

Автоматизация гематологических исследований: **принципы и возможности**

Разделение анализаторов на 3-diff и 5-diff



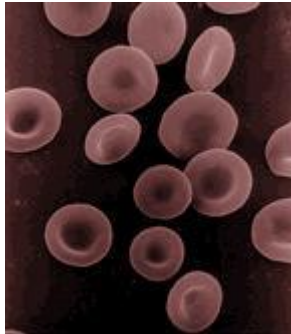
- Дифференциация лейкоцитов на 3 группы
- Апертуро-импедансный метод
- Фотометрический метод определения HGB
- Определение до 21 параметра:
- 3 гистограммы распределения (RBC, PLT, WBC)
- Используют 2-3 реагента

- Дифференциация лейкоцитов на 5 популяций
- Апертуро-импедансный метод и оптический методы (лазерный, или технология VCS), цитохимия, химическое окрашивание, световая абсорбция, технология MAPSS™
- Фотометрический метод определения HGB
- более 22 параметров:
- Используют более 3-х реагентов

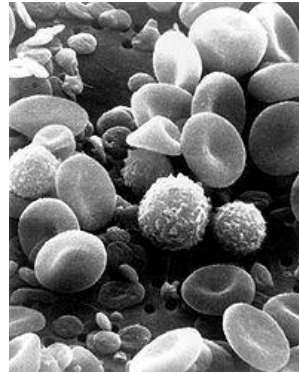
Основные клетки крови.

Разделение анализаторов на 3-diff и 5-diff

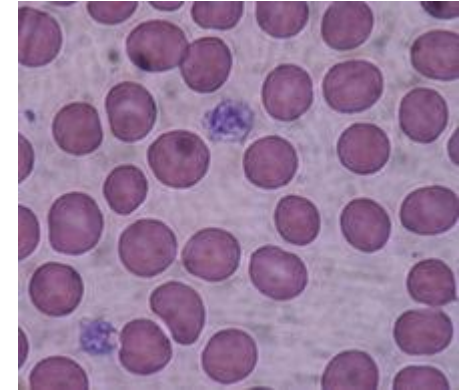
эритроциты



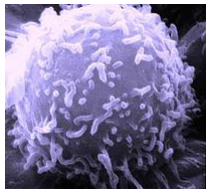
лейкоциты



тромбоциты



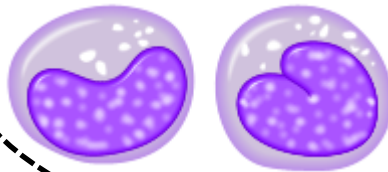
лимфоциты



120-150 фл

40-90 фл

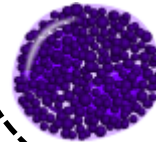
моноциты



80-140 фл

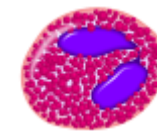
90-140 фл

базофилы



60-120 фл

эозинофилы нейтрофилы



70-130 фл



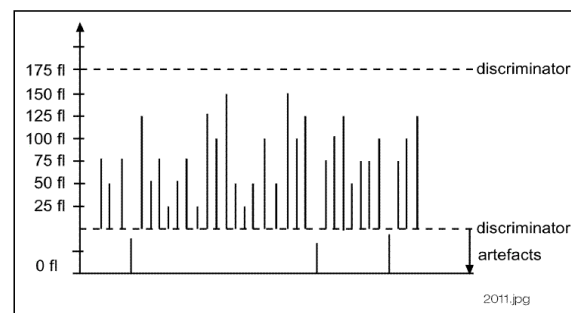
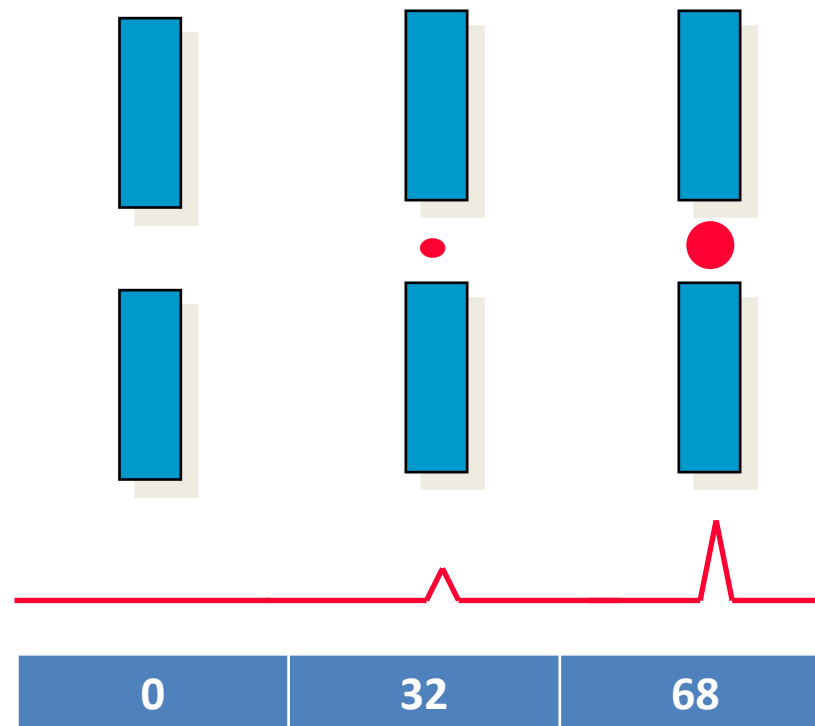
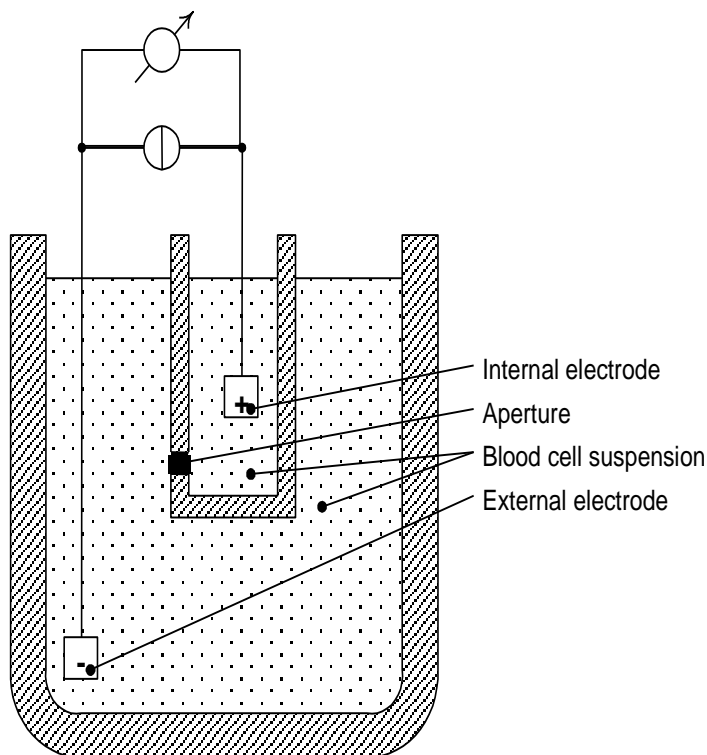
140 - > 350 фл

АПЕРТУРО–ИМПЕДАНСНЫЙ МЕТОД (кондуктометрический, или метод Культера (ТЕХНОЛОГИЯ 3-DIFF))

Wallace H., Joseph R. Coulter (1947)

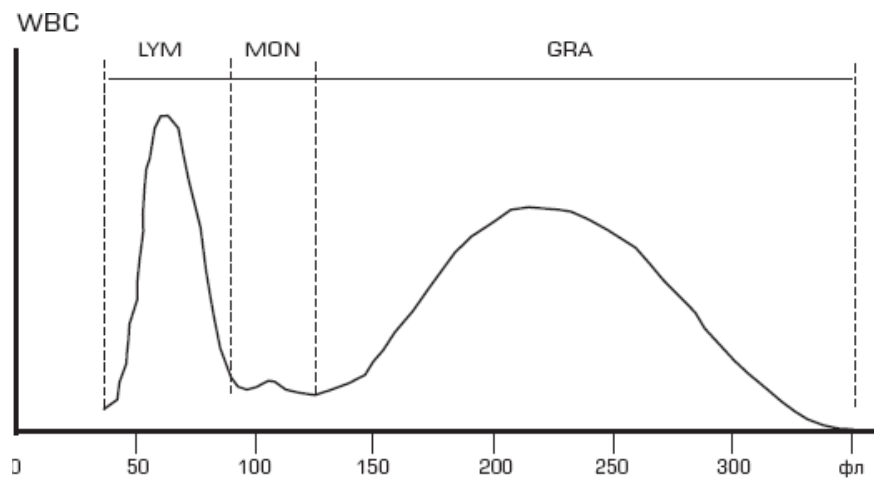
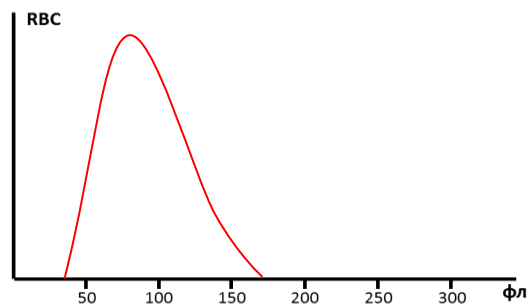
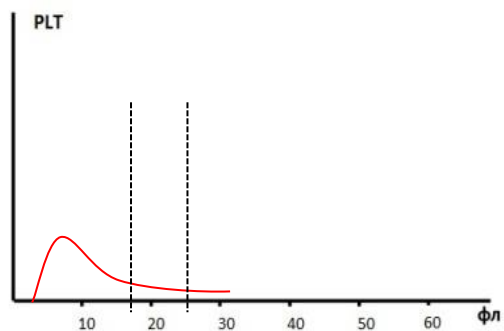
Принцип:

- импульсы сопротивления разной амплитуды распределяются в дискриминаторе прибора



Принцип:

- распределение клеток разного объема отображается в графическом виде (гистограммы) на экране прибора



Возможности:

- высокая точность определения объема клеток (до 2%)
- высокая чувствительность (определение объема от 1 фл)
- простота методики
- относительно недорого в обслуживании и ремонте

Недостатки:

- возможные ошибки в подсчете при агрегации клеток
- невозможность точной дифференцировки популяций лейкоцитов

МЕТОДЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЛЕЙКОЦИТОВ (ТЕХНОЛОГИЯ 5-DIFF)

ПРОТОЧНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ

MAPSS™

VCS

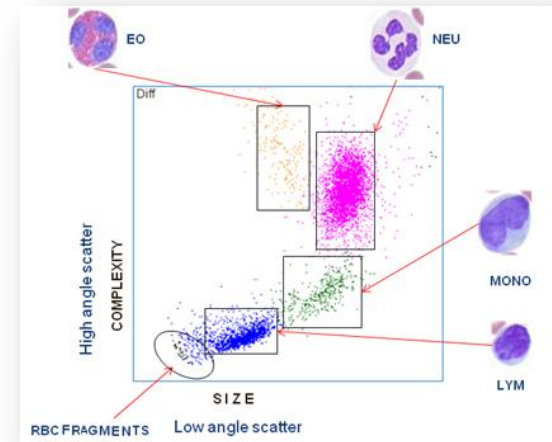
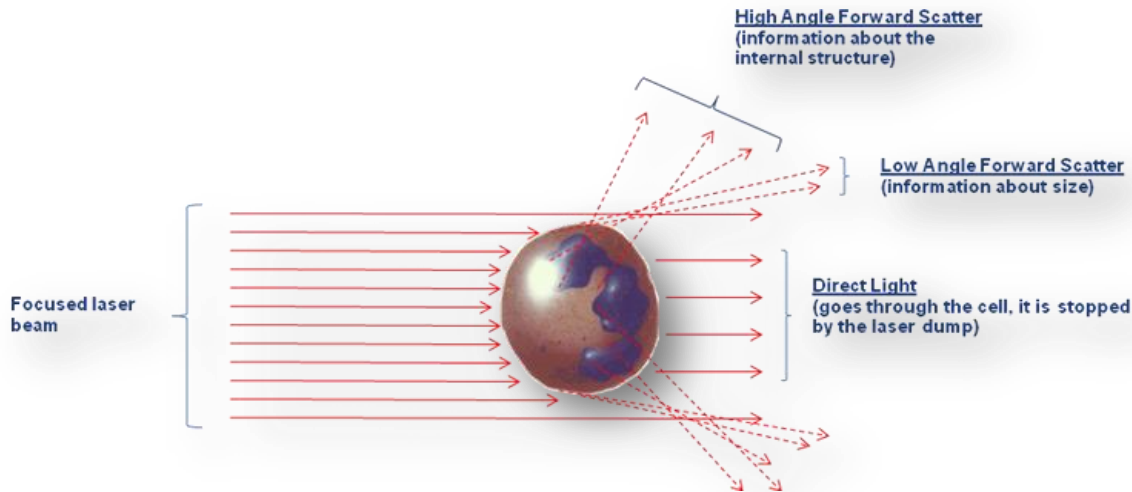
ЖИДКОСТНАЯ
ЦИТОХИМИЯ

ПРОТОЧНАЯ
ЦИТОФЛЮ-
ОРИМЕТРИЯ

ПРОТОЧНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ

Принцип:

- рассеяние лазерного луча света при прохождении через него клеток крови в потоке жидкости
- степень световой дисперсии позволяет получить представление о размерах и структуре (гранулярность) клетки
- распределение клеток разного размера и внутренней структуры отображается в графическом виде (скатерограммы) на экране прибора



- рассеяние света под малыми углами (от 1° до 10°) -данная характеристика используется для определения размеров клеток
- рассеяние света под **углом 90°** позволяет судить о соотношении ядро/цитоплазма, а также о неоднородности и гранулярности клеток

ПРОТОЧНАЯ ЛАЗЕРНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ

Возможности:

- быстрый анализ и определение каждой субпопуляции лейкоцитов
- получение данных для каждой конкретной клетки
- относительно простой и недорогой метод, недорогие реагенты

Недостатки:

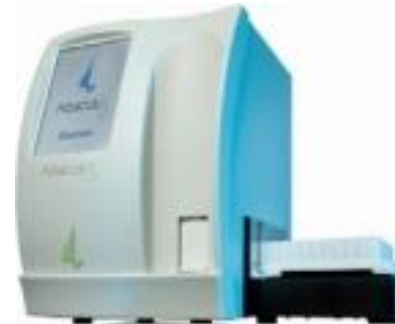
- невозможность определения незрелых, атипичных или специфических типов клеток



**Celltak MEK 7222/
8222/ 7300**
(Nihon Kohden, Япония)



Quintus
(Boule Medical AB, Швеция)

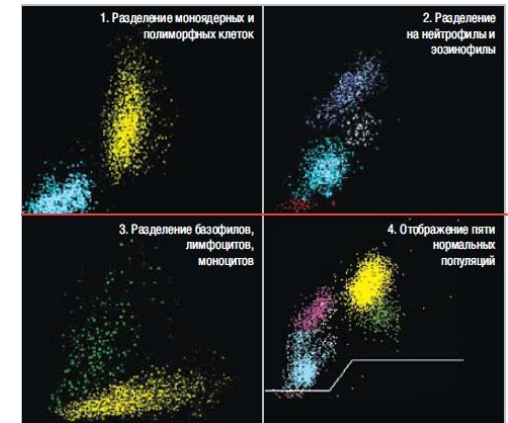
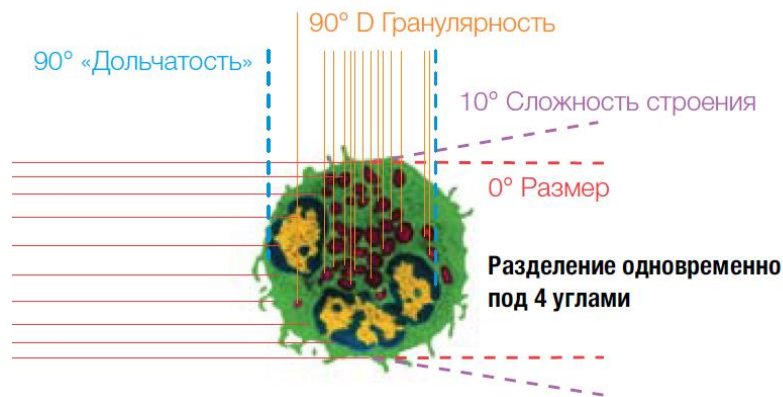


Abacus 5
(Diatron, Венгрия)

MAPSS™-ТЕХНОЛОГИЯ

Принцип:

- патентованная технология Multi Angle Polarized Scatter Separation – многоугловое разделение поляризованного пучка жидкости
- регистрация интенсивности рассеивания клетками поляризованного лазерного луча под разными углами и деполаризованного луча
- одновременный компьютерный анализ



Принцип дифференцировки и классификации клеток MAPSS

| Размер | Сложность | | | | Классификация | | | |
|--------|-----------|-----|-----|-----------------------|---------------|------|------|-------|
| | 0° | 10° | 90° | 90° D (деполяризация) | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 165 | 162 | 116 | 32 | POLY | NEUT | — | — |
| 2 | 60 | 64 | 15 | 6 | MONO | — | — | LYMPH |
| 3 | 140 | 79 | 21 | 99 | MONO | — | — | MONO |
| 4 | 148 | 182 | 104 | 118 | POLY | EOS | — | — |
| 5 | 90 | 110 | 28 | 8 | MONO | — | BASO | — |

- От 0° - размер клеток,
- До 7° - структура (степень сложности) клеток
- До 10° - ядерно-цитоплазматическое соотношение в клетках
- 90° - оценка формы клеточного ядра
- 90° деполаризованный свет - оценка клеточной зернистости

MAPSS™-ТЕХНОЛОГИЯ

Возможности:

- более точная дифференцировка лейкоцитов
- двухмерный оптический анализ тромбоцитов, трехмерный оптический анализ эритроцитов, четырехмерный оптический анализ лейкоцитов
- возможность определения ретикулоцитов (метиленовым синим NCCLS, технология прижизненной быстрой окраски)

Недостатки:

- невозможность определения специфических типов клеток



Cell-Dyn 3500
(Abbot Laboratories S.A., США)



Cell-Dyn Ruby
(Abbot Laboratories S.A., США)



URIT-5380
(Urit Medical, Китай)

VCS –ТЕХНОЛОГИЯ

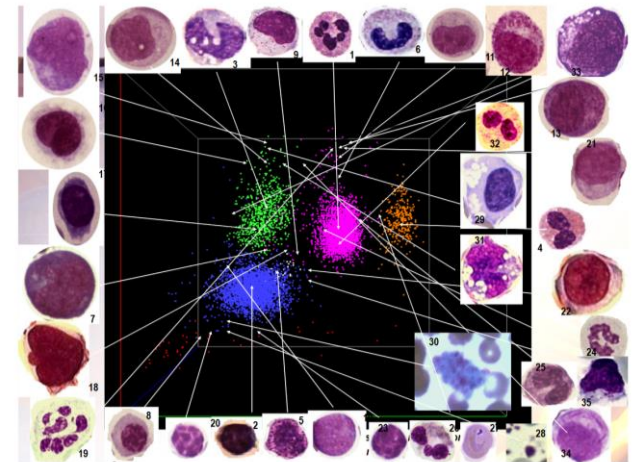
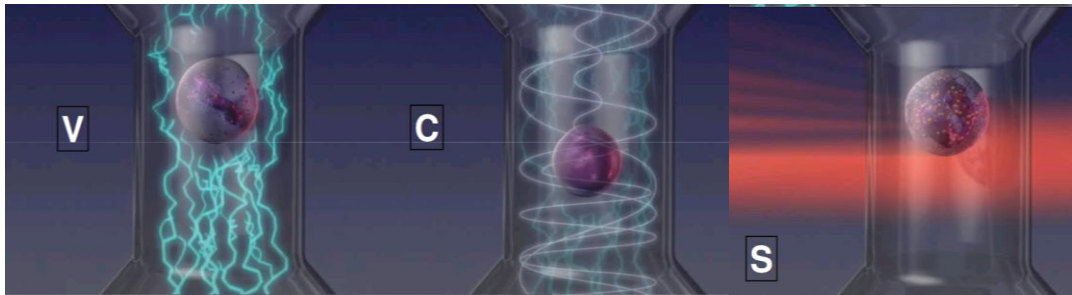
Принцип:

- основан на одновременном компьютерном анализе данных, полученных по трем каналам:

V (volume) - объем, измеряемый с использованием принципа Культера (сопротивление клеток для тока низкой частоты)

C (conductivity) - проводимость в токе высокой частоты, которая отражает величину и плотность внутренних структур клетки и дает возможность оценить объем клеточного ядра (электропроводность клеток для тока высокой частоты)

S (scatter) - рассеивание и поглощение лазерного луча дает информацию о гранулярности цитоплазмы, структуре клеточной поверхности и структуре ядра



VCS –ТЕХНОЛОГИЯ

Возможности:

- позволяет однозначно точно отнести каждую из анализируемых клеток к одной из пяти основных популяций, либо выявить присутствие атипичных клеточных популяций
- метод не нуждается в дополнительных математических расчетах и (или) дополнительных каналах анализа

Недостатки:

- невозможность определения специфических типов клеток



LH 500
(Beckman Coulter, США)

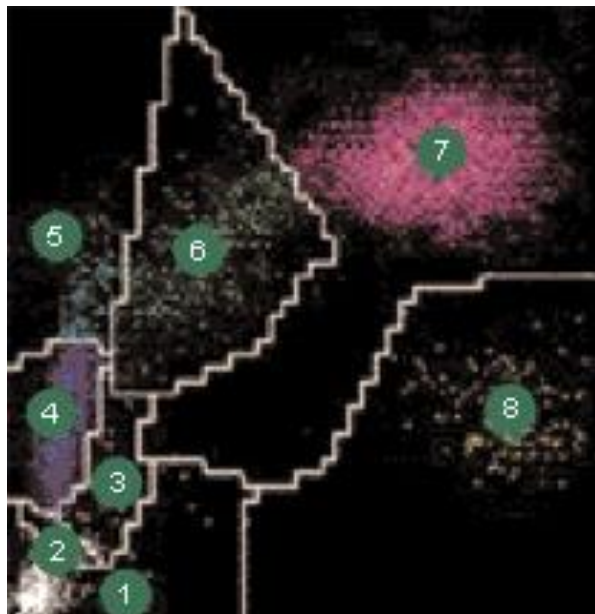


UniCell DxH 800
(Beckman Coulter, США)

ЖИДКОСТНАЯ ЦИТОХИМИЯ

Принцип:

- основан на различной активности пероксидазы в лейкоцитах (Перокс-канал) в сочетании с другими 3- и 5-дифф методами
EOS (8) и NEUT (7) – интенсивная пероксидазная активность
MON (6) – слабая пероксидазная активность
LYM, BAS (4) – пероксидазная активность отсутствует
- лизис всех лейкоцитов, кроме базофилов
- проточная лазерная цитометрия (под углами 2-3 град и 5-15 град) для регистрации рассеянного и поглощенного луча для дифференцировки BAS (BAS-канал)



ЖИДКОСТНАЯ ЦИТОХИМИЯ

Возможности:

- сравнивая информацию с Perox- (в сочетании с лазерным рассеиванием (размер) и поглощением светового потока) и BASO-каналов дифференцировка клеток осуществляется наиболее точно
- сигнализация в виде «флагов» о наличии активированных LYM, незрелых гранулоцитов, бластов, эритробластов
- анализ других биологических жидкостей



Pentra DX 120

(HORIBA ABX Diagnostics Inc.,
Франция)



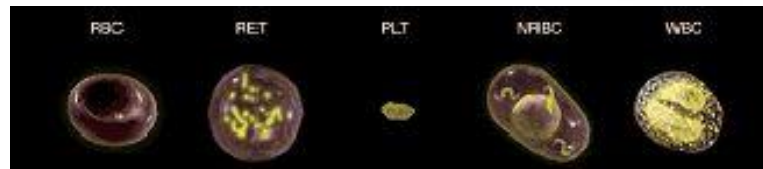
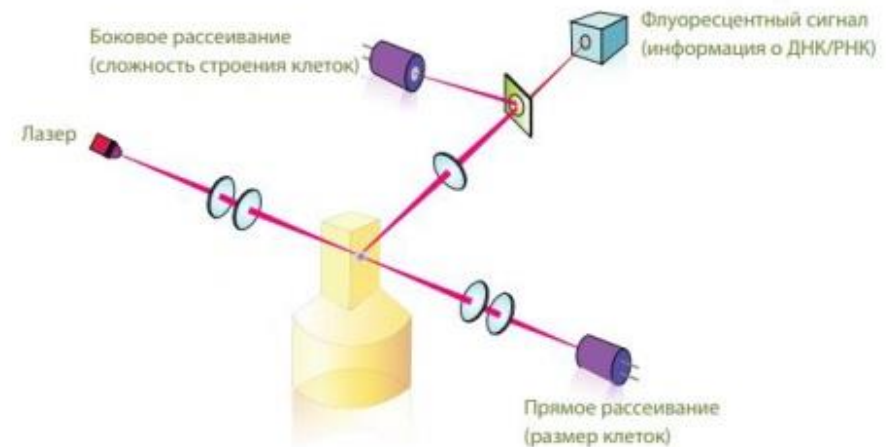
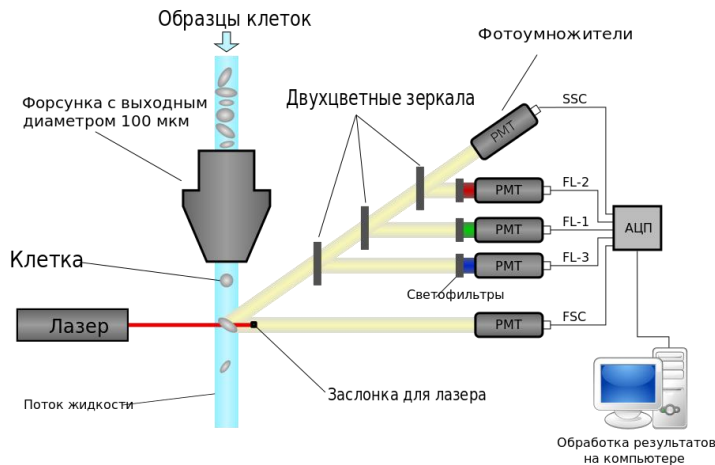
Advia 2120i

(Siemens Healthcare
Diagnostics Inc., США)

ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИЯ

Принцип:

- основан на использовании флуоресцентного красителя полиметина, который связывается с ДНК и РНК неизменных клеток (концентрация НК в клетке прямо пропорциональна величине флуоресцентного сигнала)
- применяется совместно с проточной лазерной цитометрией (3D анализ).
FSC (прямое светорассеяние) – отклонение луча до 10° – форма и размер клетки
SSC (боковое светорассеяние) – отклонение луча до 90° – структура (степень сложности) клеток
SFL (определение специфического флуоресцентного сигнала) – отклонение луча 90° (содержание РНК/ДНК в клетках)



ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИЯ

Возможности:

- технология позволяет выделять такие параметры, как:

IMG*(#, %) - подсчет незрелых гранулоцитов, включая промиелоциты, миелоциты и метамиелоциты

HFC*(#, %) - клеточные популяции с высоким уровнем флуоресценции

RET(#, %) – ретикулоциты, неоценимы при дифференциальной диагностике и (или) терапевтическом мониторинге анемии.

IRF - незрелые ретикулоциты и может помочь в ранней диагностике анемии и отслеживании реакции костного мозга на терапию

InR*(#, %) – инфицированные эритроциты (например плазмодием — возбудителем малярии)

NRBC (#, %) – ядросодержащие эритроциты (с коррекцией WBC)

- улучшение качества подсчета лейкоцитарной формулы
- высокий диапазон линейности
- 48 часов стабильности образца после взятия
- анализ других биологических жидкостей



Sysmex XE-2100, XT-4000i, 2000i, 1800i

(Toa Medical , Япония)



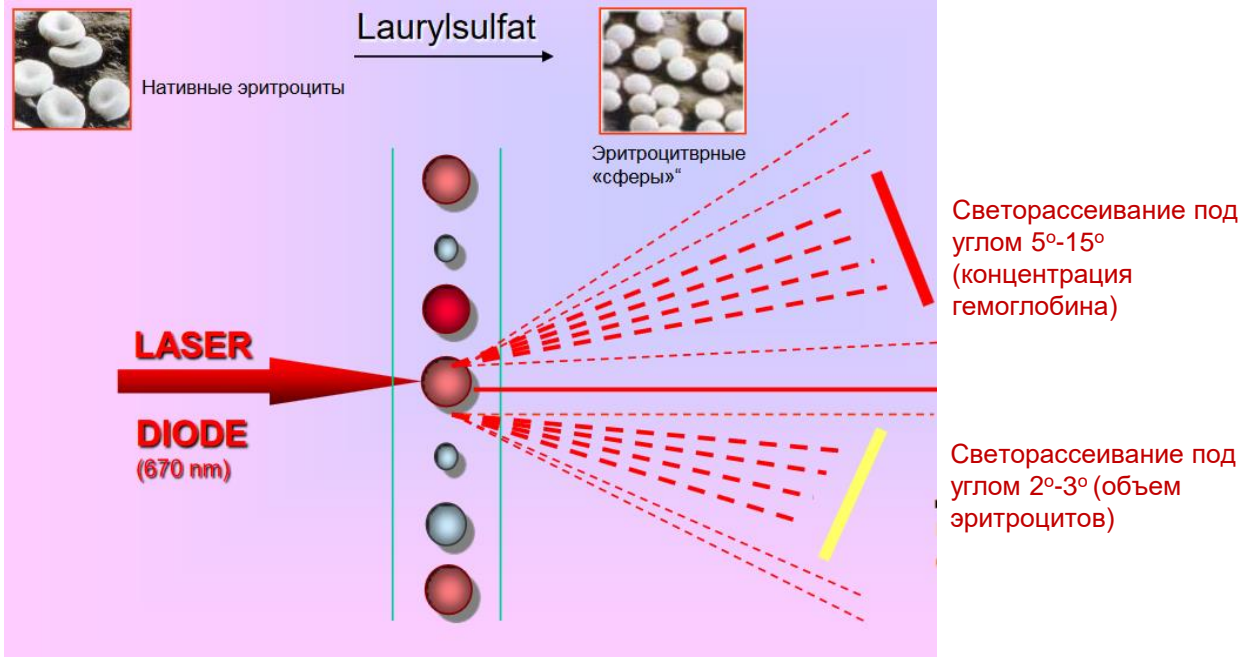
BC-6800

(Mindray, Китай)

ИЗОВОЛЮМЕТРИЧЕСКОЕ СФЕРИРОВАНИЕ (isovolumetric sphering)

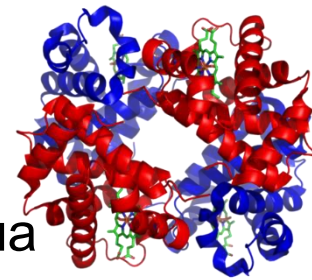
Возможности:

- позволяет помимо оценки классических эритроцитарных параметров (RBC, MCV, MCH, MCHC) измерять концентрацию гемоглобина непосредственно в каждом эритроците
- метод сферизации эритроцитов (свертывание эритроцитов в форму, близкую к сферической) с сохранением объема и с сохранением площади поверхности мембраны



Advia 2120i
(Siemens Healthcare
Diagnostics Inc., США)

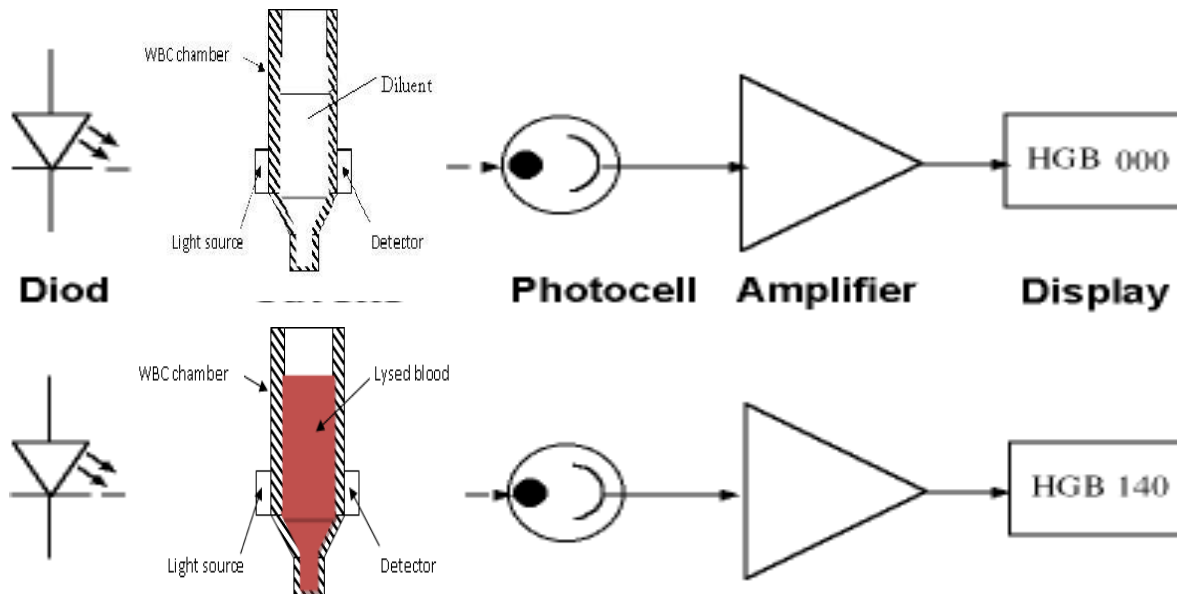
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА



Принцип:

- анализ оптической плотности раствора лизированной крови на необходимой длине волны:

1. Разведение образца дилуентом
2. Добавление в разбавленный образец лизирующего реагента (разрушение клеточной стенки эритроцитов и гемоглобин свободно растворяется в пробе)
3. Перемешивание образца для получения однородной смеси
4. Фотометрическое измерение оптической плотности образца



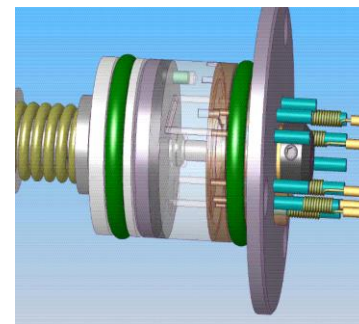
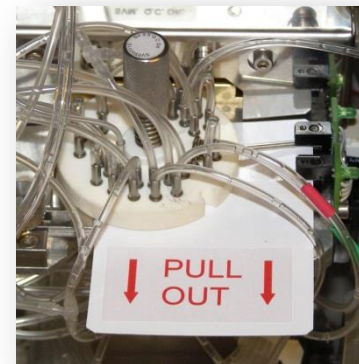
ПОВОРОТНЫЙ (СДВИЖНОЙ) КЛАПАН

Принцип:

- отсекаание пластинами клапана точного объема крови для дальнейшего разведения

Возможности:

- совершенная система дозирования приводящая к высокоточным результатам (низкий коэффициент вариации)
- низкие затраты на обслуживание



Swelab Alfa
(Boule Medical AB, Швеция)



Sysmex XP-300
(Тоа Medical, Япония)



Sysmex KX-21
(Тоа Medical, Япония)

ШПРИЦЕВОЕ ДОЗИРОВАНИЕ

Принцип:

- аспирация точного объема крови за счет разряжения, создаваемого поршнями шприцов

Возможности:

- аспирация малого объема крови

Недостатки:

- необходимость частого обслуживания и замены элементов



URIT-3020
(Urit Medical, Китай)



DREW-3
(Drew Scientific,
Великобритания/США)



BC-3000 plus
(Mindray, Китай)

Спасибо за внимание



Захарченко Андрей Владимирович

Начальник отдела «Гематология»

Кандидат биологических наук

тел.: 8 (495) 980-63-39, доб. 56-39

факс: 8 (495) 980-66-79

моб.: 8 (915) 392-68-54

e-mail: a.zakharchenko@diakonlab.ru



ЗАО «ДИАКОН» 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Грузовая, 1а

Телефон горячей линии: 8 (800) 200-63-39

www.diakonlab.ru