

# Hematologické analyzátory

Bourková L., OKH FN Brno

# Typy hematologických analyzátorů

- bez diferenciálního rozpočtu WBC
- s třípopulační diferenciálním rozpočtem WBC
- s pětipopulační diferenciálním rozpočtem WBC
- s pětipopulačním diferenciálním rozpočtem WBC, NRBC, RETI, vybrané povrchové CD antigeny (WBC, PLT)

# Principy hematologických analyzátorů

- každý má svá jedinečná specifika
- dva základní principy měření:
  - optický
  - impedanční
- z měření získáváme informace o:
  - počtu buněk (*kvantitativní analýza*)
  - velikosti, tvaru a složení buňky (*kvalitativní analýza*)
- principy měření mohou být na jednotlivých analyzátorech různě kombinovány
- různé kombinace pak umožňují různě přesnou kvantitativní i kvalitativní analýzu všech prošlých buněčných elementů

# Principy měření

- absorpční spektrofotometrie
- *mikrohematokritová metoda*
- impedanční analýza
  - možné doplnění vysokofrekvenční analýzou
- optická analýza
  - prošlého světla
  - rozptýleného světla
  - fluorescence
  - *cytochemická*

# Používaná diagnostika

- analýza nesrážlivé periferní krve
  - rutinní odběr do solí EDTA ( $K^{2+}$ ,  $K^{3+}$ ,  $Na^{2+}$ )
- ředící roztoky
  - *impedanční analýza*  
*vodivý roztok + nevodivá buňka*
  - *optická analýza*  
*opticky inaktivní roztok + opticky aktivní buňka*
- lyzační roztoky  
*hemolýza erytrocytů*
- barvicí roztoky  
*barvení obsahu buňky (granula, DNA, RNA)*
- čistící roztoky  
*čištění měřícího systému*

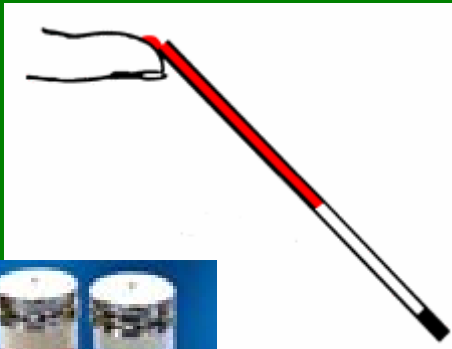
# Absorbční spektrofotometrie

- Metoda slouží ke stanovování množství hemoglobinu ve vzorku.  
*V dnešní době se již jedná většinou o bezkyanidové metody.*

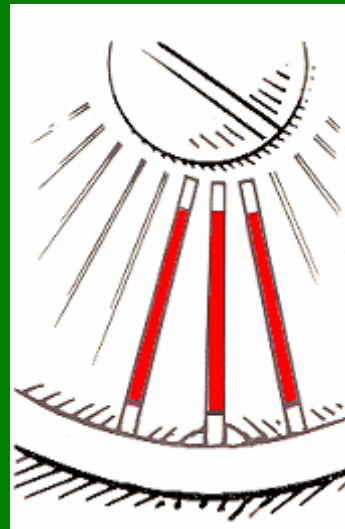
# Mikrohematokritová metoda

- Centrifugační metoda v mikrohematokritových kapilárách pro stanovení PCV – (*Packet Cell Volume*), metoda je méně častá
  - většinou se vydává počítaný parametr  
 $HCT = MCV \times RBC$

odběr



centrifugace



# Impedanční analýza - I

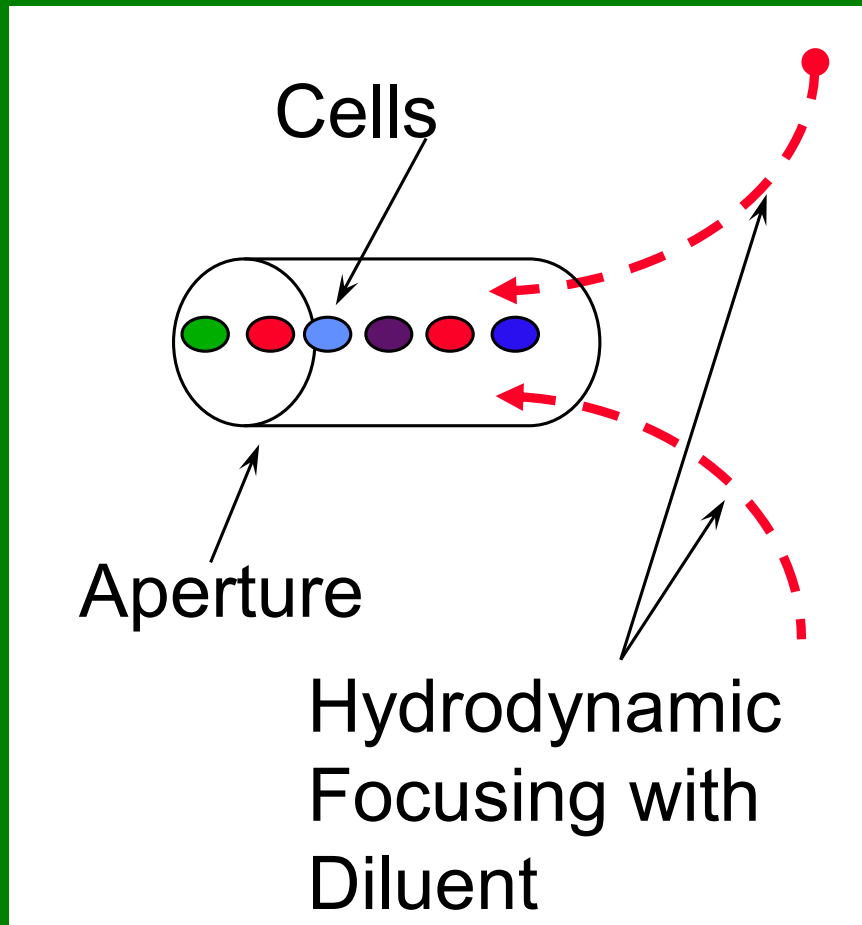
- buňky (*nevodivé*) jsou suspendovány ve vodivém roztoku (*diluent*)
- mezi elektrodami je v apertuře standardní vodivost (standardní vodivost diluentu)
- při průchodu buňky aperturou se vodivost naruší ■■■■mpedanční impulz (odpor)
- četnost impulzu ■■■■ počet buněk  
velikost impulzu ■■■■ velikost buňky



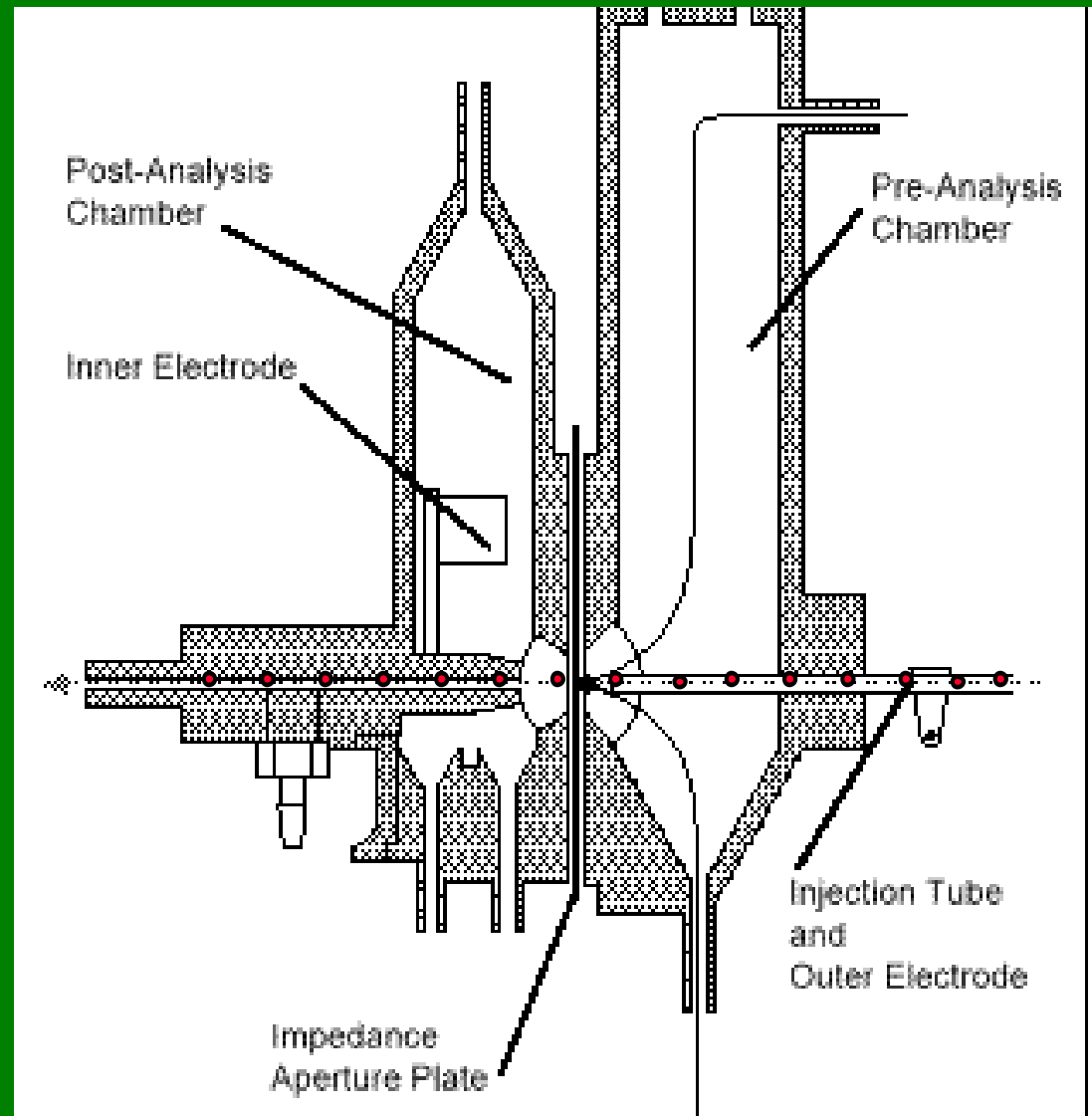
# Impedanční analýza - II

- využívá se hydrodynamická fokusace: unášení jednotlivých buněk proudem kapaliny
- měření může být doplněno například vysokofrekvenční analýzou:  
na stejnosměrné elektrické pole je superponováno vysokofrekvenční elektrické pole, které pronikne cytoplazmou a změří vysokofrekvenční vodivost buňky - její fyzikálněchemickou strukturu  
*(kvalitativní analýza buňky)*

# Hydrodynamická fokusace



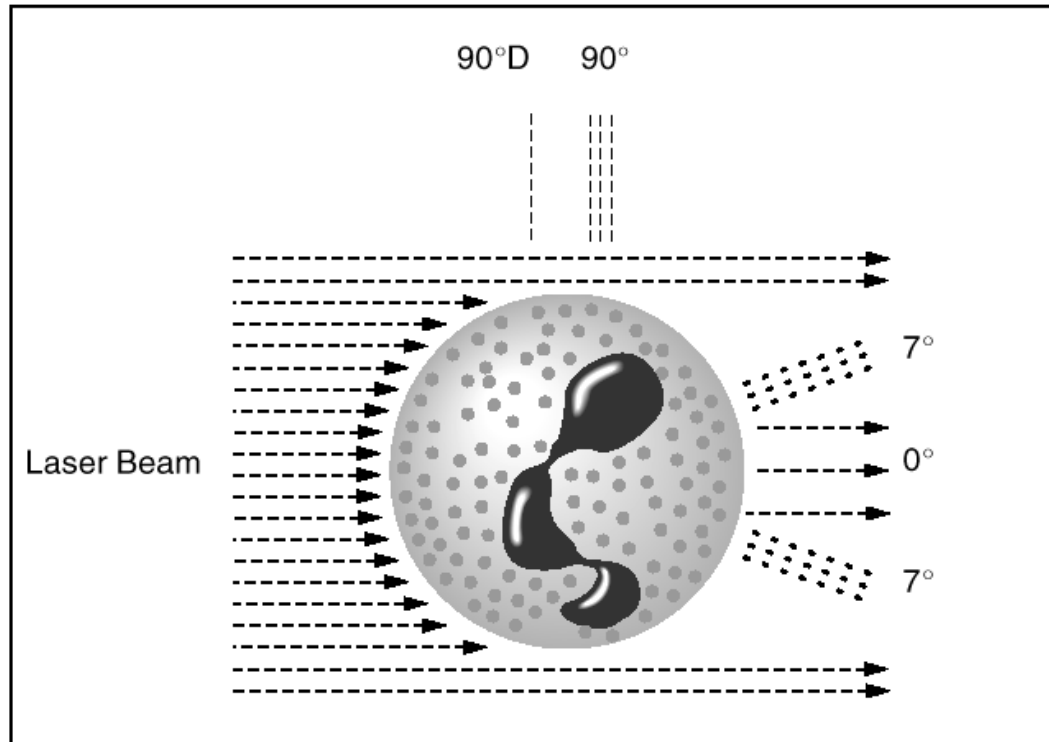
# Impedanční analýza



# Optická analýza

- využívá se průtoková cytometrie:
  - po interakci buňky s laserovým paprskem se provádí analýza
  - slouží jako metoda pro analýzu jednotlivých buněk v buněčné suspenzi.
  - buňky prochází průtokovou kyvetou jedna za druhou pomocí hydrodynamické fokusace
- laserový paprsek po průchodu každou jednotlivou buňkou je podroben analýze
  - detekuje se
    - prošlé světlo
    - rozptýlené světlo
    - fluorescence

# Optická analýza



# *Analýza prošlého světla*

- Detekce paprsku ve směru  $0^\circ$  udává hodnoty:
  - počet prošlých buněk
  - velikosti jednotlivých buněk

# *Analýza rozptýleného světla*

- Každá buňka je ozářena proudem polarizovaného světla (laserový paprsek) a po projití paprsku buňkou je provedena analýza depolarizovaného (rozptýleného) paprsku v různých detekčních úhlech.
- Analýza může být u některých přístrojů doplněna cytochemickým barvením buněk. Jednotlivé buňky jsou po nabarvení také ozářeny laserem a opět se vyhodnocuje výsledné depolarizované světlo.
- Měření slouží nejen k početní analýze, ale i k detekci tvaru a velikosti buňky, jádra a granularity cytoplazmy

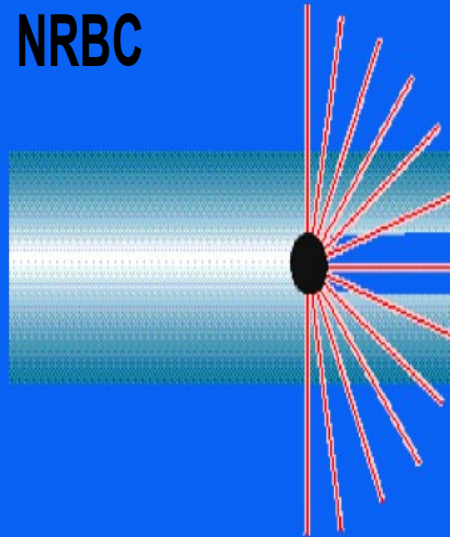
# *Analýza fluorescence*

- Určité komponenty buňky jsou nejprve obarveny speciálními barvami, a potom jsou takto obarvené buňky (*každá jednotlivě*) ozářeny polarizovaným paprskem světla (*laserovým paprskem*).
- Každá buňka nejprve světlo absorbuje, a potom světlo emituje o vyšší vlnové délce, která je detekována a analyzována.
- Měření složí k detekci DNA nebo RNA v buňkách nebo ke specifikaci buněk na základě přítomných povrchových antigenů (CD znaky).

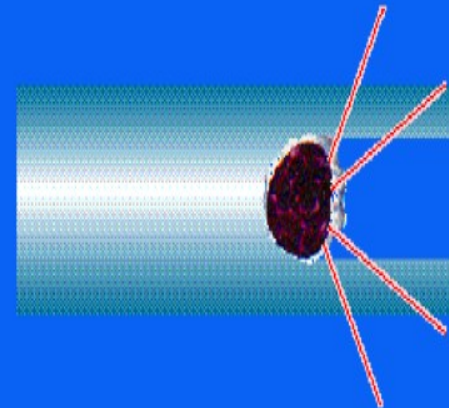


# *Analýza fluorescence*

**NRBC**



**WBC**



# *Cytochemická analýza*

- v buňkách (WBC) je barvena peroxidáza např. Sudanovou černí
- cytochemická analýza je vždy kombinovaná současně s jinou analytickou metodou (optickou)

# Obecná pravidla pro měření KO

pravidelná kontrola KO i dif

- kontrola správnosti (firemní materiál)
- kontrola přesnosti (čerstvý vzorek)
- porovnatelnost
  - metodik, přístrojů, laboratoří
  - kontrola dif z analyzátoru mikroskopicky
- správná údržba přístroje
  - kontrolní měření

# Obecná pravidla pro vyhodnocování KO + dif

- specifická pravidla pro daný analyzátor:
  - technologie přístroje
  - používaná diagnostika
  - princip měření
  - rozsah hodnot měřených parametrů
  - linearitu jednotlivých parametrů
  - limity pro „background“ měřených parametrů
  - hlášení přístroje
- klinická hlediska:
  - diagnóza
  - historie pacienta (LIS)

# Hodnocení KO

- numerické výsledky
  - přímo měření
  - počítané
- grafické výsledky
- hlášení analyzátoru
- hodnotit KO jako celek
  - *nepřesné stanovení jedné složky ovlivní nepřesné stanovení jiné složky → klinické následky*
  - *poznat interferenci, znamená vydávat správné výsledky*
- *kontrola mikroskopem: patologie početní i morfologické, interference*

# Parametry KO

- WBC,dif ( $10^9/L$ , %)
- RBC ( $10^{12}/L$ )
- HGB (g/L)
- MCV (fL)
- HCT (RBCxMCV) (L/L)
- MCH (HGB/RBC) (pg)  
průměr celkového HGB na jeden erytrocyt
- MCHC (HGB/HCT) (g/L)  
průměr koncentrace HGB na jeden erytrocyt
- RDW (MCV) (%CV)  
heterogenita RBC populace
- PLT ( $10^9/L$ )
- MPV (fL)
- PCT (PLTxMPV) (mL/L)
- PDW (MPV)  
heterogenita PLT populace
- RETI ( $10^9/L$ , %)  
nezralé RETI/všechny RETI
- IRF (1/1)  
nezralé PLT/všechny PLT
- IPF (%)  
nezralé PLT/všechny PLT
- NRBC ( $10^9/L$ )
- vybrané CD znaky

-----  
- speciální hlášení

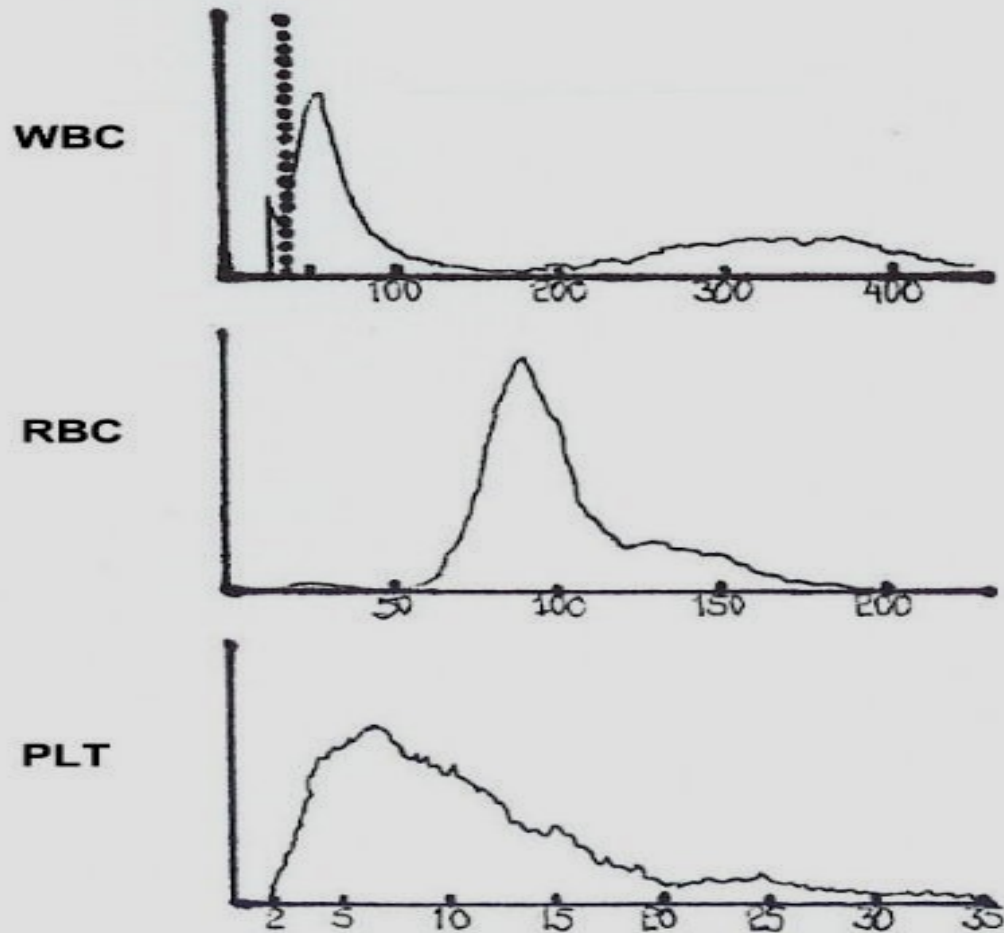
# Hodnocení WBC

- počet WBC + dif (*relativní i absolutní počty*)
- vyváženost rozpočtu v dif a patologické elementy
- patologická hlášení

❖ *ovlivnění počtu WBC i dif: NRBC, rezistentní RBC, PLT sraženiny, agregáty, satelitóza PLT, holá jádra, kryoproteiny, monoklonální protilátky, lipidy, heparin*

*pozn.: NRBC, resRBC falešně zvyšují počty WBC i lymfocytů v dif*

# Impedanční histogramy





# Hodnocení RBC - I

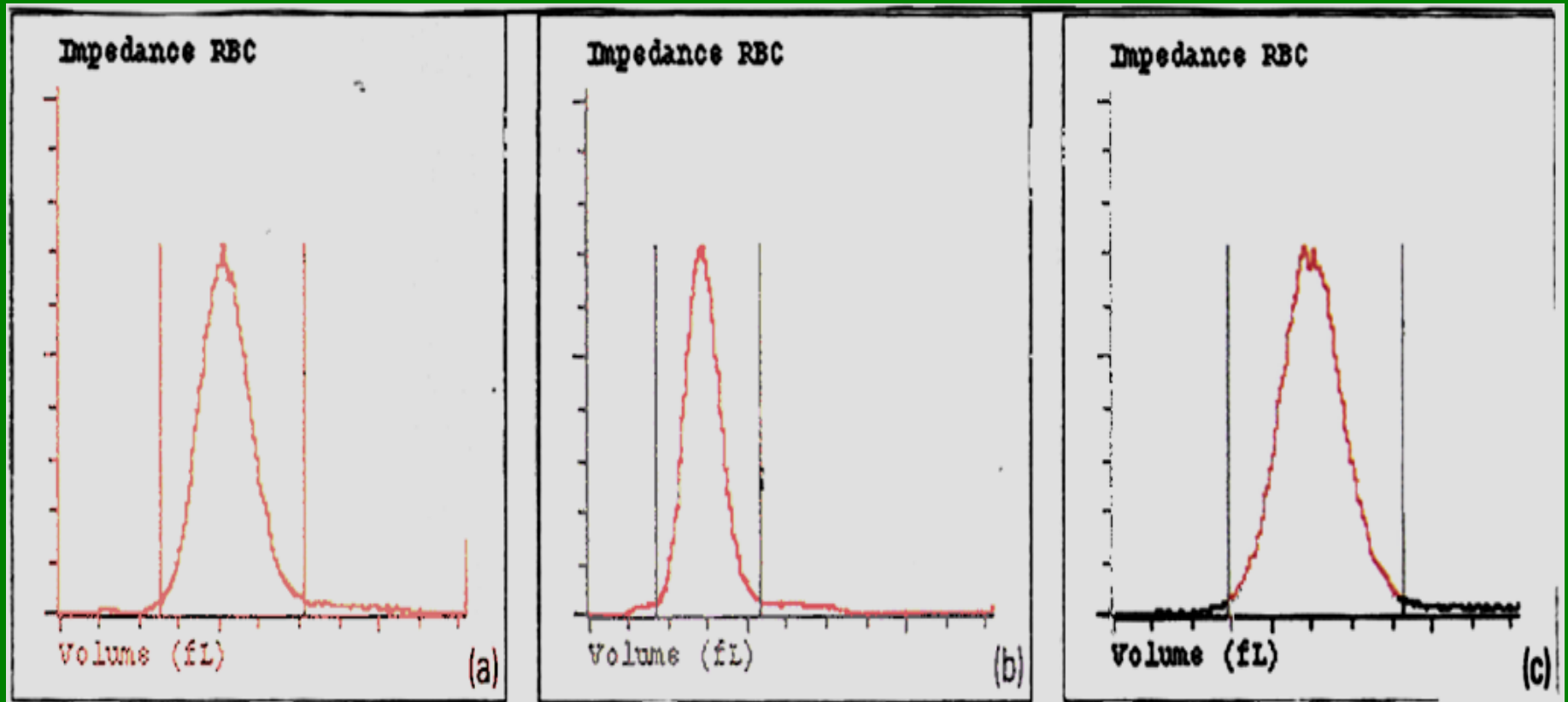
- měřené parametry: RBC, HGB, MCV
- počítané parametry: HCT, MCH, MCHC  
RDW + distribuční křivka (šířka, vrcholy)
- ❖ *ovlivnění: mikro RBC, makro PLT (sraženiny), aglutinace*

# Hodnocení RBC - II

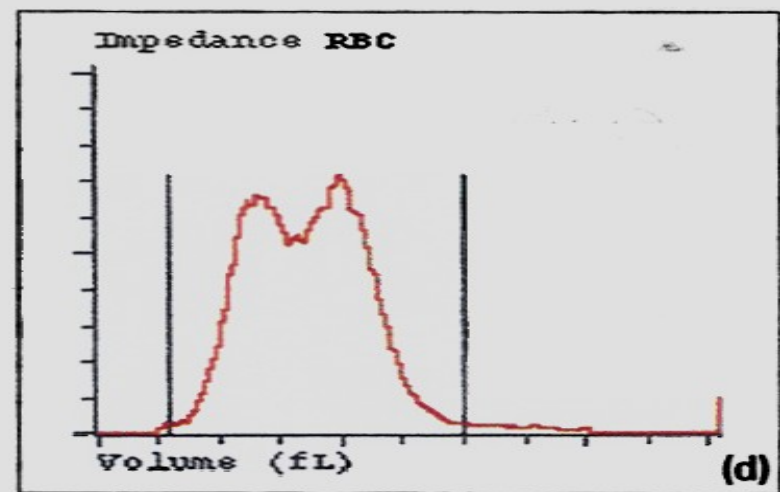
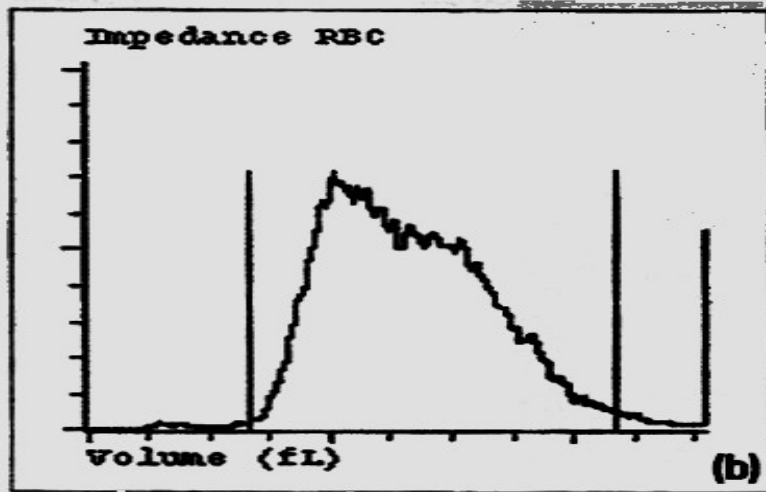
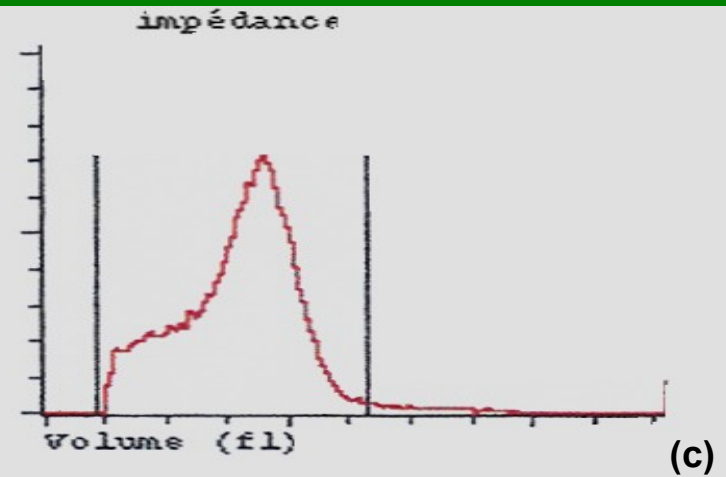
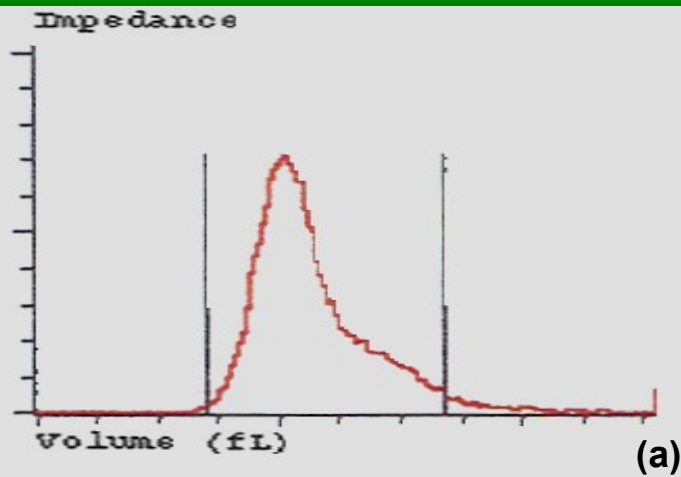
Z měřených parametrů nelze jasně sledovat morfologii.

Z vypočítaných parametrů a distribučních křivek lze sledovat:

- MCH, MCHC: normochromie, hypochromie, hyperchromie
- RDW+křivka: homogenita, heterogenita populace, (*pozn.: MCV - jen střední objem, nic neříká o rozložení celé populace*), léčba (*např.: transfúze, megaloblastová anémie*)



Impedanční histogramy RBC- RDW normál  
(a) - normál (b) - mikrocyty (c) - makrocyty

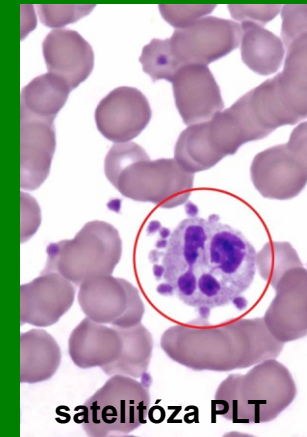
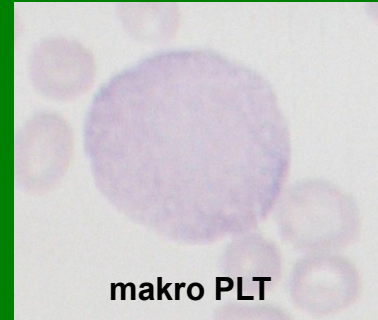


## Impedanční histogramy RBC - RDW vysoké

- (a) - příměs makrocytů (c) - masivně mikrocyty (schi)
- (b) - vysoký podíl makro (d) - mikrocyty + normocyty

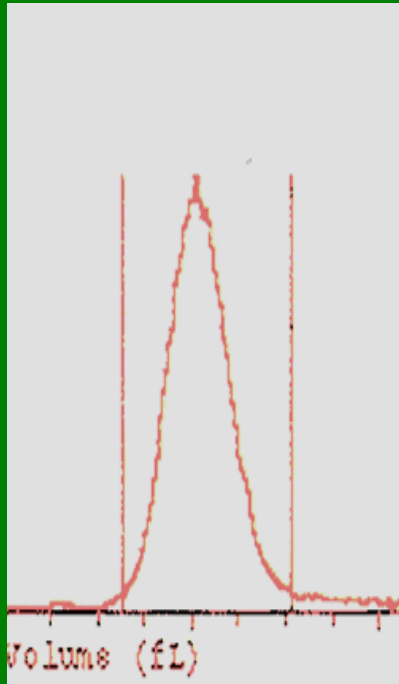
# Hodnocení PLT - I

- měřené parametry:  
PLT, MPV
- počítané parametry:  
PDW + distribuční křivky

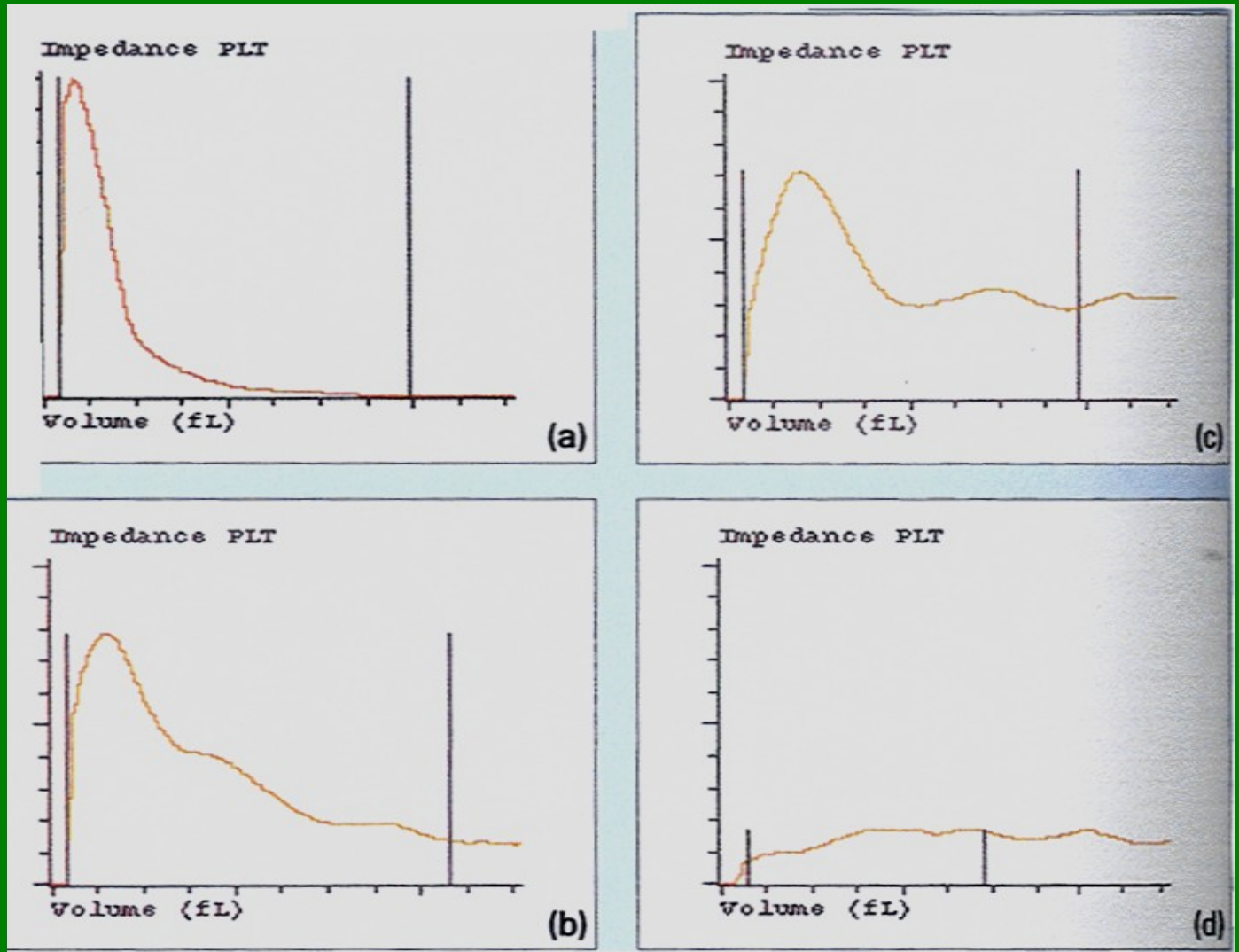


❖ *ovlivnění: mikro RBC, makro PLT, sraženiny, buněčné/nebuněčné fragmenty, makromolekuly proteinů, lipidy, hypogranulace PLT, kontaminace diagnostik*

Z vypočítaných parametrů a distribučních křivek lze sledovat: homo/heterogenity PLT, netrombocytární příměsi



normál



## Impedanční histogramy PLT

(a) - dolní interference (b-d) - horní/dolní interference

# Hodnocení PLT - II

Kontrola:

- mikroskopicky:
  - pod  $80 \times 10^9/L$
  - po zvážení (např.morfologické abnormality)
- odběr do zkumavek ThromboExact nebo do citrátu (falešné trombocytopenie)
- opticky (vyloučí netrombocytární elementy)
- imunologicky (CD61) po zvážení (trombokonzentráty, gigantické PLT)

Pozor na falešné trombocytopenie:

- vliv EDTA
- satelitóza PLT