, что свидетельствует о сохраняющейся регенераторной способности костномозгового кроветворения на фоне дефицита железа, либо несколько повышено при наличии кровотечения.

Гипорегенераторная стадия ЖДА характеризуется истощением пролиферативной активности костного мозга, снижением количества сидеробластов, повышением неэффективного эритропоэза, что приводит к снижению количества эритроцитов, появлению популяции красных клеток с увеличенным объемом. Эритроцитарная гистограмма уплощается и значительно растягивается вдоль оси X, указывая на наличие двух популяций эритроцитов - микро- и макроцитов (рис. 65 - не приводится). MCV может увеличиваться, так как является усредненным показателем объемов эритроцитов. Присутствие микро- и макроцитов приводит к повышению

RDW, что коррелирует с наличием смешанного анизоцитоза в мазках периферической крови (рис. 66 - не приводится). Может наблюдаться анизохромия эритроцитов, а также незначительный пойкилоцитоз. Количество ретикулоцитов снижено, что отражает снижение пролиферативной активности эритроидных клеток.

При ЖДА отмечается снижение показателя CHr или RetHb (RET-Y) < 28 пг, отражающего концентрацию гемоглобина в ретикулоцитах, которая является индикатором железодефицитного эритропоэза. Процент гипохромных эритроцитов (% Hуро) более 10% указывает также на железодефицитное состояние. Для функционального дефицита железа значение cut-off % Hуро составляет более 5%.

На фоне приема препаратов железа отмечается незначительное повышение количества эритроцитов, увеличение концентрации гемоглобина, MCH, MCHC, MCV. Показатель анизоцитоза (RDW) значительно повышается, что свидетельствует о появлении гетерогенной популяции эритроцитов. Эритроцитарная гистограмма становится бимодальной, первый пик ее характеризует популяцию с низким объемом (микроциты), второй - появление эритроцитов с нормальным объемом (нормоциты) (рис. 67 - не приводится).

Максимальный подъем ретикулоцитов приходится на 16 - 18 день лечения, в то время как показатель фракции незрелых ретикулоцитов (IRF) увеличивается несколько раньше, что позволяет использовать его для более ранней оценки активации эритропоэза в мониторинге терапии больных ЖДА. Отмечается также повышение содержания гемоглобина в ретикулоцитах (RET-Y или RET-Hb) и снижение % Hуро.

ЖДА характеризуется снижением содержания железа, ферритина в сыворотке крови, % насыщения трансферрина железом, повышением концентрации растворимых рецепторов к трансферрину (sTfR), ОЖСС, трансферрина, увеличением свободных протопорфиринов эритроцитов. Все выше перечисленные показатели должны использоваться только в комплексе с гематологическими параметрами, т.к. их изменения наблюдаются при самых разнообразных заболеваниях. Содержание ферритина в сыворотке крови не всегда отражает истинные запасы железа в организме и часто повышается независимо от количества депонированного железа, что бывает при воспалении, инфекциях, онкологических заболеваниях, заболеваниях печени и других состояниях. В этих случаях определение высокой концентрации sTfR позволяет диагностировать ЖДА. Концентрация растворимых рецепторов к трансферрину отражает потребности преимущественно эритроидных клеток в железе, поэтому в случаях повышения эритропоэтической активности костного мозга и выраженного дефицита железа отмечается повышение их содержания в сыворотке крови. Количество sTfR остается стабильным при острофазном ответе и беременности.

#### Сидеробластные анемии

Анемии этой группы характеризуются дефектами синтеза гемоглобина, которые приводят к недостаточной утилизации железа для синтеза гема и, как следствие, появлению в периферической крови гипохромных микроцитарных эритроцитов и различной степени выраженности накопления железа в митохондриях эритрокариоцитов. В костном мозге обнаруживают "кольцевидные сидеробласты" - ядросодержащие эритроидные клетки с околядерным венчиком, представляющим собой заполненные железом митохондрии, расположенные в виде перинуклеарного кольца. "Кольцевидные сидеробласты" являются диагностическим признаком этих анемий. Сидеробластные анемии могут быть наследственными и приобретенными: рефрактерная сидеробластная анемия при МДС, вследствие токсических воздействий (свинец, этанол, лекарственные препараты - изониазид, азатиоприн, мельфалан), алиментарные - дефицит пиридоксина, меди. Клинические проявления болезни зависят от степени выраженности анемии и признаков гемосидероза.

#### Лабораторные показатели

- Анемия (микроцитарная гипохромная).

- Ретикулоцитопения.

- Повышенное содержание сидеробластов в костном мозге.

- Повышение концентрации ферритина, сывороточного железа, нормальная или сниженная ОЖСС.

В периферической крови отмечается снижение гемоглобина и гематокрита, значительное снижение MCV, MCH, MCHC, выраженный анизоцитоз, пойкилоцитоз с резким увеличением RDW. Среди эритроцитов встречаются стоматоциты, овало- и сфероциты, шизоциты, отдельные мишеневидные эритроциты. В сыворотке крови - высокое содержание железа и ферритина, повышено насыщение трансферрина железом (НТЖ).

В костном мозге - гиперплазия красного ростка, увеличен процент базофильных, полихроматофильных и снижено количество оксифильных эритрокариоцитов, много кольцевидных сидеробластов (рис. 68 - не приводится).

При отравлении свинцом в эритроцитах определяется базофильная пунктация, повышено содержание протопорфирина, в моче увеличена концентрация дельта-аминолевулиновой кислоты и копропорфирина (рис. 69 - не приводится).

#### Талассемии

Талассемии - гетерогенная группа наследственно обусловленных заболеваний, в основе которых лежит нарушение синтеза одной из полипептидных цепей глобина, что приводит к увеличению продукции других цепей и развитию дисбаланса между ними. Талассемии относят к количественным гемоглобинопатиям, так как структура цепей гемоглобина не изменена. Чаще встречаются бета-талассемии. Дисбаланс синтеза глобиновых цепей вызывает развитие неэффективного эритропоза, гемолиз эритроцитов периферической крови и развитие гипохромной анемии различной степени тяжести.

Среди бета-талассемий выделяют две основные формы: тяжелую средиземноморскую форму, при которой синтезируется около 10% нормальной цепи (большая талассемия, анемия Кули), и более легкую негритянскую форму, когда сохраняется около 50% синтеза нормальной бета-цепи.

Большая талассемия (анемия Кули, *thalassemia major*). Считается гомозиготной формой талассемии, хотя во многих случаях заболевание является двойным гетерозиготным состоянием по различным формам бета-талассемии. В костном мозге наблюдается гиперплазия красного ростка, выявляется значительное количество сидеробластов. В крови - гипохромная микроцитарная анемия (снижены MCV, MCH, MCHC), резкий анизоцитоз, пойкилоцитоз, мишеневидные эритроциты, шизоциты, встречаются эритроциты с базофильной пунктацией, эритрокариоциты. Даже при тяжелой анемии ретикулоцитоз не бывает высоким, так как в костном мозге выражен неэффективный эритропоз. Отмечается повышение осмотической резистентности эритроцитов. Характерна лейкопения с относительным лимфоцитозом, в период гемолитического криза - нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево. В период криза может наблюдаться левый сдвиг.

В сыворотке крови имеет место гипербилирубинемия за счет неконъюгированного билирубина, повышено содержание сывороточного железа. Избыточное отложение железа приводит к сидерозу органов. Характерным признаком большой талассемии является выраженное увеличение концентрации фетального гемоглобина. Количество HbA<sub>2</sub> варьирует в зависимости от типа талассемии. Содержание HbA<sub>2</sub> может быть различным, чаще повышенным, но отношение HbA<sub>2</sub>/HbA<sub>1</sub> - всегда меньше, чем 1:40. Диагноз подтверждается электрофорезом гемоглобина (уровень HbF - до 70%).

Малая талассемия (*thalassemia minor*) является гетерозиготной формой бета-талассемии. В костном мозге - гиперплазия эритроидного ростка, количество сидеробластов повышено или нормальное. В крови наблюдается умеренная гипохромная микроцитарная анемия: умеренное снижение гемоглобина при нормальном, а чаще повышенном количестве эритроцитов, снижение индексов MCV, MCH, MCHC, которое может быть более выраженным, чем при ЖДА, эритроцитарная гистограмма смещается в левую сторону (рис. 70 - не приводится).

В мазках крови отмечается анизоцитоз, поэтому показатель RDW выше нормальных значений, пойкилоцитоз, мишеневидность эритроцитов (рис. 71 - не приводится), может быть базофильная пунктация эритроцитов, выявляется ретикулоцитоз. При малой форме талассемии

встречается ложный тромбоцитоз. Это явление обусловлено микроцитарной фракцией эритроцитов, которая счетчиками оценивается, как тромбоциты. В сыворотке крови имеет место умеренная неконъюгированная билирубинемия, содержание железа обычно нормальное или повышенное. Диагноз устанавливается на основании результатов определения малых фракций гемоглобина HbA и HbF.

Для больных гетерозиготной формой бета-талассемии характерно повышение содержания фракции HbA до 3,5 - 8% и примерно у половины больных HbF до 2,5 - 7%.

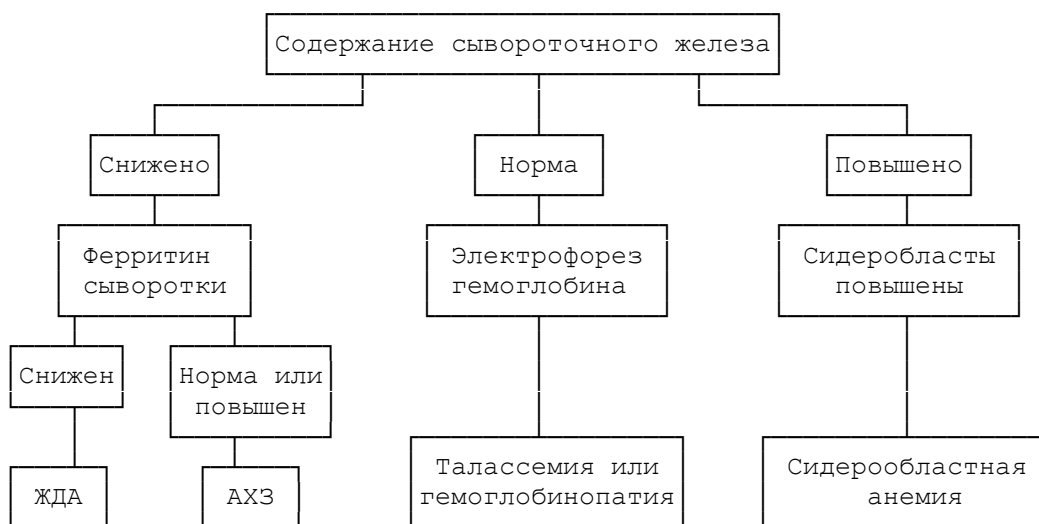


Рис. 72. Алгоритм дифференциальной диагностики гипохромных, микроцитарных анемий

#### Макроцитарные гиперхромные анемии

По этиологии и патогенезу макроцитарные анемии могут быть разделены на две группы - мегалобластные и немегалобластные анемии (рис. 73).

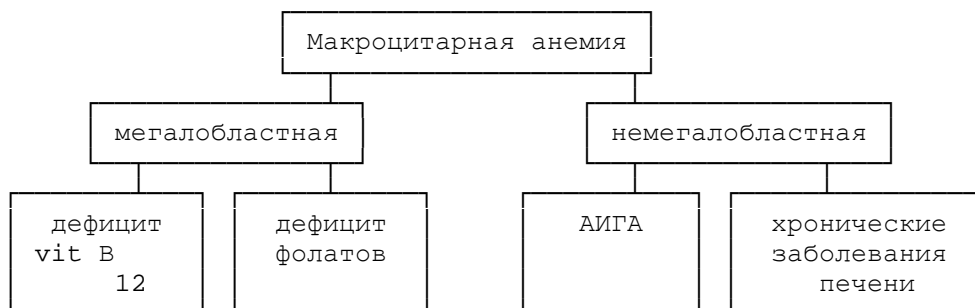


Рис. 73. Классификация макроцитарных анемий по этиологии и патогенезу

#### Мегалобластные анемии

Анемии, связанные с нарушением синтеза ДНК, могут быть как наследственными, так и приобретенными. Общим признаком этих анемий является наличие в костном мозге мегалобластического типа кроветворения. Чаще наблюдается изолированный дефицит витамина В<sub>12</sub>, реже - фолиевой кислоты.

Таблица 11

Наиболее частые причины мегалобластных анемий			
Дефицит витамина В <sub>12</sub>	Дефицит фолиевой кислоты	Комбинированный дефицит витамина В <sub>12</sub> и фолиевой кислоты	Токсические нарушения синтеза ДНК
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Нарушение всасывания</li> <li>- Недостаточное поступление с пищей</li> <li>- Конкуренентное потребление</li> <li>- Повышенная утилизация витамина В<sub>12</sub></li> <li>- Наследственный дефицит транскобаламина II</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Снижение содержания в пище</li> <li>- Нарушение всасывания</li> <li>- Повышение потребности</li> <li>- Уменьшение запасов в печени</li> <li>- Прием антагонистов фолиевой кислоты</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Спру</li> <li>- Глютеновая энтеро-</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Прием алкилирующих агентов, триметоприма, противосудорожных препаратов, оральных контрацептивов, пуринов и пиримидина</li> </ul>

Таблица 12

Причины развития немегалобластных макроцитарных анемий			
Повышенный эритропоэз	Увеличение площади мембраны эритроцитов	Рефрактерные анемии	Прочие
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Постгеморрагическая анемия</li> <li>- Гемолитическая анемия</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Заболевания печени</li> <li>- Обструктивная желтуха</li> <li>- Состояние после спленэктомии</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Миелодиспластические синдромы</li> <li>Апластическая анемия</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Алкоголизм</li> <li>Гипотиреоз</li> <li>Хронические обструктивные заболевания легких</li> </ul>

#### Лабораторные показатели

- Анемия (макроцитарная гиперхромная).
- Ретикулоцитопения.
- Эритроциты с остатками ядер (тельца Жолли, кольца Кебота).
- Лейкопения (нейтропения).
- Гиперсегментация ядер нейтрофилов.
- Тромбоцитопения.
- Мегалобластическое кроветворение в костном мозге.

В периферической крови отмечается макроцитарная гиперхромная анемия. Количество эритроцитов резко снижено (до  $1,0 - 1,5 \times 10^{12}$  /л). Отмечается увеличение среднего объема эритроцитов ( $MCV > 100$  фл) и среднего содержания гемоглобина в эритроците ( $MCH > 32$  пг) при нормальных значениях средней концентрации гемоглобина в одном эритроците ( $MCHC$ ). Эритроцитарная гистограмма значительно смещается вправо, уплощается, растягиваясь вдоль оси X (рис. 74 - не приводится). Эритроциты гиперхромные диаметром более 10 мкм (макроциты и мегалоциты), наблюдается полихроматофилия, остатки ядерной субстанции (кольца Кебота, тельца Жолли), базофильная пунктация (рис. 75 - не приводится). Отмечается появление в крови

гигантских гиперсегментированных нейтрофилов. Нередко присутствуют мегалобласты.

У больных В<sub>12</sub>-дефицитной анемией на фоне макроцитарной, гиперхромной анемии отмечается нормальное или сниженное относительное количество ретикулоцитов (RET%), однако их абсолютное содержание (RET#), независимо от относительного содержания, всегда уменьшено. Средний объем ретикулоцитов (MRV) повышен аналогично MCV эритроцитов. Фракция незрелых ретикулоцитов (IRF) также увеличивается, в то время как абсолютное количество незрелых ретикулоцитов (HLR#) снижается.

В процессе лечения витамином В<sub>12</sub> отмечается положительная динамика со стороны эритроцитарных показателей. Ретикулоцитарный криз развивается на 6-й день терапии, однако к концу 1-го месяца наблюдения абсолютное количество ретикулоцитов может полностью не нормализоваться, что свидетельствует о еще недостаточно восстановленной регенераторной способности костного мозга и необходимости продолжения лечения витамином В<sub>12</sub>. Фракция незрелых ретикулоцитов (IRF) повышается значительно раньше (на 2 - 3-й день лечения) и опережает подъем ретикулоцитов (RET%).

В сыворотке крови имеет место снижение содержания витамина В<sub>12</sub> (норма для взрослых 148 - 616 пмоль/л), который опережает подъем концентрации гемоглобина и числа эритроцитов и свидетельствует о переключении мегалобластного кроветворения на нормобластное. Нормализация показателей красной крови происходит обычно после нескольких месяцев лечения витамином В<sub>12</sub>.

12

#### Аутоиммунные гемолитические анемии (АИГА)

Аутоиммунные гемолитические анемии встречаются преимущественно после 40 лет и у детей до 10 лет. Они возникают в результате сенсибилизации организма и появления в крови антител, обладающих способностью разрушать клеточные элементы крови в РЭС или сосудистом русле. В патогенезе гемолиза играет роль комплекс факторов: класс, подкласс и титр антиэритроцитарных антител, температурный оптимум их действия, антигенные особенности эритроцитарной мембраны и направленность иммуноглобулинов к тем или иным антигенам, система комплемента и активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов. Аутоиммунные гемолитические анемии диагностируют по наличию аутоантител, фиксированных на эритроцитах, с помощью пробы Кумбса, при которой антиглобулиновые антитела вступают во взаимодействие с иммуноглобулинами эритроцитов (прямая реакция Кумбса) и вызывают агглютинацию эритроцитов. Можно выявлять циркулирующие антитела в сыворотке крови непрямой пробой Кумбса, смешивая сыворотку с эритроцитами донора. Как правило, выраженность прямой реакции Кумбса тесно коррелирует с количеством IgG, фиксированных на эритроцитах. Отрицательная проба Кумбса не исключает АИГА. Она может иметь место при интенсивном гемолизе, массивной гормональной терапии, низком титре антител.

Выделяют несколько форм АИГИ в зависимости от типа АТ:

- Аутоиммунная гемолитическая анемия, обусловленная неполными тепловыми агглютинидами;
- Аутоиммунная гемолитическая анемия, обусловленная полными холодowymi агглютинидами (холодовая гемагглютининовая болезнь);
- Аутоиммунные гемолитические анемии, обусловленные тепловыми гемолизинами;
- Пароксизмальная холоддовая гемоглобинурия с двухфазными гемолизинами (анемия Доната-Ландштейнера).

Симптоматические или вторичные АИГА развиваются на фоне лимфопролиферативных заболеваний и злокачественных опухолей, болезней соединительной ткани, инфекций, аутоиммунных заболеваний (тиреоидит, неспецифический язвенный колит, сахарный диабет I типа, саркоидоз и др.). Тепловые агглютинины могут появляться при лечении большими дозами



пенициллина или цефалоспоринов, при этом они направлены против комплекса антибиотика с антигенами мембраны эритроцита. Отмена антибиотика ведет к прекращению гемолиза.

Неполные тепловые агглютинины относятся к классам IgG, IgA. В большинстве случаев антитела направлены к системе антигенов резус. Течение болезни может быть острое, хроническое и подострое. Обычно гемолиз развивается постепенно, редко остро. Острое начало более характерно для детского возраста и всегда - в ассоциации с инфекционным процессом. Разрушение эритроцитов происходит в селезенке (внутриклеточный гемолиз). Потому в клинике наблюдаются признаки, характерные для анемии (бледность, сердцебиение, головокружение) и внутриклеточного гемолиза (желтуха различной интенсивности, спленомегалия).

В костном мозге отмечается гиперплазия эритроидного ростка, встречаются клетки с мегалобластоидной структурой ядерного хроматина. Анемия, как правило, носит макроцитарный, нормо- или гиперхромный характер и сопровождается умеренным, реже высоким ретикулоцитозом. В мазках крови отмечается анизоцитоз, полихроматофилия, могут присутствовать сфероциты, макроциты, эритрокарициты. В гемограмме выявляются повышение MCV, MCH, RDW, эритроцитарная гистограмма уплощается и смещается вправо (рис. 76 - не приводится).

Рис. 77. Периферическая кровь больного с ХЛЛ и АИГА.  
Сфероцитоз, полихроматофилия, базофильная  
пунктация эритроцитов.

Рисунок не приводится.

Количество лейкоцитов зависит от активности костного мозга и основного заболевания, которое лежит в основе гемолиза: может быть нормальным, при острой форме - лейкоцитоз со сдвигом влево, иногда лейкопения.

Содержание тромбоцитов в большинстве случаев нормальное, реже сниженное.

Решающим диагностическим признаком этого вида АИГА является положительная прямая проба Кумбса. По мнению ряда исследователей, параллелизма между выраженностью прямой пробы Кумбса и интенсивностью гемолиза нет.

Использование иммуноферментного анализа позволяет количественно оценить содержание иммуноглобулинов на поверхности одного эритроцита, а также определить их класс и тип. Значение этих исследований обусловлено тем, что различные классы и типы иммуноглобулинов обладают неодинаковой физиологической активностью *in vivo*. Показано усиление остроты гемолиза при участии в процессе одновременно нескольких классов иммуноглобулинов. Кроме того, подкласс иммуноглобулинов во многом определяет остроту гемолиза и место преимущественной деструкции эритроцитов. В настоящее время применяется гелевый тест (фирма Диамед, Швейцария), аналогичный пробе Кумбса, но более чувствительный. Проба не требует отмывания эритроцитов, с которым теряется часть иммуноглобулинов, так как гель разделяет эритроциты от плазмы.

Аутоиммунная гемолитическая анемия, обусловленная полными холодowymi агглютинидами, наиболее часто является вторичным процессом. В молодом возрасте холодовая гемагглютининовая болезнь (ХГАБ) обычно осложняет течение острой микоплазменной инфекции и разрешается по мере купирования последней. У пожилых больных холодовой гемолиз сопутствует хроническим лимфопролиферативным заболеваниям, протекающим с секрецией парапротеина IgM, который играет ведущую роль в гемолитическом процессе. Наиболее часто ХГАБ сопровождает макроглобулинемию Вальденстрема и хронический лимфолейкоз с секрецией IgM, а также системные заболевания соединительной ткани. Для этого вида анемии характерен преимущественно внутриклеточный гемолиз.

Макроглобулин, обладающий свойствами холодowych агглютининов, благодаря высокой молекулярной массе, вызывает гипервискозный синдром. Заболевание проявляется синдромом Рейно, развитием акроцианоза, тромбофлебита, тромбозов, трофических изменений, вплоть до акрогангрены. IgM функционирует при низких температурах, оптимальной для действия макроглобулина является температура +4 °С. Поэтому весь симптомокомплекс заболевания

разыгрывается на холоде, при переохлаждении открытых частей тела. При переходе в теплое помещение гемолиз прекращается.

В крови отмечается нормохромная анемия ( $Hb > 75$  г/л), ретикулоцитоз, агглютинация эритроцитов. Агглютинация часто приводит к увеличению среднего объема эритроцитов и ложно низким значениям гемоглобина при исследовании крови на гематологических анализаторах. Количество лейкоцитов и тромбоцитов - в пределах нормальных величин, ускоренная СОЭ. В сыворотке крови - незначительное увеличение неконъюгированного билирубина.

Наличие холодных агглютининов затрудняет проведение общего анализа крови. Поэтому исследование проводят после подогрева образца в термостате при температуре  $37^{\circ}C$  (кровь берут в пробирку, предварительно опущенную в горячую воду). В сыворотке крови таких больных обнаруживают диагностически значимое повышение титра холодных антител, на поверхности эритроцитов - IgM. При использовании поливалентной антиглобулиновой сыворотки прямая проба Кумбса оказывается в ряде случаев положительной. Полные холодные агглютинины имеют специфичность к системе антигенов Ii (Pr) на поверхности эритроцитов.

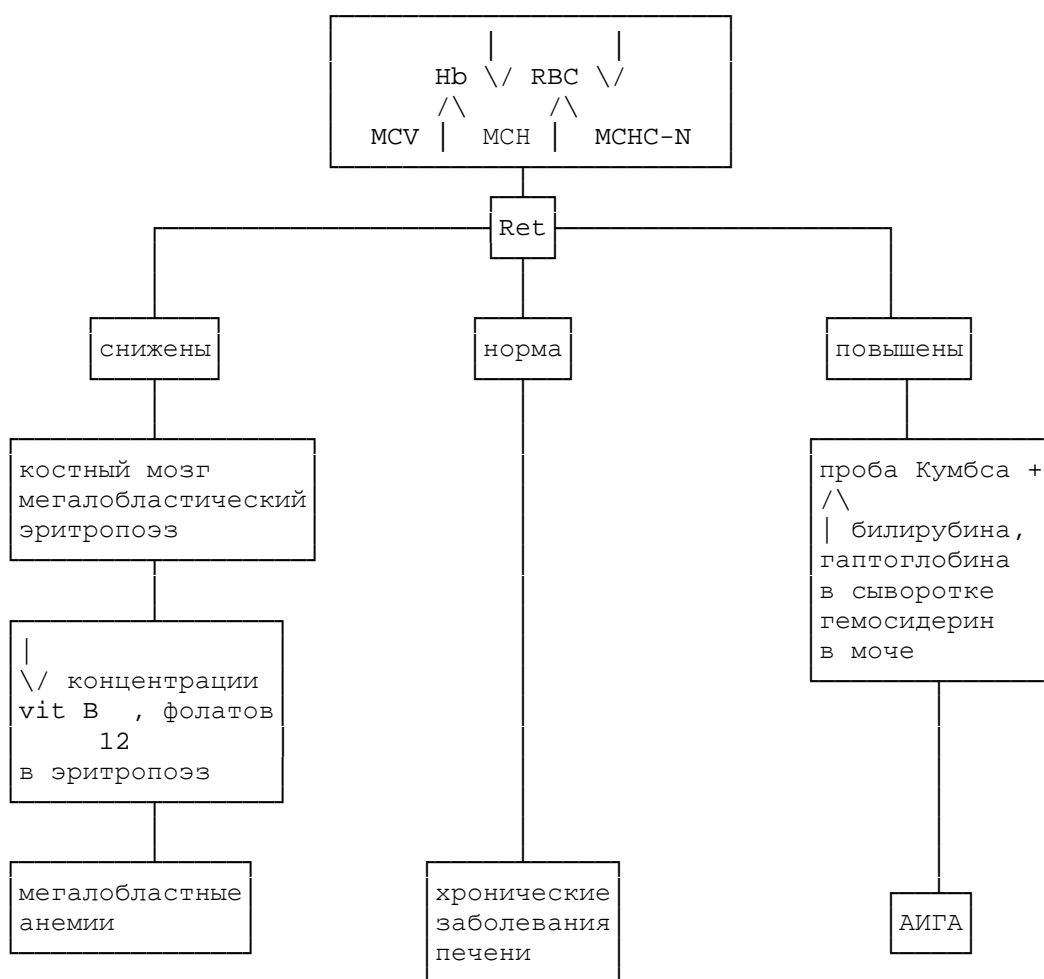


Рис. 78. Алгоритм дифференциальной диагностики макроцитарных анемий

Таким образом, используя эритроцитарные и ретикулоцитарные показатели, стали возможными:

- проведение быстрого скрининга на наличие анемического синдрома;
- определение характера анемии;
- оценка интенсивности эритропоэза в костном мозге;
- мониторинг динамики лечения по этим показателям.

## Эритроцитозы

Повышение количества эритроцитов в крови - эритроцитоз - может наблюдаться при различных состояниях (таблица 13).

Таблица 13

Эритроцитозы (Г.И. Козинец и В.А. Макаров, 1997)	
Основные патогенетические группы	Клинические формы (ситуации)
Абсолютные эритроцитозы (обусловлены повышенной продукцией) - первичный эритроцитоз - симптоматические эритроцитозы: - вызванные гипоксией  - вызванные повышенной продукцией эритропоэтина  - связанные с избытком адренокортикостероидов или андрогенов	Эритремия  - заболевания легких - врожденные "синие" пороки сердца - наличие аномальных Hb - пребывание на больших высотах, синдром Пиквика (ожирение) - гипернефроидный рак, рак надпочечников - рак печени - гидронефроз и поликистоз почек - стеноз почечной артерии - рак яичников - ангиобластома мозжечка - синдром Кушинга - феохромоцитомы - гиперальдостеронизм
Относительные эритроцитозы (следствие гемоконцентрации)	- Потеря жидкости организмом (потоотделение, рвота, понос, ожоги, прием диуретиков, алкоголизм) - Стресс
Смешанный эритроцитоз (вследствие сгущения крови и плацентарной трансфузии)	Физиологический эритроцитоз новорожденных

Увеличение массы циркулирующих эритроцитов > 25% от нормы или Hb >185 г/л для мужчин и > 165 г/л для женщин требует дальнейшего обследования больного для исключения эритремии.

### Использование лейкоцитарных параметров крови

Гематологические анализаторы, определяющие 18 параметров крови и дифференцирующие три популяции лейкоцитов, могут быть использованы для динамического наблюдения (мониторирования) за состоянием лейкоцитарной формулы больного, у которого при первичном исследовании крови автоматизированный дифференцированный счет лейкоцитов соответствовал визуальному анализу лейкограммы. Эти анализаторы не предназначены для проведения скрининга нормы и патологии. В качестве примеров возможных ошибок, связанных с отсутствием визуального контроля, приводятся следующие наблюдения.

1. При дифференцированном подсчете лейкоцитов на гематологическом анализаторе, дифференцирующем WBC на три популяции (3Diff), подсчитано:

9

WBC -  $8,7 \times 10^9 /л$       LYM% - 25%, MON% - 10%, GRN% - 65%

Все показатели лейкограммы укладываются в нормальные величины, заложенные в "память" гематологического анализатора, и он может не выдать никаких "сигналов тревоги". Но специалист, оценивающий это исследование, должен прекрасно представлять, что при MON% - 10% содержание эозинофилов у конкретного больного может быть 4% и 9%, в последнем случае необходимо изучать причину эозинофилии.

2. При дифференцированном подсчете лейкоцитов на гематологическом анализаторе, дифференцирующем WBC на три популяции (3Diff), подсчитано:

$$\text{WBC} - 8,7 \times 10^9 / \text{л} \quad \text{LYM}\% - 25\%, \quad \text{MON}\% - 5\%, \quad \text{GRN}\% - 72\%$$

В данном случае показатели гранулоцитов укладываются в пределы нормы, однако нельзя судить о соотношении палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов. Только подсчитанная визуально лейкоцитарная формула может уточнить истинное распределение гранулоцитов у данного пациента.

Таким образом, оптимальным является обязательное сочетание исследования лейкограммы на гематологическом анализаторе и микроскопического исследования крови.

Изменения относительных величин популяций лейкоцитов при подсчете лейкоцитарной формулы (%) не всегда идут параллельно с изменением абсолютного количества клеток (#). Поэтому при изменении числа лейкоцитов необходимо обращать внимание на их абсолютное содержание в крови, которое можно рассчитать по формуле:

$$(\#) = \frac{\text{WBC} \times (\%)}{100},$$

где:

(#) - абсолютное количество анализируемой популяции клеток;  
WBC - абсолютное количество лейкоцитов периферической крови;  
(%) - процентное содержание анализируемой популяции клеток.

Например, WBC -  $6,0 \times 10^9 / \text{л}$  LYM% - 45%, следовательно:

$$\text{LYM} \# = \frac{6,0 \times 45}{100} = 2,7 \times 10^9 / \text{л}.$$

Преимуществом использования гематологических анализаторов является быстрое получение таких данных по всем дифференцируемым клеткам, позволяющих отказаться от ручного подсчета абсолютного количества клеток.

В качестве примера приводятся два наблюдения значения подсчета абсолютного количества лейкоцитов.

При дифференцированном подсчете лейкоцитов на гематологическом анализаторе, дифференцирующем WBC на три популяции (3Diff), подсчитано:

$$\text{WBC} - 5,0 \times 10^9 / \text{л} \quad \text{LYM}\% - 55\% \quad (\# 2,75 \times 10^9), \quad \text{MON}\% - 5\%, \\ \text{GRN}\% - 40\%$$

$$\text{WBC} - 12 \times 10^9 / \text{л} \quad \text{LYM} - 55\% \quad (\# 6,6 \times 10^9 / \text{л}), \quad \text{MON}\% - 5\%, \\ \text{GRN}\% - 40\%$$

В первом случае имеется относительный лимфоцитоз, т.к. при пересчете абсолютное содержание лимфоцитов остается в пределах нормы, во втором наблюдении имеется как относительный, так и абсолютный лимфоцитоз, требующий проведения дополнительных исследований для уточнения диагноза.

Отклонения клеточного состава лейкоцитов периферической крови отражаются в изменении формы лейкоцитарной гистограммы, которая приобретает черты, характерные для той или иной формы патологического состояния.

Нейтрофильный лейкоцитоз

Нейтрофильный лейкоцитоз (нейтрофилез) (более  $6,0 \times 10^9$  /л) может быть следствием:

- усиленной продукции клеток в костном мозге;
- повышенной миграции нейтрофилов из костного мозга в кровь;
- перераспределения нейтрофилов из маргинального в циркулирующий пул;
- задержки миграции нейтрофилов из крови в ткани;
- сочетанного действия вышеперечисленных причин.

Нейтрофилез может быть реактивной и опухолевой природы (таблица 14).

Таблица 14

Причины развития нейтрофильного лейкоцитоза	
Реактивный	Опухолевый
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Инфекции (бактериальные, грибковые, паразитарные)</li> <li>- злокачественные новообразования</li> <li>- гемолитические анемии</li> <li>- острая кровопотеря</li> <li>- лекарственные препараты</li> <li>- воспалительные и некротические процессы</li> <li>- ацидоз, эклампсия, уремия, подагра</li> <li>- лимфогранулематоз</li> <li>- физические и эмоциональные нагрузки</li> <li>- беременность</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Миелопролиферативные заболевания</li> </ul>

Выраженный нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево свидетельствует о максимальной активности гемопоэза, что прогностически благоприятно. Относительный нейтрофилез со сдвигом влево при наличии лейкопении свидетельствует об истощении гранулоцитарного костномозгового резерва и является крайне неблагоприятным признаком.

Рис. 79. Лейкоцитарная гистограмма периферической крови больного с лейкоцитозом ( $13,1 \times 10^9$  /л) и палочкоядерным сдвигом (11%).

Рисунок не приводится.

Рис. 80. Лейкоцитарная гистограмма периферической крови больного в развернутой стадии ХМЛ.

Рисунок не приводится.

Рис. 81. Периферическая кровь больного в развернутой стадии ХМЛ.

Рисунок не приводится.

Рис. 82. Лейкоцитарная гистограмма периферической крови больного ХМЛ с эозинофильно-базофильной ассоциацией.

Рисунок не приводится.

Рис. 83. Периферическая кровь больного с ХМЛ с выраженной эозинофильно-базофильной ассоциацией.

Рисунок не приводится.

## Лейкопения с нейтропенией

9

Лейкопения с нейтропенией (менее  $2,0 \times 10^9$  /л) может быть функциональной и органической (таблица 15).

Таблица 15

Причины развития нейтропении	
Функциональная	Органическая
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Инфекции (бактериальные, грибковые, вирусные, вызванные простейшими, риккетсиями)</li> <li>- Алиментарная дистрофия, голодание</li> <li>- Лекарственные препараты</li> <li>- Анафилактический шок</li> <li>- Аутоиммунные заболевания</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Острые лейкозы</li> <li>- Лимфопролиферативные заболевания</li> <li>- Миелодиспластический синдром</li> <li>- Мегалобластные анемии</li> <li>- Наследственная доброкачественная нейтропения, циклическая нейтропения, синдром Чедиака-Хигаши</li> <li>- Лучевая болезнь</li> <li>- Агранулоцитоз</li> <li>- Апластическая анемия</li> </ul>

Рис. 84. WBC-гистограмма периферической крови больного с нейтропенией и относительным лимфоцитозом.

Рисунок не приводится.

Агранулоцитоз - резкое уменьшение числа гранулоцитов в периферической крови вплоть до их исчезновения. Критериями диагностики агранулоцитоза являются снижение лейкоцитов менее  $1 \times 10^9$  /л, гранулоцитов менее  $0,75 \times 10^9$  /л.

### Эозинофилия

Эозинофилия - увеличение количества эозинофилов в крови более 5% ( $0,4 \times 10^9$  /л).

Таблица 16

Причины развития эозинофилии	
Реактивная	Опухолевая
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Паразитарные инфекции</li> <li>- Аллергические заболевания</li> <li>- Аутоиммунные заболевания</li> <li>- Лекарственные препараты</li> <li>- Гранулематозные процессы</li> <li>- Лимфогранулематоз</li> <li>- Злокачественные новообразования</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Острый лейкоз с эозинофилией (M4эоз)</li> <li>- Эозинофильный лейкоз</li> </ul>

Рис. 85. WBC-гистограмма периферической крови больного с эозинофилией.

Рисунок не приводится.

### Эозинопения

Эозинопения - снижение количества эозинофилов в крови менее  $0,2 \times 10^9$  /л или анэозинофилия - отсутствие эозинофилов в крови - встречается на первом этапе воспалительного процесса, при тяжелых гнойных инфекциях, шоке, стрессе, эклампсии и в родах,

интоксикациях различными химическими соединениями, тяжелыми металлами.

### Базофилия

Базофилия может наблюдаться при аллергических заболеваниях, в ранней фазе ревматизма, при хроническом миелоидном лейкозе, миелофиброзе, эритремии. Тучноклеточный лейкоз сопровождается увеличением тучных клеток в костном мозге и крови.

Рис. 86. WBC-гистограмма периферической крови больного с базофилией.

Рисунок не приводится.

### Лимфоцитоз

Лимфоцитоз - относительное (более 37%) или абсолютное (более  $3,0 \times 10^9$  /л) увеличение количества лимфоцитов.

Таблица 17

Причины развития лимфоцитоза	
Реактивный (поликлональный)	Опухолевый (моноклональный)
- Вирусные и паразитарные инфекции - Гранулематозные процессы - Аутоиммунные заболевания - Злокачественные новообразования	- Лимфопролиферативные заболевания

Рис. 87. WBC-гистограмма периферической крови больного с инфекционным мононуклеозом.

Рисунок не приводится.

Рис. 88. Периферическая кровь больного с инфекционным мононуклеозом.

Рисунок не приводится.

Рис. 89. WBC-гистограмма периферической крови больного с хроническим лимфолейкозом.

Рисунок не приводится.

Рис. 90. Периферическая кровь больного с ХЛЛ

Рисунок не приводится.

### Лимфоцитопения

Лимфоцитопения - содержание лимфоцитов менее  $1,0 \times 10^9$  /л, наблюдается при острых инфекционных заболеваниях, милиарном туберкулезе (висцеральная форма), системной красной волчанке, почечной недостаточности, в терминальной стадии злокачественных новообразований, лимфогранулематозе, как ранний признак острой лучевой болезни, в терминальной стадии СПИД, вторичных иммунодефицитах. У детей и подростков лимфоцитопения (менее  $1,0 \times 10^9$  /л) возможна в результате алергизации организма и при

наследственном иммунодефиците.

Моноцитоз

9

Моноцитоз - количество моноцитов более  $0,7 \times 10^9$  /л.

Таблица 18

Причины развития моноцитоза	
Реактивный	Опухолевый
<ul style="list-style-type: none"><li>- Инфекции вирусные, паразитарные, бактериальные, вызванные простейшими</li><li>- Воспалительные заболевания</li><li>- Аутоиммунные заболевания</li><li>- Гранулематозные процессы</li><li>- Злокачественные новообразования</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Острый монобластный и миеломонобластный лейкозы</li><li>- Хронический моноцитарный и миеломоноцитарный лейкозы</li></ul>

Рис. 91. WBC-гистограмма периферической крови больного с моноцитозом.

Рисунок не приводится.

#### Моноцитопения

Моноцитопения - снижение содержания моноцитов менее  $0,09 \times 10^9$  /л. Уменьшение числа моноцитов наблюдается при гипоплазии и аплазии костного мозга, острых лейкозах, волосатоклеточном лейкозе, острых инфекциях при применении некоторых лекарственных препаратов.

Рис. 92. WBC-гистограмма периферической крови больного с моноцитопенией.

Рисунок не приводится.

#### Возможности высокотехнологичных гематологических анализаторов

Возможности современных высокотехнологичных анализаторов гораздо шире по сравнению с 18-параметровыми счетчиками крови. Они снабжены соответствующими программами обнаружения незрелых клеток, активированных лимфоцитов, стволовых гемопоэтических клеток. Обозначения флагов дифференциальных параметров, указывающих, например, на присутствие незрелых гранулоцитов, отличаются в анализаторах в зависимости от фирмы-производителя. Это могут быть LIC (Large Immature Cells), которые, в свою очередь, подразделяются на IMG (Immature Granulocytes) - незрелые гранулоциты, IMM (Immature Monocytes) - незрелые моноциты, IML (Immature Lymphocytes) - незрелые лимфоциты (Pentra DX 120). При наличии более 2,5% LIC рекомендовано микроскопическое исследование мазка крови. В анализаторах фирмы Beckman-Coulter (LH500, LH750) флаг обозначается как Immature Gran.

В гематологическом анализаторе XE-2100 Sysmex предусмотрена программа IG Master, в которой чувствительность и специфичность обнаружения незрелых гранулоцитов составляет 95,9% и 89,3% соответственно. Использование при представлении анализа крови флагов при выходе параметров за пределы установленных референсных значений позволяет провести раннее обнаружение септических или иных патологических состояний, требующих дополнительного обследования для установления диагноза и назначения соответствующей терапии.

При лимфоцитозах или наличии измененных по объему лимфоцитов появляются следующие флаги: "Atypical Lymphocytes, Variant Lymphocytes, Reactive Lymphocytes, Abnormal Lymphocytes".

Рис. 93. Дифференцировочная (DIFF) гистограмма



светорассеивания XE-2100 (Sysmex), демонстрирующая локализацию различных типов лейкоцитов.

Рисунок не приводится.

Рис. 94. Дифференцировочная (DIFF) гистограмма светорассеивания XE-2100 (Sysmex), демонстрирующая локализацию активированных лимфоцитов.

Рисунок не приводится.

Рис. 95. Периферическая кровь, активированные лимфоциты.

Рисунок не приводится.

Эволюция созревания клетки отражается на ее морфологии. В современных гематологических анализаторах стало возможным распознавать функциональную трансформацию клетки, исходя из концепции "морфология отражает функцию". Различные этапы созревания клеток оцениваются по синхронности созревания ядра и цитоплазмы и могут быть оценены по стандартным критериям. Разработка новых технологий, исследовательских программ автоматизированного анализа крови основана на знании событий, происходящих в процессе клеточного цикла, функций и морфологии клеток, их изменений при воздействии различных факторов, вызывающих диспластические процессы, апоптоз. Так, в анализаторах фирмы Кюльтер (LH500, LH750) имеется программа WBC Research Population data (RPD), в которой оценивается 24 дополнительных параметров в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD) всех трех (VCS) измерений. Исследуемые показатели сравниваются с референсными значениями. Тщательный анализ гистограмм и скатерограмм распределения клеток, данных исследовательской программы (RPD) помогает детально охарактеризовать клеточные популяции и обнаружить имеющиеся отклонения.

Использование тромбоцитарных параметров крови

Одним из важных параметров общего анализа крови является количество тромбоцитов, определяющее зачастую вероятность развития тромбоза или геморрагического синдрома. В то же время количество тромбоцитов не отражает их функциональную активность (рис. 96 - не приводится). Поэтому для прогноза развития вышеперечисленных состояний необходимо использование дополнительных, более информативных показателей тромбоцитов, а также исследование системы гемостаза.

Среди тромбоцитарных показателей используются средний объем тромбоцитов (MPV), ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW), тромбокрит (PCT), а также новые показатели - фракция незрелых тромбоцитов (IPF), средний тромбоцитарный компонент (MPC).

При отсутствии в крови гемопоэтических стимулов общий объем циркулирующих тромбоцитов довольно постоянен. В патологических условиях количество и объем тромбоцитов могут меняться. При снижении продукции тромбоцитов гемостатический потенциал может быть частично компенсирован за счет повышения их объема. В обратной ситуации при повышении количества тромбоцитов выше  $450 \times 10^9$

/л объем тромбоцитов не снижается ниже определенного физиологического уровня. Соответственно общий объем тромбоцитарного пула в крови возрастает пропорционально увеличению количества тромбоцитов. Это может приводить к изменениям MPV, PDW, PCT и гистограммы распределения тромбоцитов по объему.

В гематологическом анализаторе XE-2100 (SYSMEX) фракция незрелых тромбоцитов (IPF) измеряется специальной программой IPF Master с использованием флуоресцентных красителей. Незрелые тромбоциты - это крупные клетки, которые содержат большое количество РНК, необходимое для интенсивного синтеза белков, участвующих в созревании тромбоцитов. В какой-

то степени фракция незрелых тромбоцитов аналогична фракции незрелых ретикулоцитов, она отражает активность тромбоцитопоэза.

Референсные значения IPF - 1,1 - 10,3%.

Фракция незрелых тромбоцитов может быть использована в дифференциальной диагностике тромбоцитопений, которые наиболее часто могут быть вызваны либо нарушенной продукцией в костном мозге, либо повышенным их потреблением.

Нарушение продукции тромбоцитов наблюдается после химиотерапии, лучевой терапии, трансплантации костного мозга или стволовых гемопоэтических клеток, апластической анемии. Во всех этих наблюдениях содержание IPF находится в пределах нормы.

Состояния, сопровождающиеся повышенным потреблением или деструкцией тромбоцитов (ДВС-синдром, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, кровотечения, тромботические микроангиопатии - синдром Мошковича, гемолитикоуремический синдром), характеризуются увеличением фракции незрелых тромбоцитов до 30 - 50%.

Параметр фракции незрелых тромбоцитов может быть использован при мониторинге регенерации костномозгового гемопоэза после химиотерапии, лучевой терапии, трансплантации костного мозга или стволовых клеток. Показатель IPF повышается на 1 - 2 дня раньше, чем общее количество тромбоцитов после аутологичной или аллогенной трансплантации стволовых гемопоэтических клеток, цитотоксической химиотерапии, и на 2 - 7 дней раньше после аллогенной трансплантации костного мозга. Таким образом, определение этого показателя может быть информативным для оценки продукции костным мозгом тромбоцитов.

После трансплантации костного мозга или стволовых клеток имеется определенный промежуток времени, когда регенераторная способность костного мозга еще не восстановлена, поэтому больные нуждаются в трансфузии эритроцитарной и тромбоцитарной массы. Мониторинг за показателем IPF позволяет сократить число таких трансфузий, т.к. является более ранним предвестником восстановления тромбоцитопоэза в костном мозге по сравнению с общим количеством тромбоцитов.

IPF используется в мониторинге терапии идиопатической и аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры. На фоне эффективного лечения повышенные значения IPF возвращаются к норме параллельно с повышением общего количества тромбоцитов, т.е. этот параметр обратно коррелирует с числом PLT.

MPC (mean platelet component) - средний тромбоцитарный компонент, является новым параметром в анализаторах серии Advia 120, Advia 2120. По данным литературы, этот показатель характеризует плотность и гранулярность тромбоцитов. Нормальные значения - 259 +/- 6,6. MPC коррелирует с функциональной активностью тромбоцитарного звена и может использоваться среди других показателей в качестве предвестника острых ишемических осложнений, а также риска развития тромбоза.

Снижение количества PLT в крови - тромбоцитопения - может развиваться в результате:

- снижения продукции тромбоцитов (наследственные и приобретенные заболевания - онкогематологические заболевания, метастазы злокачественных новообразований в костный мозг, апластическая анемия, заболевания соединительной ткани, мегалобластные анемии, заболевания печени, воздействие ионизирующей радиации, цитостатической терапии, вирусные инфекции, ночная пароксизмальная гемоглобинурия и др.);

- повышенной деструкции тромбоцитов - инфекции, эклампсия беременных, гемолитико-уремический синдром (ГУС), ВИЧ-инфекция, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, системная красная волчанка, хронический лимфолейкоз, хронический активный гепатит, посттрансфузионная тромбоцитопения, гемодиализ, кровотечения, спленомегалии (болезни накопления, лимфомы, волосатоклеточный лейкоз, миелопролиферативные заболевания), иммунные тромбоцитопении;

- в результате потребления PLT - ДВС-синдром.

Повышение количества тромбоцитов в крови - тромбоцитоз - наблюдается при различных заболеваниях (таблица 19).

Причины развития тромбоцитозов	
Тромбоцитоз	Заболевания и синдромы
Реактивный	Спленэктомия, острая кровопотеря, острый гемолиз, состояние после операции, злокачественные новообразования, ревматоидный артрит, туберкулез, язвенный колит, остеомиелит
Опухолевый	Миелопролиферативные заболевания

Подсчет гемопоэтических клеток-предшественников (НРС) с помощью SYSMEX ХЕ-2100

В настоящее время трансплантация гемопоэтических стволовых клеток широко используется при гематологических, онкологических заболеваниях, некоторых аутоиммунных заболеваниях. В ряде случаев она является единственным излечивающим методом (хронический миелолейкоз, апластические анемии, острые лейкозы). Для пересадки стволовых клеток необходимо иметь трансплантат, состоящий либо из аутологичных, либо из аллогенных клеток. Основными его источниками являются клетки костного мозга, периферической и пуповинной крови. В качестве источника стволовых клеток как для детей, так и для взрослых все чаще выступает периферическая кровь, в связи с чем существует серьезная потребность в быстром, надежном методе оценки содержания стволовых клеток в периферической крови. Эта информация жизненно необходима для определения оптимального времени сбора (афереза) стволовых клеток и мониторинга приживления трансплантата.

Для достижения оптимального клинического результата трансплантации стволовых клеток необходима достаточная концентрация этих клеток. В настоящее время с целью характеристики содержания в трансплантатах клеток-предшественников существует три метода. Это метод проточной цитофлуориметрии для количественной оценки CD34+ клеток, который используется наиболее часто, требует квалифицированных специалистов, четкой стандартизации, занимает достаточно длительное время и дорогостоящий. Метод определения колониеобразующей способности (CFU-GM) не является практическим методом для стандартного клинического мониторинга, так как требует 14 дней для полного завершения. Третий метод - это подсчет стволовых клеток периферической крови на основании относительно нового потенциального маркера - Гемопоэтическая Клетка-Предшественник (НРС), определяемого некоторыми гематологическими анализаторами, выпускаемыми Корпорацией SYSMEX, включая SE-9000, SE-9500 и ХЕ-2100.

Истинные стволовые клетки и ранние гемопоэтические клетки-предшественники имеют меньший размер по сравнению с линейно коммитированными клетками-предшественниками, и по мере их созревания они постепенно сначала увеличиваются в размерах, а затем прогрессивно уменьшаются. Эти процессы сопровождаются выраженными изменениями в цитоплазме, характеризующимися преимущественно потерей диффузного голубого цитоплазматического окрашивания, которое представляет собой активно синтезирующий белки эндоплазматический ретикулум. Затем клетки фокусируют свою метаболическую активность в сторону образования внутриклеточных гранул, в результате цитозоль подвергается ряду характерных изменений, преимущественно вследствие аккумуляции в клетках большого количества гранул. К концу последовательного процесса созревания клетки цитоплазма становится резко гранулярной. Кроме того, изменяется хроматиновая структура ядра. На ранних этапах развития хроматиновая сеть имеет крупные открытые ячейки, легко различимые ядрышки. В процессе созревания ядерный хроматин становится более плотным и в случае нейтрофилов дольчатым.

Поверхностная мембрана ранних клеток-предшественников специфически адаптирована для адгезии к стромальным клеткам костного мозга, что необходимо для поддержания важных свойств этих клеток - самообновления и направленной дифференцировки. Такие адгезированные клетки нечасто покидают костный мозг. В большинстве случаев они так плотно приклеены к строме, что им приходится изменять свою мембрану для мобилизации из костного мозга и выхода в циркуляцию. Эти процессы сопровождаются изменениями в содержании поверхностных мембранных белков и в способе взаимодействия этих белков с цитоскелетом, что делает клетки более деформируемыми. Это позволяет им продвигаться через сосудистый эндотелий и, в конечном итоге, в межтканевое пространство. Мембранные изменения также значительно изменяют чувствительность клеток к лизису неионными детергентами.

Методика подсчета НРС основана на дифференциальном лизисе мембран зрелых клеток, при этом более незрелые клетки остаются относительно интактными вследствие различий в содержании липидов в клеточных мембранах. Измерение происходит на IMI - канале (Immature Information) анализатора с использованием радиочастотных (RF), импедансных (DC) сигналов и селективного лизиса детергентом. Сигнал DC идентифицирует изменения в размере клеток, которые сначала становятся больше, затем меньше, сигнал RF меняется в ответ на изменения в хроматиновой структуре и цитоплазматической зернистости (рис. 99 - не приводится). Направления локализации кластеров клеток, которые видны на диаграмме светорассеяния канала IMI (сигнал RF против сигнала DC), выявляют изменения, которые происходят в процессе последовательного созревания клеток. Это дает визуальное доказательство того, как клетки изменяются в процессе созревания. Характеристика, которая, возможно, наименее хорошо понятна, это вопрос селективного лизиса детергентом. Ранние клетки-предшественники имеют более ригидную мембранную структуру, и они нечувствительны к лизису неионными детергентами. По мере созревания клетки мембрана становится более текучей и деформируемой, и когда созревание завершено, детергент разрывает клеточную мембрану.

Таким образом, анализ НРС с помощью анализаторов фирмы SYSMEX базируется на одновременном выявлении RF и DC импедансных сигналов с последующим применением адаптивного кластерного анализа для определения специфической области на диаграмме светорассеяния канала IMI, что, основываясь на описанной последовательности созревания, выявляет гемопоэтические клетки предшественники.

CD34+ клетки постоянно обнаруживаются в узкой области региона НРС диаграммы светорассеяния канала IMI. Фактически все эти клетки регистрируются в том же регионе, где ранее были идентифицированы гемопоэтические клетки-предшественники.

Для исследования НРС рекомендуется использовать антикоагулянт EDTA. Количество НРС остается стабильным в течение 4 часов, после этого периода их оценка недостоверна. Очевидно, стволовые клетки теряют способность оставаться резистентными к лизису детергентом. Исследования стабильности НРС в образцах пуповинной крови, взятых на цитратном (CPD) антикоагулянте, показывают менее 10% потери клеток при хранении их в условиях комнатной температуры до 4 часов.

В норме у детей и взрослых гемопоэтические стволовые клетки не выявляются в периферической крови.

Основным вопросом при оптимизации сбора стволовых клеток периферической крови (PBSC) является точное определение сроков начала афереза. НРС - параметр, который позволяет идентифицировать материал с высоким содержанием CD34+ и колониеобразующей активностью. Возможность выявлять образцы с высоким содержанием жизнеспособных гемопоэтических клеток-предшественников, отделяя их от тех, которые не соответствуют минимальным критериям для использования, представляет интерес для банков пуповинной крови.

- В процессе мониторинга за больными после мобилизации стволовых клеток из костного мозга не следует проводить определение содержания CD34+ клеток методом проточной цитофлуориметрии до тех пор, пока не будут выявлены в периферической крови НРС. При их количестве менее 10/мкл сбор стволовых клеток следует отложить.

- Если содержание НРС > 30/мкл, рекомендуется начинать процедуру афереза, не ожидая результатов определения CD34+.

Таким образом, НРС является новым и весьма информативным маркером, который может быть использован в лабораториях учреждений, занимающихся трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

#### Контроль качества на гематологических анализаторах

Современные анализаторы, используемые в клиничко-диагностических лабораториях, - это, как правило, "черные ящики", которые программируются на входе, результат получается на выходе. Уверенность в получаемых результатах может быть обеспечена только при использовании программ контроля качества.

Согласно 1.5.3 Приложения 1 к Приказу 45: "Регулярно проводимая внешняя оценка

качества и повседневно проводимый внутрилабораторный контроль качества дополняют, но не заменяют друг друга. Внешняя оценка качества направлена, прежде всего, на выявление систематических ошибок лабораторных методов и обеспечение единства измерений на территории страны, а внутрилабораторный контроль качества предназначен для поддержания стабильности аналитической системы, выявления и устранения недопустимых случайных и систематических погрешностей".

Сущность контроля качества заключается в сопоставлении результатов исследования проб с результатами исследования контрольного материала и измерении величины отклонения.

Внешний контроль качества обеспечивается в России Федеральной системой внешней оценки качества клинических лабораторных исследований (ФСВОК). В перечне услуг, предоставляемых ФСВОК, есть программы, предназначенные для оценки качества гематологических показателей, определяемых на анализаторах. Программы внешней оценки качества ФСВОК ежегодно адаптируются под конкретные задачи текущего момента. Поэтому подробный анализ этих программ проводить в этой книге не будем. Однако подчеркиваем, что участие во внешней оценке качества при работе на гематологических анализаторах является обязательным, и будет учитываться как один из основных критериев при сертификации клинико-диагностических лабораторий любого подчинения.

#### Внутрилабораторный контроль качества

Внутрилабораторный контроль качества - объективная проверка результатов лаборатории, осуществляемая ежедневно непосредственно в лаборатории, преимущественно с целью оценить воспроизводимость. Внутрилабораторный контроль качества решает две основные задачи: контроль переменных внешних факторов (разные партии реагентов, калибровочных материалов и пр.) и контроль стабильности выполнения методики в лаборатории. Цель внутрилабораторного контроля качества - выявление и устранение отклонений от стабильного выполнения теста в лаборатории, т.е. выявление и устранение недопустимых аналитических ошибок.

Для того, чтобы контроль качества отвечал поставленным перед ним задачам, он должен быть:

1. Систематическим, повседневным, проводиться по единым правилам, т.е. 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, чтобы исполнитель не знал, где опыт, а где контроль).

#### Принцип проведения внутреннего контроля качества

Принцип проведения внутреннего контроля достаточно прост: периодически (в каждой серии) нужно проводить измерение одного и того же контрольного материала, а результаты этих измерений заносить на контрольную карту.

Хорошо организованная система внутреннего контроля качества позволяет достаточно эффективно выявлять ошибки, связанные с:

- внешними варьирующими факторами (реагенты, калибраторы, расходные материалы);
- внутренними варьирующими факторами (организация в лаборатории "домашних реактивов", обучение персонала, обслуживание приборов, ведение документации, реакция персонала на возникающие проблемы).

Для оценки качества исследований рассчитываются следующие статистические показатели:

1. Среднее арифметическое значение или средняя арифметическая ( $\bar{X}$ ):  
ср

$$\bar{X} = \frac{\sum x_i}{n},$$

где:

X - значения конкретных измерений;

i

n - число измерений.

2. Отклонение от правильного значения, то есть разница между истинной величиной ( $\mu$ ) и средней арифметической, отражает величину систематической ошибки ( $b$ ) и, соответственно, точность определений ( $B, \%$ ):

$$b \text{ (абсолютная величина)} = X - \mu \text{ или}$$

$\bar{X}$

$$B \text{ (отклонение, \%)} = \frac{X - \mu}{\mu} \times 100\%.$$

3. Стандартное отклонение (сигма - "сигма", SD стандартная девиация, дисперсия):

$$\text{сигма} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Стандартное отклонение отражает величину случайной ошибки, то есть воспроизводимость конкретного измерения в абсолютной величине.

4. Коэффициент вариации ( $V$  или  $CV$ ):

$$CV = \frac{\text{сигма}}{\bar{X}} \times 100\%.$$

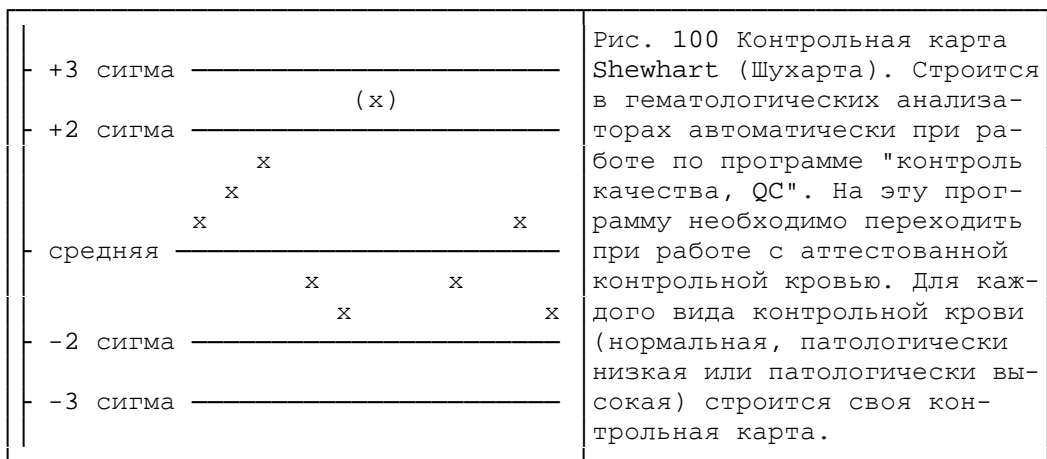
Коэффициент вариации отражает воспроизводимость в относительном значении (процентах). Его легко можно использовать для характеристики и сравнения различных лабораторных показателей. Чем меньше коэффициент вариации, тем выше воспроизводимость результатов.

Внутрилабораторный контроль качества с использованием аттестованной контрольной крови - контроль правильности и воспроизводимости

При проведении контроля качества с использованием аттестованного коммерческого контроля применяются фиксированные стабилизированные клетки крови. Измерение этих клеток по программе, аналогичной программе измерения проб, дает возможность оценить работу прибора. Применяются контроли с низким, нормальным и высоким содержанием исследуемых показателей. Используется этот контрольный материал для оценки правильности. В то же время фиксированные клетки коммерческого контроля нельзя использовать для оценки свойств реактивов (лизатов, изотонических и промывающих растворов), так как эти растворы предназначены для влияния на живые клетки крови, они их модифицируют, но не действуют на фиксированные неживые клетки. Фиксированные клетки в любом растворе будут давать одинаковый результат. В анализаторах заложена данная программа. Она имеет обширную память, автоматически строятся контрольные карты и рассчитываются статистические показатели по всем измеряемым и расчетным параметрам (рисунки 100). Такая программа значительно упрощает работу по контролю качества и фактически не требует дополнительных усилий со стороны оператора, в то же время дает определенную уверенность в результатах.

При использовании коммерческой контрольной крови можно сразу оценивать результаты. В этом случае так называемое должное значение для используемой модификации метода, указанное в

инструкции к контрольному материалу, следует принять за среднюю арифметическую ( $\bar{X}$ ), доверительный предел - за предел  $\bar{X} \pm 1$  сигма и самостоятельно рассчитать два других предела ( $\bar{X} \pm 2$  сигма и  $\bar{X} \pm 3$  сигма), необходимых для построения контрольной карты. В инструкции к коммерческой аттестованной контрольной крови все эти пределы указаны.



В гематологических анализаторах заложена программа внутреннего контроля качества с автоматическим построением карты Шухарта. Однако строиться такая карта будет только в том случае, если при измерении контрольной крови оператор будет выходить на программу контроля качества, а не измерять контрольную кровь в программе измерения проб пациентов.

#### Оценка контрольных карт

Если воспроизводимость и правильность проводимых измерений сохраняются на неизменном уровне, то все следующие результаты измерения контрольного материала должны подчиняться правилам, которые являются следствиями закона нормального распределения. Получаемые результаты должны приблизительно поровну располагаться по обе стороны от среднего значения, не должны непрерывно возрастать или убывать и не должны сильно отклоняться от среднего значения. Ошибки, возникающие при измерении контрольного материала, будут сопровождаться отклонением от характеристик нормального распределения. Это положено в основу принципов оценки контрольных карт.

Таблица 20

Правила Вестгарда для оценки результатов внутреннего контроля качества с использованием контрольных карт		
Критерий и его описание <*>		Тип ошибки
1 2SD	- один результат в серии вышел за предел $\bar{X} \pm 2$ сигма Сигнал для применения других критериев!	
1 3SD	- один результат в серии вышел за предел $\bar{X} \pm 3$ сигма	случайная
R 4SD	- разница между двумя измерениями в серии превышает 4 сигма	случайная

2 2SD	- два последовательных измерения в серии вышли за предел $\bar{X} + 2 \text{ сигма}$ или $\bar{X} - 2 \text{ сигма}$ ср	систематическая
4 LSD	- четыре последовательных измерения в серии вышли за предел $\bar{X} + 1 \text{ сигма}$ или $\bar{X} - 1 \text{ сигма}$ ср	систематическая
10 x	- десять последовательных измерений лежат по одну сторону от средней линии ( $\bar{X}$ ). ср Может применяться самостоятельно!	систематическая

-----  
<\*> Для удобства использования контрольные правила обозначаются символами типа A, где A – это аббревиатура числа L контрольных результатов, учитываемых данным правилом, L – контрольный предел (например 4 LSD).

Существует несколько принципов оценки контрольных карт, однако общепринятыми являются правила Вестгарда (Westgard), которые используются и при анализе ошибок, возникающих на гематологических анализаторах при работе на программе контроля качества с коммерческой контрольной кровью (таблица 20).

Приведенные правила Вестгарда достаточно эффективны для выявления минимальной систематической ошибки.

Действия, которые нужно предпринимать при выходе метода из-под контроля.

При появлении результатов, соответствующих предупредительным критериям, необходимо тщательно проанализировать все этапы работы. Такие результаты можно выдать врачу, но необходимо проверить весь процесс работы на гематологическом анализаторе.

При появлении результатов, соответствующих контрольным критериям, анализы задерживаются и принимаются меры для выявления и исключения ошибок. Когда условия выполнения анализа будут исправлены, необходимо заново измерить контрольную кровь и пробы пациентов, которые были проанализированы в неправильных условиях.

Предупредительные действия:

- периодический просмотр/обслуживание оборудования, документация этих действий;
- закупка контрольных материалов заранее так, чтобы существовала возможность их сравнения с материалами, употребляемыми в настоящее время;
- создание соответствующих условий для хранения реактивов, контрольной крови и проб пациентов;
- точная маркировка всех реагентов и проб;
- нанесение на контрольную карту всех пометок, связанных с заменой реагентов, калибраторов и прочее.

Методы, использующие контрольные материалы, наиболее широко применяются для контроля качества в КДЛ. Однако эти методы не выявляют ошибку в целом. В таблице приведены некоторые недостатки методов с использованием коммерческих контрольных материалов.

Некоторые недостатки методов, использующих для контроля качества коммерческие контрольные материалы:  
Требуют значительных материальных затрат  
Контрольные материалы имеют ограниченный срок действия (нестабильны)  
Контрольные материалы могут быть неадекватными по своим характеристикам образцам пациентов  
Контролируется только этап анализа, игнорируются преаналитическая



Для России существенными недостатками контрольной крови для контроля качества являются:

- дороговизна контрольной крови;
- сложность регулярных поставок импортных материалов;
- ограниченность срока действия;
- невозможность по этому контрольному материалу оценить качество отечественных реагентов, предлагаемых взамен "родных реактивов" к импортным гематологическим анализаторам.

Ниже приводятся некоторые способы проведения внутреннего контроля без использования контрольных материалов. Эти способы не упоминаются в последних рекомендациях ведущих европейских экспертов. Создание адекватной системы внутреннего контроля качества без приобретения хороших контрольных материалов невозможно, описанные ниже способы можно рекомендовать только как дополнительные.

#### Внутрилабораторный контроль качества без контрольной крови Карта по ежедневным средним (контроль правильности)

Для многих исследований в качестве дополнительного можно рекомендовать контроль по ежедневным средним, в котором используются образцы или результаты исследования образцов пациентов. Преимуществами этого метода является то, что он, с одной стороны, не требует специального контрольного материала, с другой стороны, позволяет выявлять ошибки не только на аналитическом этапе, но и некоторые ошибки, возникающие на преаналитическом этапе (например, связанные с взятием или предварительной обработкой проб пациентов).

Данный метод имеет ряд ограничений. Прежде чем начинать ведение карты по ежедневным средним, нужно принять во внимание следующее:

- Обследуемый изо дня в день контингент должен быть достаточно однородным (т.е. не должно быть сильных изменений количественных и качественных изменений обследуемых лиц).
- Если в лаборатории в определенные дни происходит смена обследуемого контингента (например, в один из дней обследуются только новорожденные или только больные диабетом), то средние значения по этим дням в расчет принимать не следует.
- Если усреднять все полученные значения, то даже один сильно патологический результат может существенно изменить среднее значение. Поэтому в расчет должны приниматься только те значения, которые укладываются в определенные пределы (диапазон усреднения).
- Пределы усреднения могут быть установлены достаточно произвольно. Как правило, рекомендуется использовать нормальный диапазон или брать шире его в 1,2 - 2,0 раза.
- Диапазон усреднения не должен быть слишком узким, так как это снижает чувствительность данного метода контроля к выявлению ошибок, но и не должен быть слишком широким, так как при этом будет большой разброс средних изо дня в день.
- Минимальное количество усредняемых ежедневно результатов должно быть не менее 15, лучше 50 - 70, это зависит от теста и от нагрузки в лаборатории.
- Большая часть пациентов должна иметь результаты в области усреднения. Не имеет смысла вести контроль качества по ежедневным средним, если результаты данного теста сильно патологические (например, результаты исследования лейкоцитов в гематологическом отделении).
- Необходимо обрабатывать достаточно большие массивы данных. Ручной расчет очень трудоемок, желательно проводить автоматизированный контроль.

Карты по ежедневным средним анализируются по тем же правилам, что и карты по контрольным материалам. Для построения карт по ежедневным средним (карты аналогичные картам Шухарта) необходимо выполнить следующие действия:

1. В течение 20 дней ежедневно рассчитывать среднее по результатам пациентов, попавших в диапазон усреднения;
2. По этим значениям рассчитать среднюю, дисперсию и коэффициент вариации;
3. Если коэффициент вариации (CV) будет существенно больше, чем CV, получаемый изо дня

в день по контрольным материалам, значит, количество усредняемых в день результатов пациентов недостаточно (при условии однородности контингента обследуемых). В этом случае будет очень большой разброс точек на карте, и интерпретировать ее будет затруднительно. Надо увеличивать количество усредняемых результатов, иначе ведение карты по ежедневным средним теряет смысл. При ведении такого контроля следует иметь в виду, что этот метод позволяет вести контроль правильности только на уровне среднего значения по пациентам. Контроль на более высоком и более низком уровнях значений нужно вести другими методами.

#### Карта по дубликатам (контроль воспроизводимости)

Контроль воспроизводимости. Контроль воспроизводимости предусмотрен на основе повторных анализов от пациента (донора, можно использовать лабораторных животных или просроченные образцы коммерческих контролей). В гематологических анализаторах имеется "Программа сохраненного образца", которая обеспечивает возможность сохранения в памяти нескольких результатов разных образцов. Можно, например, при 5-дневной работе выбрать 5 доноров (молодых женщин лучше не привлекать из-за потерь крови у них при месячных менструациях). По определенным дням недели (например по понедельникам) пробу для исследования брать у одного и того же донора. В следующие дни недели - у следующего донора. Каждый начальный анализ любого из образцов хранится как референсный результат. Исследование крови от того же пациента в последующие дни будет постоянно по всем параметрам сопоставляться с этим референсным значением. При повторных контрольных исследованиях программа будет сигнализировать о появлении любых результатов, не соответствующих установленным пределам. Такая система позволяет определенное время обходиться без дорогостоящего коммерческого контрольного материала.

Для построения карты по дубликатам необходимо выполнить следующие действия:

1. Измерить трижды или более раз концентрацию исследуемого компонента.
2. По полученным результатам вычислить стандартное отклонение (сигма) и коэффициент вариации (CV).
3. Рассчитанный CV сравнить с допустимым CV для данного параметра (таблица 21).

Таблица 21

Коэффициенты для расчета предупредительной и контрольной границ карты по дубликатам		
Количество дубликатов	Коэффициент для предупредительной границы	Коэффициент для контрольной границы
2	2,45	3,22
3	1,95	2,39
4	1,76	2,14
5	1,66	1,98
6	1,59	1,88
7	1,54	1,80
8	1,51	1,75
9	1,48	1,71
10	1,45	1,68

4. Предупредительную и контрольную границы можно рассчитать, умножив среднюю за период разность между дубликатами на коэффициенты, приведенные в [таблице](#). Например, измеряли пробы доноров трижды в течение нескольких дней. Получена средняя разность за эти дни для гемоглобина 7 г/л. Значит, предупредительная граница будет  $7 \times 1,95 = 14$  г/л, контрольная граница -  $7 \times 2,39 = 17$  г/л.

5. Можно построить карту, нанеся одну предупредительную и одну контрольную границы параллельно оси X (рис. 101 - не приводится). Ось X соответствует нулевой разнице.

Правила интерпретации карты по дубликатам:

"Строгие" правила:

1. Ни одна из разностей не должна выходить за контрольную границу.
2. Две разности подряд не должны выходить за предупредительную границу.

"Предупредительные" правила:

1. Две разности из последовательных 20 не должны выходить за предупредительную границу.
2. Три - четыре разности подряд не должны лежать вблизи предупредительной границы.

Карту по дубликатам можно вести с использованием проб пациентов. Для этого проба пациента с содержанием компонента в пределах нормы анализируется в начале и конце серии измерения и вычисляется разность между измерениями, которая наносится на карту без учета знака. На следующий день проба другого пациента обрабатывается таким же образом и т.д. При этом границы карты надо рассчитывать также по пробам пациентов (процедура аналогична описанной выше).

Программа контроля качества по накопленному среднему

Эта программа основана на законах распределения больших выборок, согласно которым суммарный результат генеральной совокупности имеет тенденцию быть стабильным при отсутствии систематических влияний. Систематические ошибки неизбежно приведут к отклонению от генеральной средней средних выборочных совокупностей. Во многих гематологических анализаторах устанавливают программу контроля качества по накопленному среднему.

Эта программа функционирует без непосредственного участия оператора. При наборе, допустим, из 20 анализов, в которых не было флагирования по оцениваемым параметрам, прибор вычисляет текущую среднюю для таких комплексных показателей, как MCV, MCH, MCHC. Текущее среднее сравнивается со значением генерального среднего, вычисленного, допустим, из 500 анализов. Программа запоминает средние из последовательных 20-ти анализов, строит графики, аналогичные графикам на картах Шухарта. Отображаемые на графиках предельные линии ошибок соответствуют отклонениям показателей, допустим, в +/- 3%. Если новое среднее значение вышло за предельные линии ошибок по любому из оцениваемых параметров, то будет сделано соответствующее сообщение оператору и распечатаны результаты отдельных анализов, приведшие к значительному отклонению комплексных показателей. Если наблюдается последовательность из 3 средних, отклонившихся от генерального среднего более чем на предельную допустимую величину, то прибор фиксирует ненормальное поведение системы.

Сочетание этих подходов, основанных на контроле правильности, контроле воспроизводимости и выявлении систематических ошибок, позволяет достаточно уверенно использовать результаты анализов пациентов на гематологических анализаторах. В настоящее время все гематологические анализаторы снабжены встроенными программами контроля качества.

Критерии приемлемости лабораторных показателей

Если используется исследованный контрольный материал, то можно попытаться оценивать не только воспроизводимость, но и точность измерений. Однако опыт подсказывает, что более адекватные результаты по оценке точности измерений дает постоянное участие в исследованиях по внешнему или межлабораторному контролю качества.

В качестве ориентира для гематологических показателей при проведении внутрилабораторного контроля качества следует использовать допустимые значения смещения и коэффициента общей аналитической вариации, с которыми должен определяться аналит, прописанные Приказом N 45 МЗ РФ от 07.02.2000 "О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения РФ" и Приказом МЗ РФ N 220 от 26 мая 2003 г. - отраслевой стандарт ОСТ "Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов" (таблица 22).

Предельно допустимые значения смещения (В) и коэффициента общей аналитической вариации (CV), определенные для гематологических показателей <u>ОСТом 91500.13.0001-2003</u>		
Показатель	Смещение	Вариация
Гемоглобин	+/- 4%	4%
Эритроциты	+/- 6%	4%

На начальном этапе организации внутреннего контроля качества рекомендуем опираться на критерии приемлемости результатов лабораторных показателей, рекомендуемые Научно-методическим центром клинической лабораторной диагностики МЗ РФ (таблица 23).

Таблица 23

Критерии приемлемости для гематологических показателей (рекомендация Научно-методического центра клинической лабораторной диагностики)				
Показатель	Допустимая общая погрешность, %	Принцип метода	Аналитическая вариация, CV изо дня в день, %	Диапазон измерения
Гемоглобин	+/- 7	гемиглобин-цианидный	+/- 2	40 - 250 г/л
Эритроциты	+/- 10	автоматический счетчик в камере	+/- 5 +/- 10	<sup>12</sup> 1 - 8 x 10 /л
Тромбоциты	+/- 25	автоматический счетчик		<sup>9</sup> до 1000 x 10 /л
Лейкоциты	+/- 15	автоматический счетчик	+/- 10	<sup>9</sup> до 30 x 10 /л

#### Ошибки аналитического периода

Приступая к работе на гематологическом анализаторе, внимательно прочитайте руководства по эксплуатации и обратите внимание на границы линейности измерения анализируемых параметров. Оценка проб со значениями анализируемых параметров, превышающих границу линейности измерения, чревата получением ошибочных результатов. В большинстве случаев при анализе проб с гиперцитозами анализатор вместо значения измеряемого параметра выдает значок "--D", что указывает на необходимость разведения пробы и повторного измерения. Разведение необходимо проводить до тех пор, пока не будут получены схожие итоговые результаты при двух ближайших разведениях. Пример анализа пробы больного с гиперлейкоцитозом на трех различных гематологических анализаторах приведен в таблице 24.

Таблица 24

Результаты подсчета количества при гиперлейкоцитозе, выполненные на трех различных гематологических анализаторах		
Гематологичес-	Степень разведения пробы	Итоговое значение

кие анализаторы	Цельная кровь	1:1	1:3	1:4	WBC (показатель разведения 1:4 x 5)
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

Из [таблицы](#) видно, что при анализе цельной крови только один анализатор (2-й) дал цифровое значение количества лейкоцитов, два других указали на необходимость разведения пробы. Последующее поэтапное измерение пробы в трех разведениях позволило добиться близких конечных результатов на всех приборах только при разведении 1:3 и 1:4. Таким образом, итоговое количество

9

лейкоцитов составило 700,0 – 710,0 x 10<sup>9</sup> /л, что более чем в 2 раза превышает первоначальное значение, полученное в цельной крови на 2-м анализаторе и в 1,5 – при разведении 1:1 на 1-м и 2-м анализаторах.

Концентрация гемоглобина в большинстве гематологических анализаторов определяется фотометрически. Различное влияние липидемии на определение гемоглобина в приборах связано с техническими особенностями, а не с методологией. Величина результирующей ошибки сильно зависит от оптической геометрии прибора: размера выходного отверстия из кюветы для образцов и расстояния до фотодиода.

Контролем за правильностью измерения концентрации гемоглобина может служить величина MCHC, которая рассчитывается приборами путем деления концентрации гемоглобина в г/100 мл на гематокрит и умножения на 100. Чаще всего увеличение MCHC свидетельствует об ошибках, допущенных при измерении пробы (погрешности определения гемоглобина или MCV). Таким образом, данный параметр может быть использован и как индикатор ошибок, допущенных на аналитическом или преаналитическом этапах работы. Пример влияния гиперлипидемии на величину гемоглобина и MCHC, полученных на двух гематологических анализаторах, приведен в таблице 25.

Таблица 25

Значения параметров общего анализа крови больного с хроническим лимфолейкозом и гиперлипидемией, полученные на двух анализаторах						
	WBC	RBC	PLT	Hb	MCV	MCHC
KX-21 (Sysmex)	299,1	2,35	290	82	92,0	378
Гемолюкс 19	268,3	2,33	296	127	89,4	619

Из данных [таблицы](#) видно, что оба анализатора дали близкие значения по количеству лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов и среднему объему эритроцитов и существенно разошлись в оценке концентрации гемоглобина. В обоих случаях отмечается увеличение MCHC выше нормальных значений, что указывает на ошибку измерения, однако в первом случае абсолютная величина погрешности не столь велика, как во втором. В подобных ситуациях наиболее точные результаты определения концентрации гемоглобина гемиглобинцианидным методом могут быть получены на фотометре при добавлении в холостую пробу 20 мкл сыворотки больного.

Основные рекомендации по обеспечению качества гематологических исследований на анализаторах

1. Внимательно изучите инструкцию к гематологическому анализатору и работайте на анализаторе согласно этому документу.

2. Используйте для анализа кровь, стабилизированную К-ЭДТА в рекомендованной пропорции для конкретной соли. Лучшие результаты достигаются при использовании одноразовых коммерческих пробирок для гематологических исследований (красная крышечка).

3. Запускайте прибор, соблюдая все стадии промывки, добейтесь нулевых (фоновых) значений показателей по всем каналам.

4. Выполните процедуру контроля качества по соответствующей программе. Оцените полученный результат.
5. В качестве реактивов используйте рекомендованные фирмой - поставщиком прибора. При смене реагентов на другого производителя будьте предельно внимательны на всем протяжении работы на этих реактивах, нарушения работы прибора могут возникнуть не сразу.
6. Перед анализом осторожно, но тщательно перемешайте пробирку с кровью. Лучше для этой цели использовать ротомикс.
7. Работайте осмысленно, сопоставляя получаемые результаты с клинической характеристикой проб пациента.
8. Обращайте внимание на сообщения прибора о вероятных систематических ошибках. Помните, что увеличение МСНС выше нормальных значений, - как правило, результат ошибки измерения.
9. При выявлении ошибки обязательно устраните причину, не работайте на неисправном приборе.
10. После окончания измерений тщательно промойте анализатор, не перекладывайте эту работу на других.
11. При остановке прибора на длительный срок обязательно выполните все процедуры консервации. Лучше эту работу выполнить вместе с сервис-инженером.
12. При возникновении технических проблем дождитесь сервис-инженера, авторизованного фирмой - поставщиком. Не доверяйте работать на приборе и копаться в нем необученному персоналу.
13. Добейтесь от администрации заключения с фирмой-поставщиком контракта на постоянное сервисное обслуживание. Следите, чтобы фирма-поставщик вовремя проводила профилактическое обслуживание прибора.
14. Все получится, если будете соблюдать инструкцию по работе на приборе и будете уверены в своих знаниях. Авторы желают Вам удачи.

#### Основная литература

1. Долгов В.В., Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е. // Лабораторная диагностика анемий. Тверь, Губернская медицина, 2001.
2. Козинец Г.И., Макаров В.А. (Ред.) // Исследование системы крови в клинической практике. М., Триада-Х, 1997.
3. Козинец Г.И., Погорелов В.М., Шмаров Д.А. и др. // Клетки крови - современные технологии их анализа. М, "Триада-Фарм", 2002, с. 4 - 27.
4. Г.И. Козинец, В.М. Погорелов, О.А. Дягилева, И.Н. Наумова. // Кровь. Клинический анализ. Диагностика анемий и лейкозов. Интерпретация результатов. М., Медицина XXI, 2006.
5. Меньшиков В.В. (Ред.) Клиническая лабораторная аналитика. // М., т. 2, 1999.
6. Кузнецова Ю.В., Ковригина Е.С., Байдун Л.В. и др. // Использование эритроцитарных индексов и показателей обмена железа в дифференциальной диагностике микроцитарных анемий. Гематол. и трансфузиол., 2000, т. 45, N 6, с. 46 - 48.
7. Луговская С.А., Почтарь М.Е. // Гематологический атлас. М., "Триада", 2004.
8. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е., Долгов В.В. // Лабораторная гематология. М., "Триада", 2006.
9. Луговская С.А., Почтарь М.Е. // Ретикулоциты. М., 2006.
10. Матер. XIX Международного симпозиума "Technological Innovations in Laboratory Hematology", April 25 - 28, 2006.
11. Новик А.А., Богданов А.Н.. Анемии. СПб, "Нева", 2004.
12. Погорелов В.М., Козинец Г.И., Ковалева Л.Г. // Лабораторно-клиническая диагностика анемий, МИА, 2004.
13. Шиффман Ф.Д. // Патология физиология крови. М. - СПб., 2000.
14. Briggs C., Rogers R., Thompson B., Machin S. // "New Red Cell Parameters as Potential Markers of Functional Iron Deficiency". Infusion Therapy and Transfusion Medicine, 2001, v. 28, N 5, p. 249 - 308.
15. Hillman R.S., Ault K.A., Rinder H.M. // Hematology in Clinical Practice, McGrawHill, 2005.

16. Hinsmann R. // "Iron Metabolism, Iron Deficiency and Anemia". Sysmex Journal International, 2003, v. 13, N 2, p. 65 - 74.
  17. Pollard Y., Watts M.J., Grant D. et al. // Use of the haemopoietic progenitor cell count of the SYSMEX SE-9500 to refine apheresis timing of peripheral blood stem cells. Br. J. Haematol, 1999, v. 106, p. 538 - 544.
  18. Peng L., Jang J. Jang H. et al. // Determination peripheral stem cells by the SYSMEX SE-9500. Clin Lab Haemat., 2001, v. 23, p. 231 - 236.
  19. Thomas L., Franck S., Thomas C., Messinger M. // "Clinical Utility of RET-Y in Functional Iron Deficiency. Proceedings of the Sysmex European Symposium", 2003, p. 91 - 101.
  19. Torres Gomez A., Casano J., Sanchez J. at al. // "Utility of reticulocyte maturation parameters in the differential diagnosis of macrocytic anemias". Clin. Lab. Haematology, 2003, v. 25, p. 283 - 288.
  20. Yu J., Leisenring W., Fritschle W. et al. // Enumeration of HPC in mobilized peripheral blood with the SYSMEX SE-9500 predicts final CD34+ cell yield in the apheresis collection. Bone Marrow Transplantant, 2000, v. 25, p. 1157 - 1164.
  21. Wintrobe M.M. // Clinical Hematology - 9-th-Ed. Lea and Febiger, 1993.
  22. Wang F.-S., Morikawa T., Biwa S. et al. // Monitoring Heamatopoietic Stem and Progenitor Cells with SYSMEX Automated Haematology Analysers. Lab. Hemat., 2002, v. 8, p. 119 - 125.
-