

Hematologické analyzátořy

(Analyzátořy v hematologické laboratoři)

Magdaléna Jelínková

Oddělení dětské hematologie a biochemie FN Brno



Analyzátory v hematologické laboratoři

- ✓ Hematologické analyzátory
- ✓ Digitální morfologie (DM)
- ✓ Koagulometry
- ✓ Flowcytometry (FCM)
- ✓ Agregometry
- ✓ PFA
- ✓ Trombinoskop (TGA)
- ✓ Vidas

-
- ✓ Trombelastograf (TEG)
 - ✓ ACT

-
- ✓ Selfmonitoring

Hematologické analyzátory

(analyzátory krevních elementů)

- poloautomaty
- automatické analyzátory
- zařazení do linky
- 3populační diferenciál
- 5populační diferenciál (6populační(+IG))
+ retikulocyty + normoblasty
- Až cca 80 měřených a počítaných parametrů
- Hematologické linky:
 - + nátěrový automat
 - + barvicí automat
 - + digitální morfologie



Zjišťované základní veličiny

Přímo měřené

- RBC
- WBC
- PLT
- MCV
- Hgb
- Neut
- Lym
- Eos
- Baso
- Mono
- Ret
- NRBC

Počítané

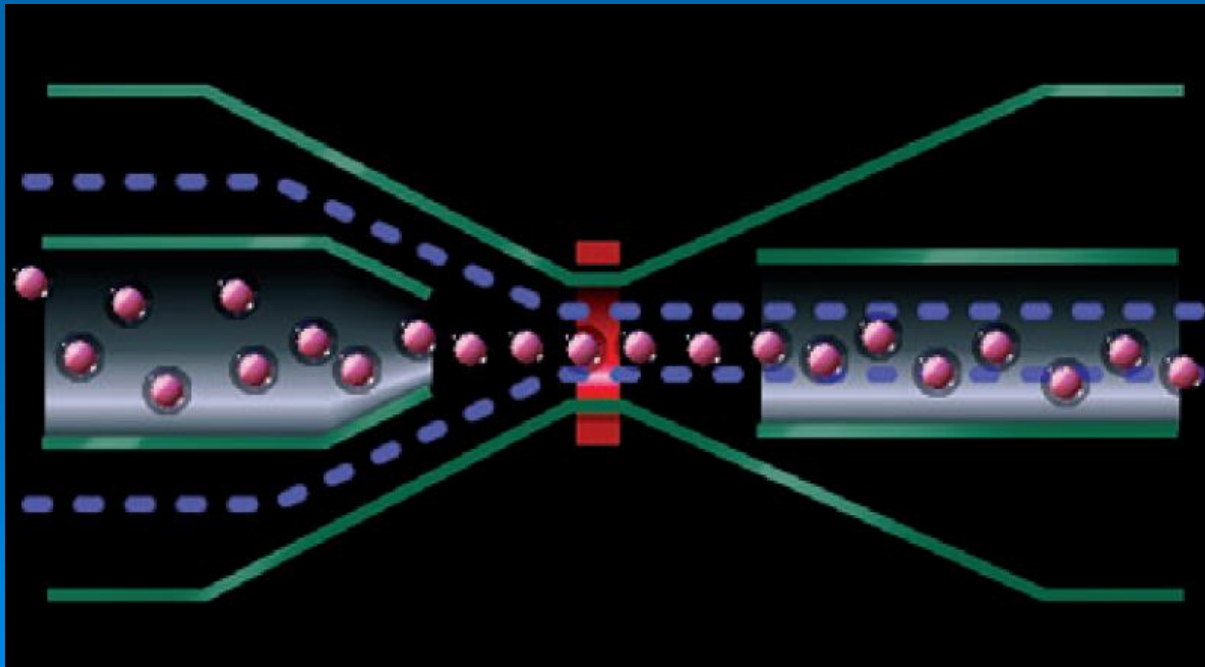
- HCT
- RDW
- MCHC
- MCH

- Parametry destiček
- Parametry retikulocytů
- ...

Průtoková cela

➤ Hydrodynamická fokusace

- hydrodynamicky zaostřený proud (laminární proudění)
- Reagencie (izotonický roztok) obalí vzorek krve



Různé principy

- Impedance
- Optika
 - fluorescenční průtoková cytometrie
 - rozptyl laserového paprsku
- Vysokofrekvenční elektrické pole
- Cytochemické metody
- Imunofluorescenční metody

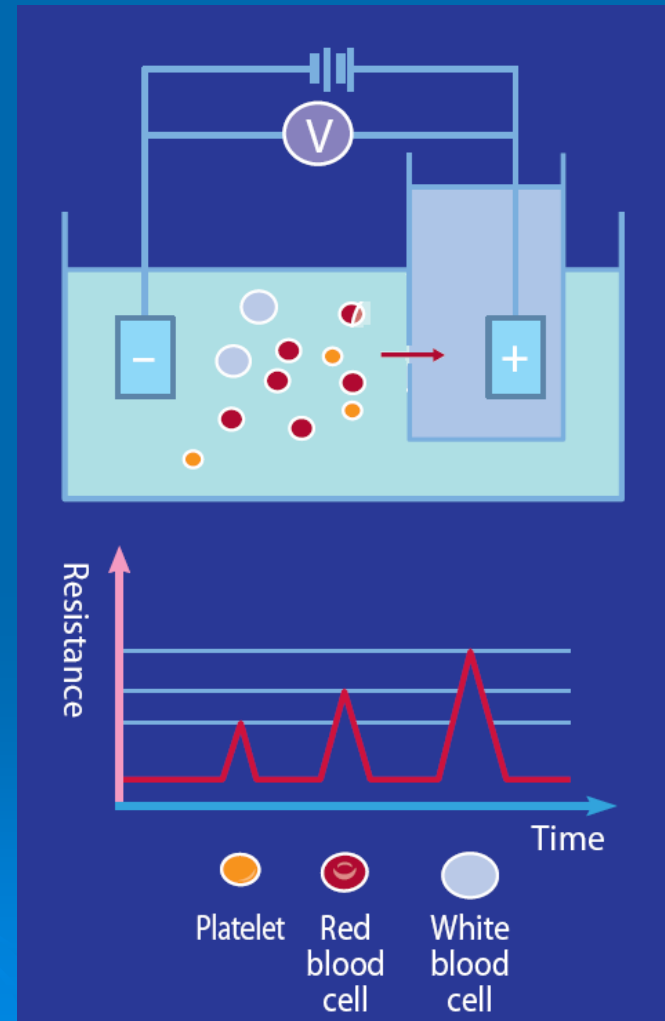
Příklad jednoho typu analyzátoru

Channels

Channel	Principle / Dilution	Parameters
DIFF	Fluorescence Flow Cytometry / 1:94	WBC # Lymph #, Lymph %, Mono #, Mono %, Eo #, Eo %, Neut #, Neut % Baso #, Baso %
HGB	SLS-Method, Photometric 1:751	HGB ↓ MCH, MCHC, MCV
RBC/PLT-Detector	Impedance method/ Hydrodynamic Focusing 1:500	RBC, HCT, PLT-i, RDW-SD, RDW-CV, PDW, MPV, P-LCR ↑ MCH, MCHC, MCV

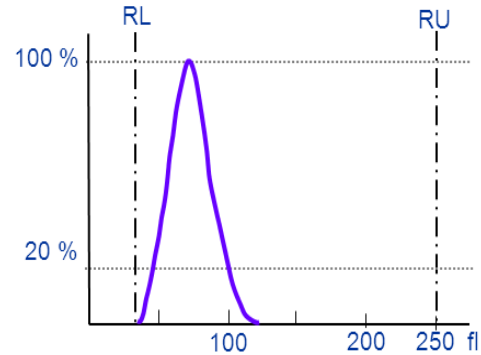
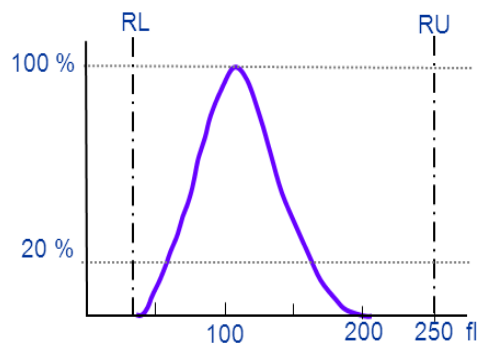
Impedance

- Vně i uvnitř měřící kyvety – polarizované **stejnoseměrné elektrické pole** (2 elektrody)
- Vnikne-li částice do kyvety – **změna odporu prostředí**
- Každá buňka vybudí jeden napěťový **impuls**, jehož velikost je přímo úměrná objemu částice
- Stanovení počtu **RBC, PLT**



Impedance – histogramy I

Macrocytosis/ Microcytosis



Fotometrie – stanovení **koncentrace hemoglobinu**

REFERENČNÍ METODA

Kyanmethemoglobinová metoda



Spektrofotometrie

absorbční maximum při 540 nm (přímo úměrné konc. Hb)

Stabilní pigment, **toxický**, dlouhá reakční doba

Fotometrie – stanovení **koncentrace hemoglobinu** (současnost)

Bezkyanidová metoda (SLS)

Lýza krvinky – uvolnění intracelulárního HGB



SLS = laurylsulfát sodný

reakce 10 s

absorbance 555 nm

Stanovení diferenciálu leukocytů

➤ Optické metody

- Fluorescenční průtoková cytometrie (FCM)
- Rozptyl laserového paprsku

➤ Vysokofrekvenční elektrické pole (VCS)

➤ Cytochemické metody

➤ Imunofluorescenční metody

Optické metody

➤ Buňky jsou vystaveny úzkému paprsku světla

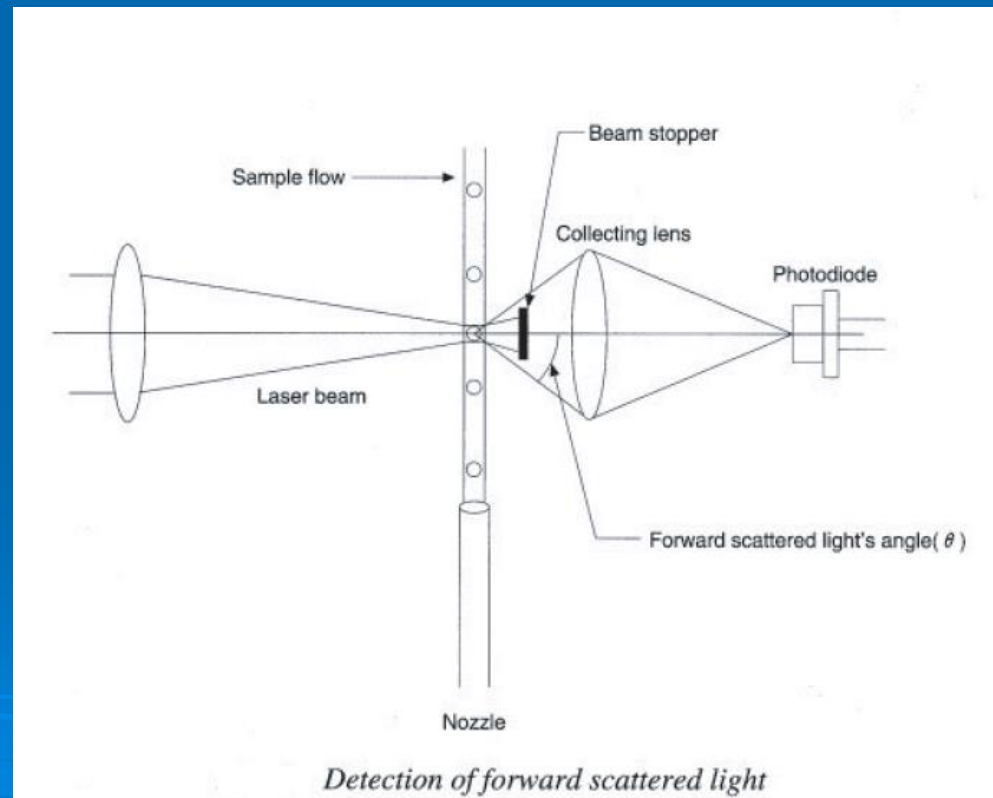
- Rozptyl světla (různé úhly, polarizace)
- Absorpce (barvení)
- Fluorescence (barvení)

- Lampy (wolframová, Hg, Xe)
- Lasery (Ar, Kr, HeNe, HeCd, semikonduktorové)
- Diodové lasery (modrý, zelený, červený, fialový)

Optické metody – rozptyl laserového paprsku

a) Čelní rozptyl světla = forward scatter light (FSC)

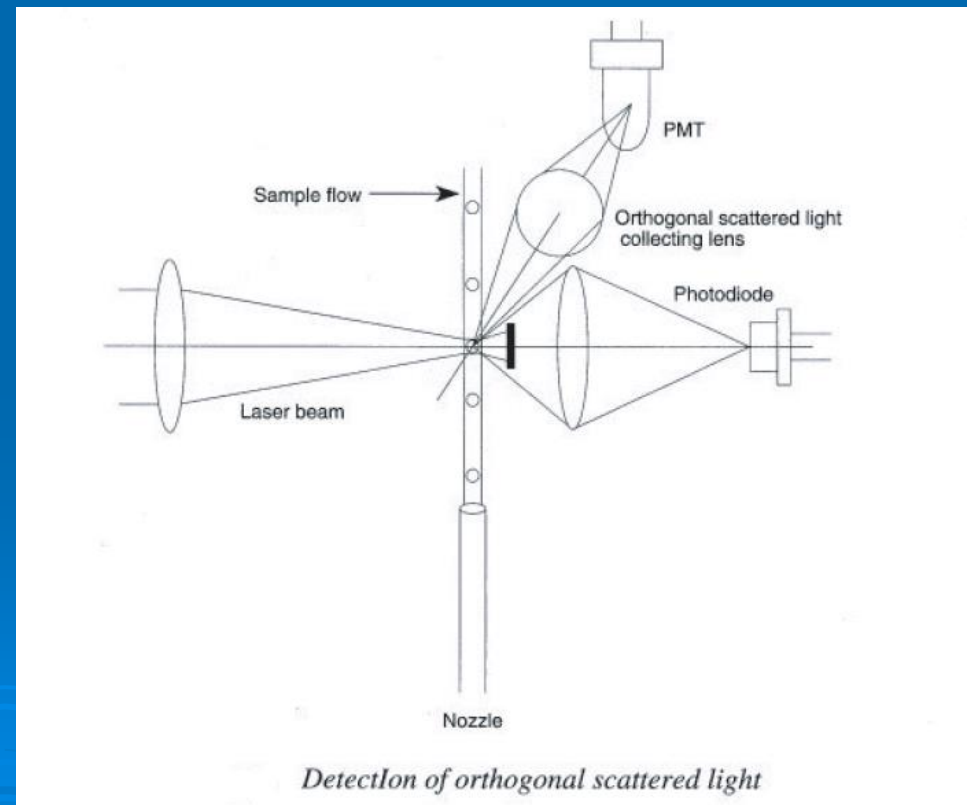
- Malý úhel (1-6 °)
Objem buněk



Optické metody – rozptyl laserového paprsku

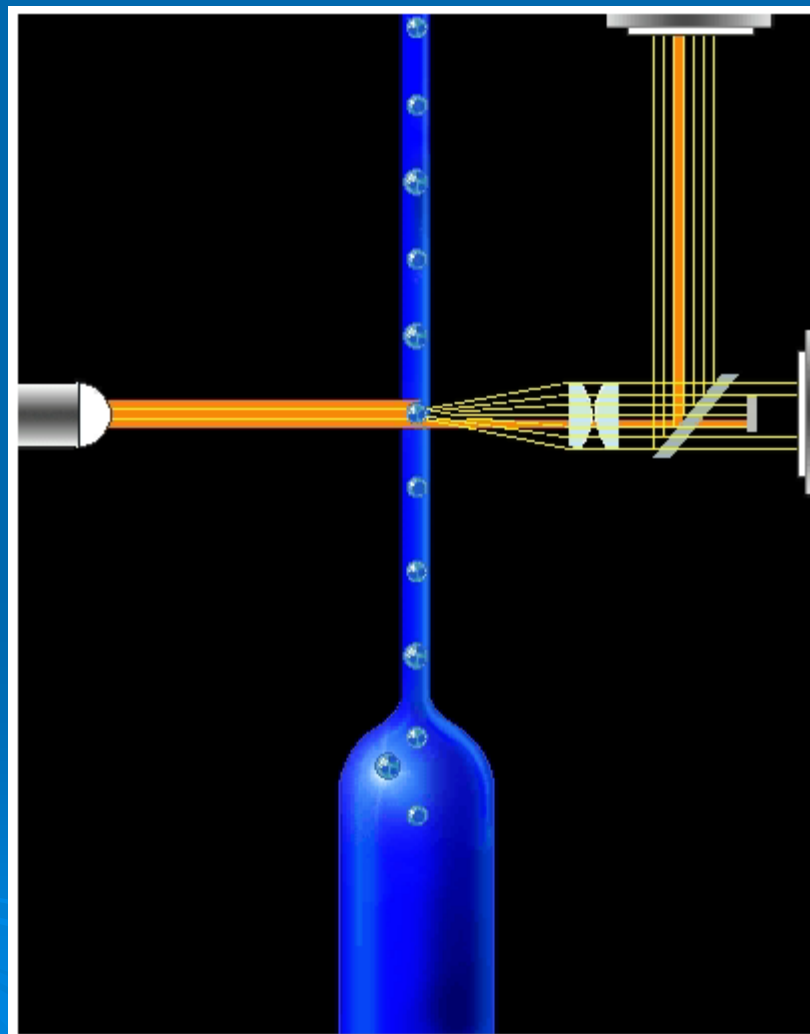
b) Boční rozptyl světla = side scatter light (SSC)

- Vnitřní charakter buňky (granulace cytoplasmy, členitost jádra)



Optické metody – absorpce světla

- barvení – **cytochemické metody**
(např. myeloperoxidáza)

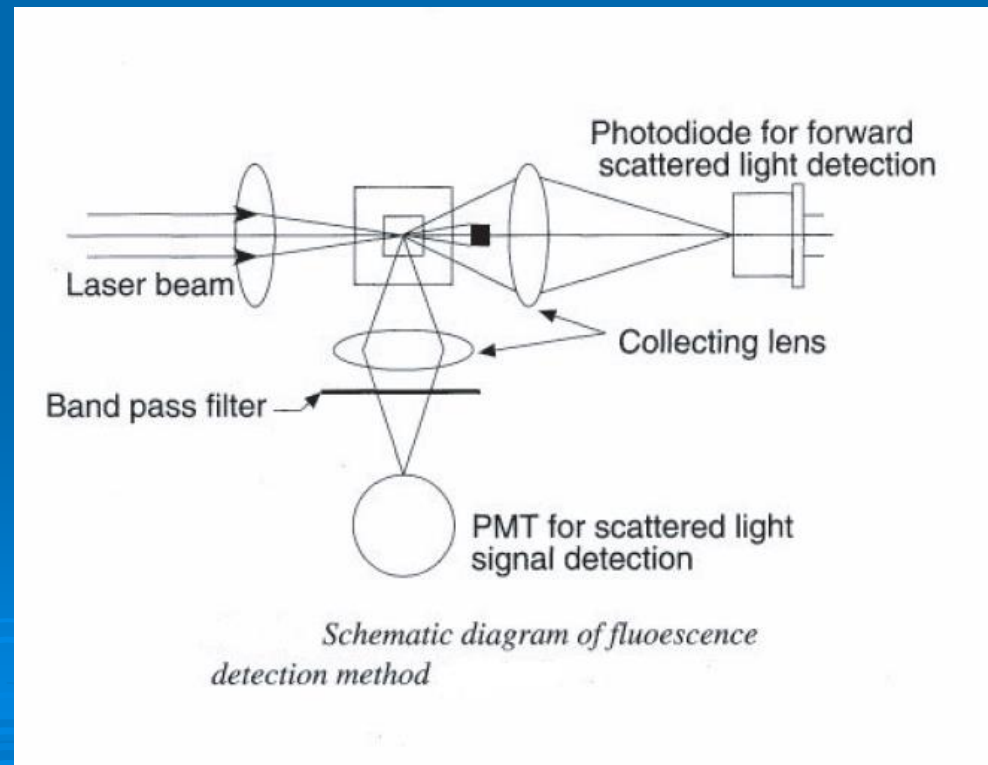


Optické metody – fluorescenční detekce

- Perforace buněk
- Použití **fluorochromů** s různou afinitou k nukleovým kyselinám (**DNA, RNA**)

- Stanovení:

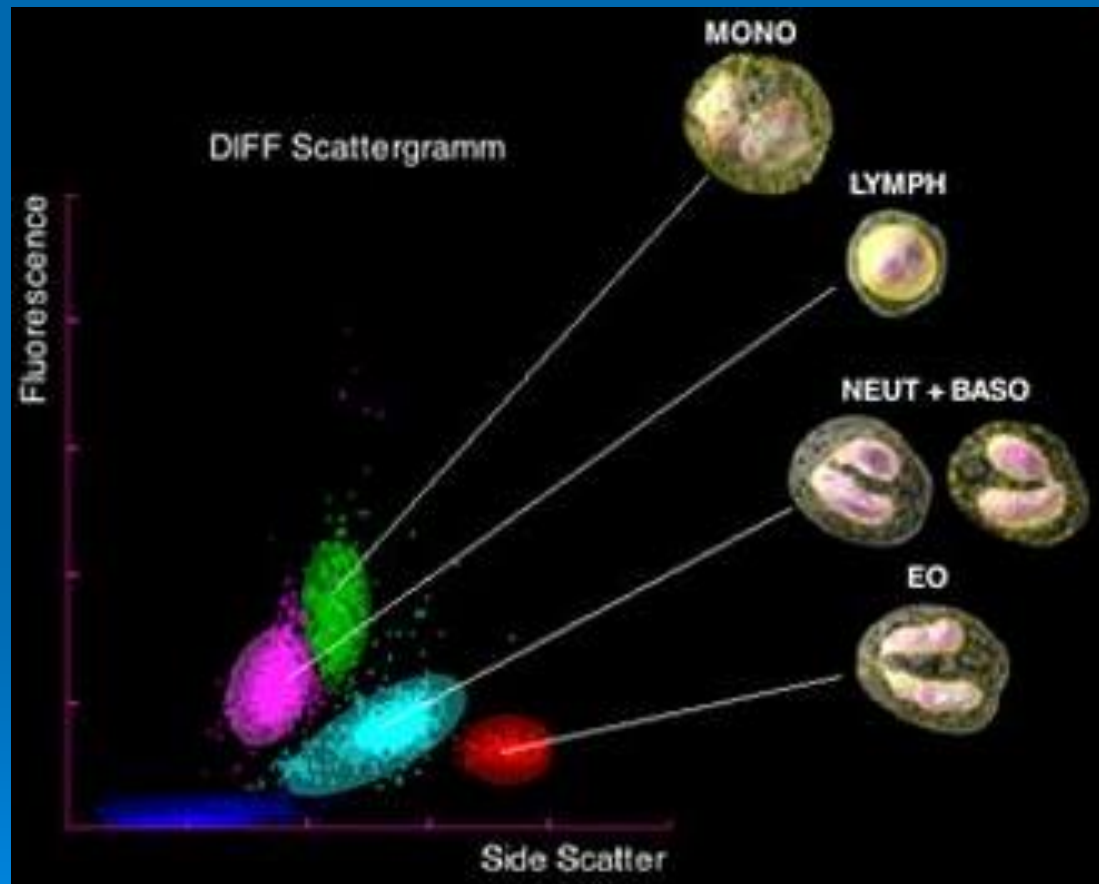
- **Retikulocytů**
- **NRBC**
- **IG**
- **IPF**



Optické metody – fluorescenční detekce

- **Průtoková cytometrie (Flow cytometry - FCM)**
 - standardní metoda analýzy částic (buněk) v suspenzi
 - multiparametrická analýza
 - vysoká propustnost (tisíce elementů za vteřinu)
- Hematologické analyzátory – **kombinace FCM a rozptylu laserového paprsku** (Sysmex)
 - Forward Scatter (velikost buňky)
 - Side Scatter (hustota vnitřní struktury buňky)
 - Side Fluorescence Light (aktivita buňky a stupeň vyžrálosti buňky)

Scattergram populace leukocytů



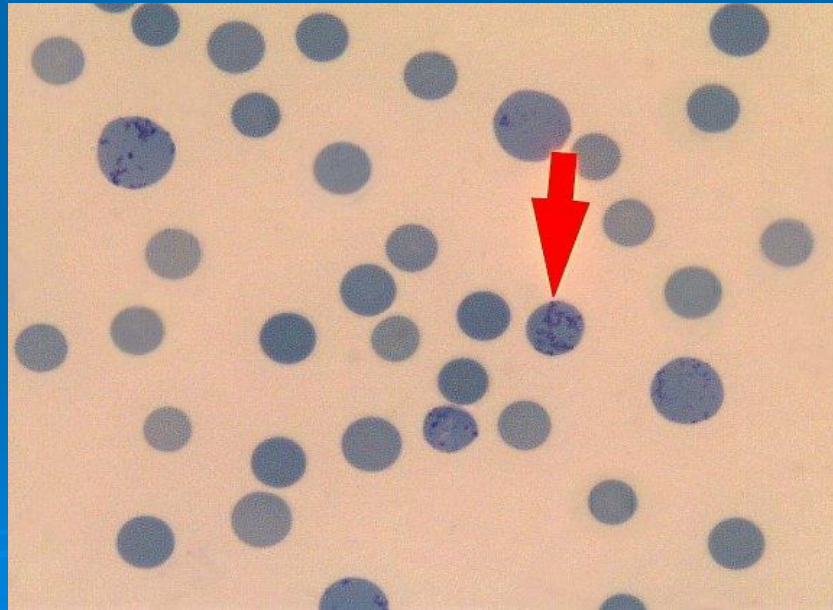
PLT

- Impedančně (PLT-i)
- Opticky (PLT-o)
- Fluorescenčně (PLT-F)
- Imunologicky (povrchový antigen CD61)

Retikulocyty

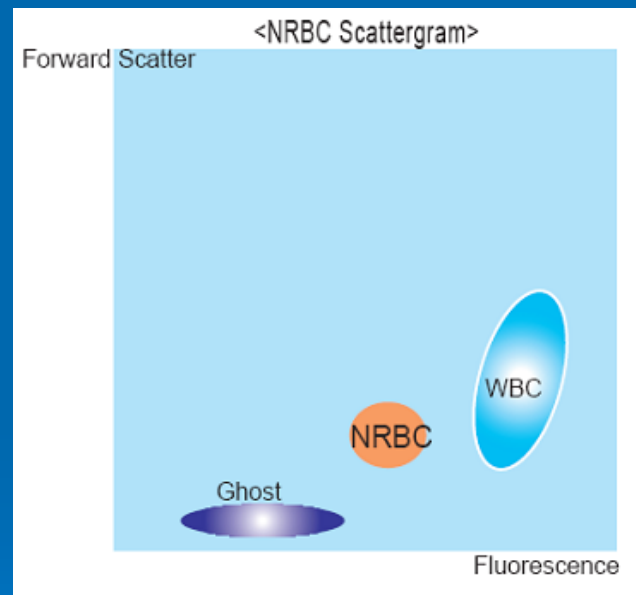
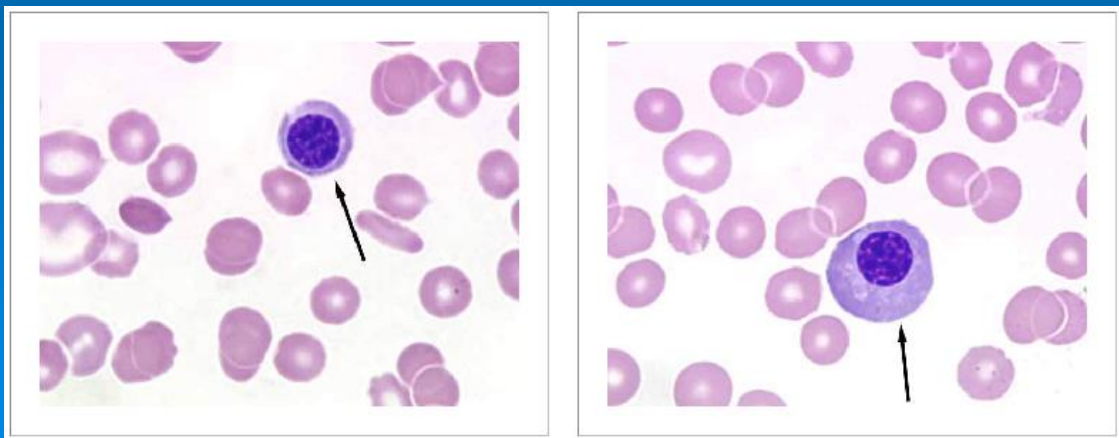
- mladé erythrocyty se zbytky RNA a ribozomálních struktur v cytoplazmě

- plná krev
- krev je smíchána s fluorescenční barvou
- obarvení RNA



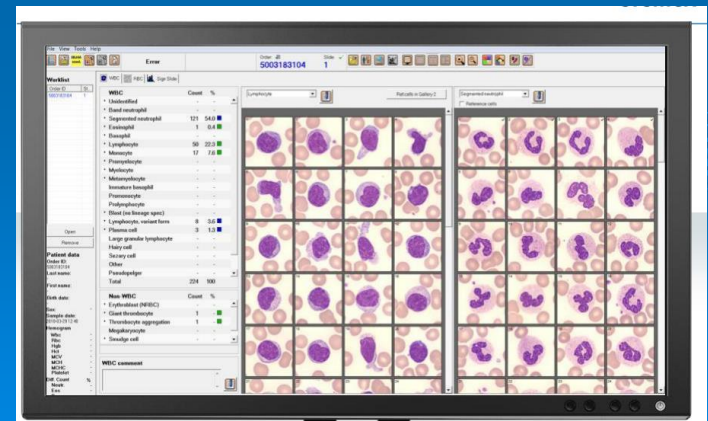
NRBC

- Jaderné erythrocyty (normoblasty)
- Jaderné RBC žijí v kostní dřeni a za fyziologických okolností se v periferní krvi nacházejí pouze u novorozenců



Digitální morfologie

- Automatizace mikroskopického hodnocení diferenciálu leukocytů v periferní krvi



Přístroje používané v koagulační laboratoři

- Koagulometry
 - Agregometry
 - PFA 100 (200)
 - Vidas
 - TGT
 - Spektrofotometr, ELISA reader,...
-
- TEG
 - ACT

Metody měření koagulačního času

Koagulační metody měří **čas** od přidání startovací reagensie do vzniku fibrinového vlákna ve vzorku plazmy

- Manuální
- Přístrojové

Koagulační metody způsoby detekce

➤ Fyzikální detekce

- Detekce fibrinového vlákna (vodivost)
- Elektromechanické vibrace a rotace (viskozita)

➤ Optická detekce

- Rozptyl světla - nefelometrie
- Propustnost světla – turbidimetrie

Fyzikální detekce

- **kuličkový** koagulometr
- malá kulička, kývavý pohyb
- elektromagnetický senzor
- měří změnu frekvence a amplitudy kuličky



Princip – koagulační (viskozita)

- Během koagulace vzrůstá viskozita plazmy
- Tento růst viskozity je měřen pohybem např. **nerezové ocelové kuličky**, která se pohybuje mezi dvěma drážkami v kyvetě s plazmou
- Pohyb kuličky je tvořen **elektromagnetickým polem**, které působí na kuličku **střídavě** ze dvou stran
Jakmile je nastartována koagulace (přidáním startovací reagentie) viskozita plazmy začne vzrůstat, což má vliv na pohyb kuličky
- Oscilační amplituda kuličky se zmenší
- **Měří se změna frekvence a amplitudy kuličky**
- Této změny se využívá k určení koagulačního času

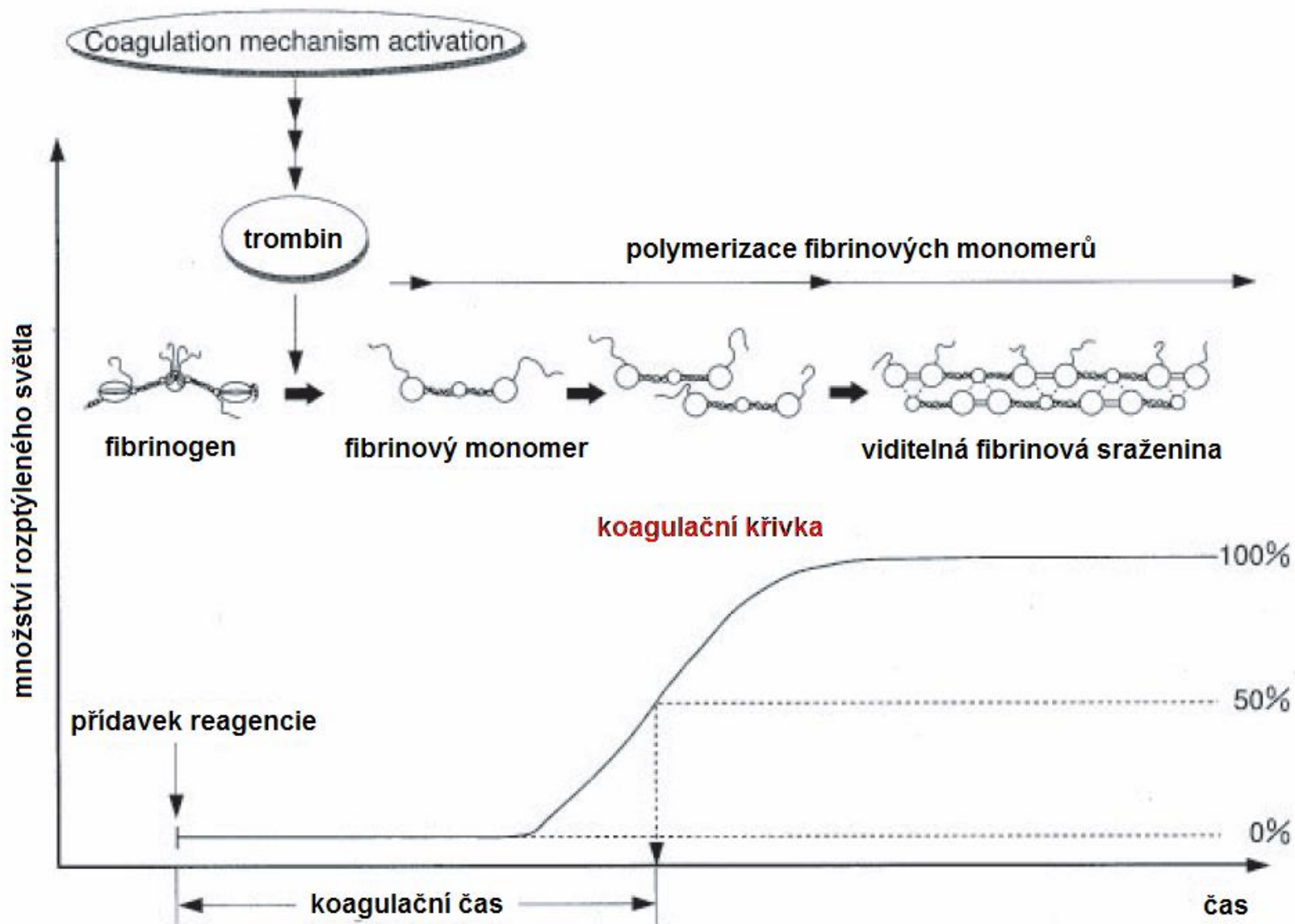
Optické koagulometry

- Vzorek plazmy je po přidání startovací reagensie vystaven světelnému záření (viditelná oblast)
- **Změny v optické hustotě plazmy** při vzniku koagula jsou ve velmi malých časových intervalech monitorovány jako **změny v intenzitě světla rozptýleného při průchodu vzorkem**
- Rozptýlené světlo dopadá na **fotodiodu** a indukuje vznik **elektrického impulzu**, jehož amplituda roste úměrně s intenzitou dopadajícího světla
- Koagulaci přístroj hodnotí jako ukončenou tehdy, když se zastaví nárůst amplitudy impulzů
- Na základě amplitudy elektrických impulzů je vytvořena koagulační křivka

Optické koagulometry

- Koagulační čas je stanoven nejčastěji metodou **procentuální detekce**
- Intenzita rozptýleného světla je stanovena ihned po přidání startovací reagensie a je definována jako **0 %** intenzita světla po ukončení koagulace jako **100 %**
- Bod detekce koagulace je stanoven na koagulační křivce mezi 0 % a 100 %, nejčastěji je užíváno **50 %**

Koagulační čas je potom časem, ve kterém bylo dosaženo nastavené intenzity rozptýleného světla



Coagulation mechanism activation

trombin

polymerizace fibrinových monomerů

fibrinogen

fibrinový monomer

viditelná fibrinová sraženina

koagulační křivka

množství rozptýleného světla

přídavek reagencie

koagulační čas

čas

100%

50%

0%

Další principy měření na koagulačních analyzátorech

(kromě koagulačních metod)

- chromogenní metody
- imunoturbidimetrické metody

Principy měření - příklady

Koagulační

- PT
- APTT
- TT
- Fibrinogen
- F II, V, VII, X
- VIII, IX, XI, XII
- ...

Chromogenní

- Antitrombin
- Protein C
- Faktor VIII, IX...
- Alfa2 – antiplazmin
- Plazminogen
- ...

Imunoturbidimetrie

- D-Dimery, vWF:Ag
- ...

Agregometr

- optický
- impedanční



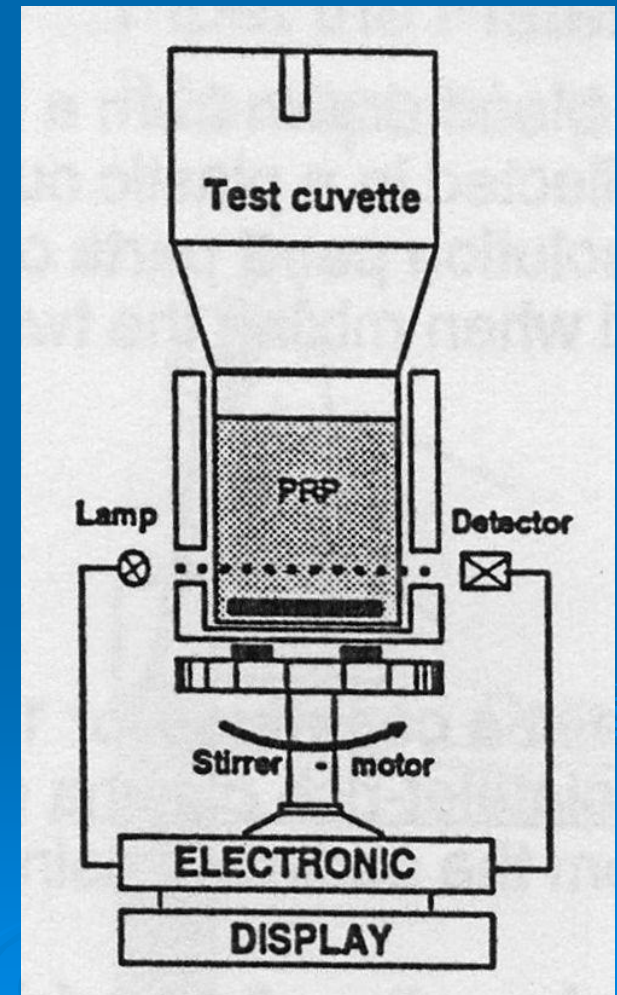
Agregometr - optický

- Sleduje se změna optické hustoty během agregace ve speciálně upraveném nefelometru – agregometru



Agregometr optický - princip

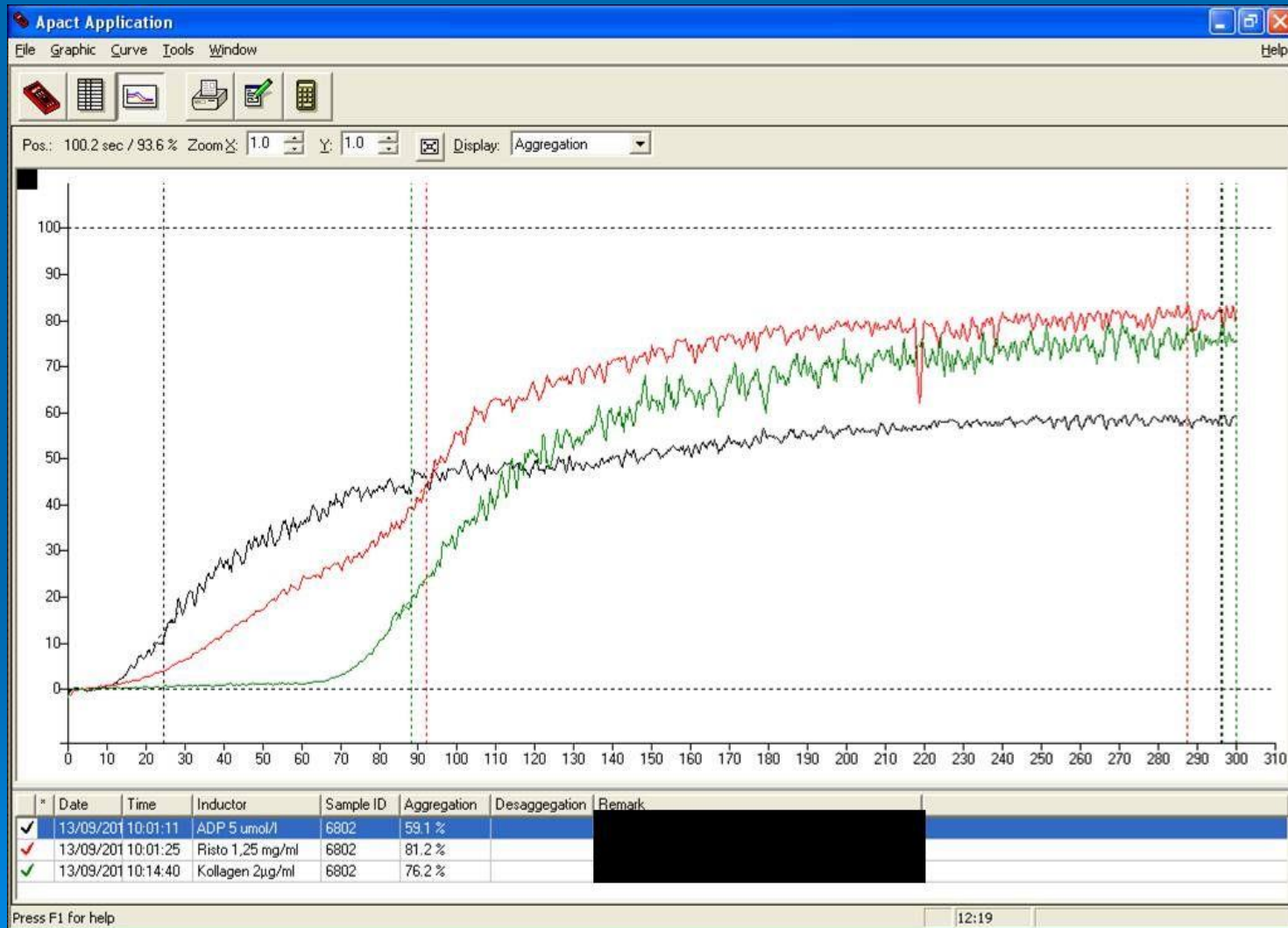
- kvantitativní měření agregace je založeno na Bornově turbidimetrické metodě
- PPP plazma (100% transmise)
- PRP plazma (0% transmise)
- LED, 650 nm
- míchání v kyvetě
- 37 °C
- Účinkem některých látek (stimulátorů agregace) dochází v plazmě bohaté na destičky (PRP) ke vzájemnému shlukování (agregaci) krevních destiček



Agregace

- **samovolná**
- **indukovaná**
 - **ADP**
 - **kolagen**
 - **ristocetin**
 - **adrenalin**
 - **kyselina arachidonová**
 - **trombin**
 - **kationický propylgalát sodný**

Agregace indukovaná



Monitorování primární hemostázy

PFA 100[®]

PFA 200[®]



PFA 100 (200)

- rychlé získání informací ke stavu primární hemostázy
- 2 typy měřících cel – membrána pokryta **col/epi** nebo **col/ADP**
- 800μl **plné citrátové krve**
- sledování tvorby destičkového trombu, který postupně vyplňuje otvor v membráně potažené buď **col/epi** nebo **col/ADP**

Výsledkem testu je čas potřebný k dosažení kompletního uzávěru otvoru membrány – **closure time (CT)**



PFA 100®

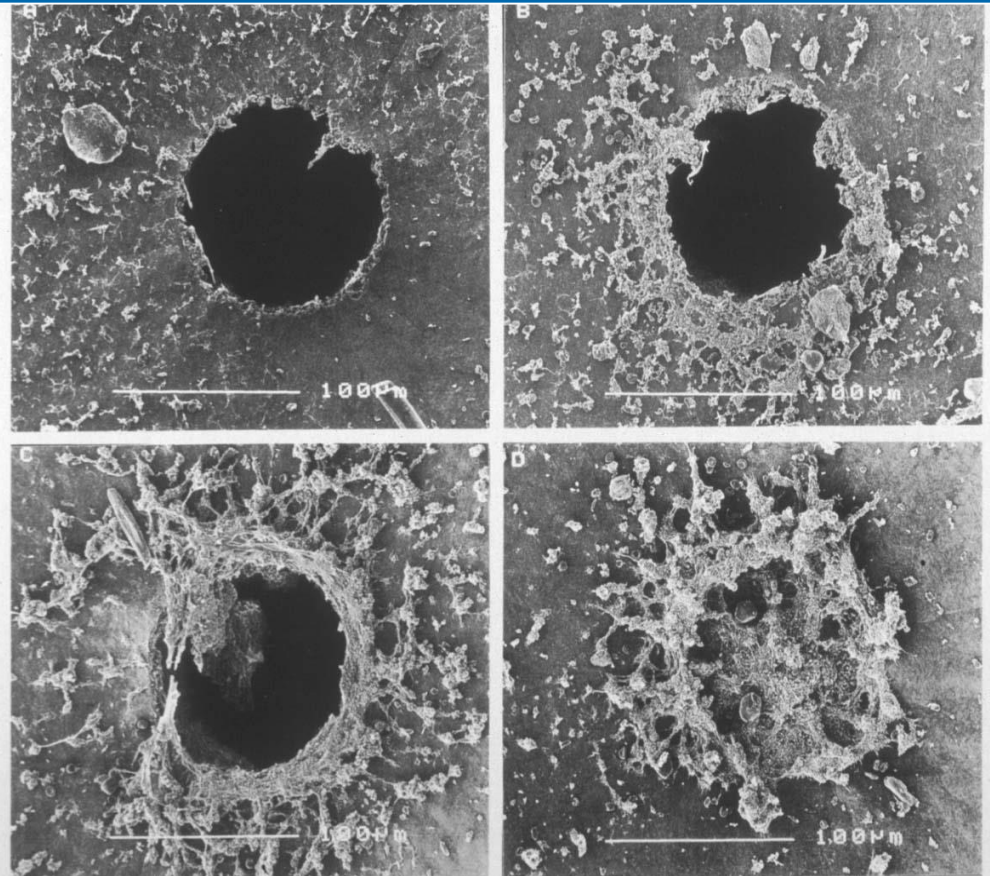
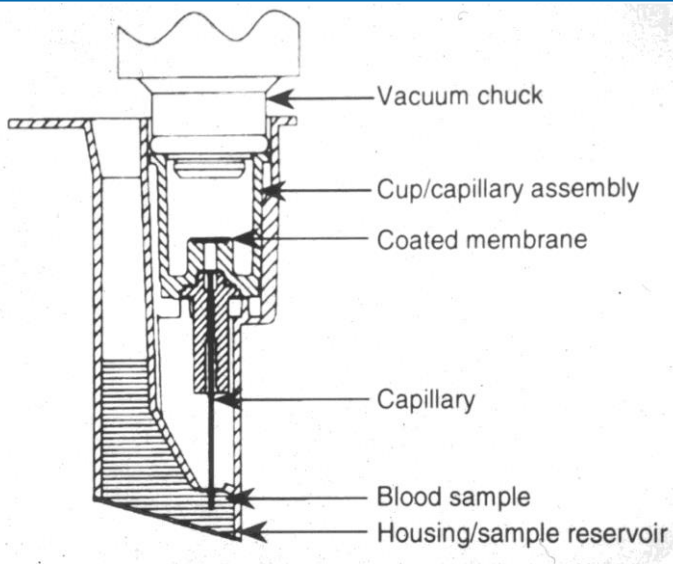


FIG. 1. Scanning electron micrographs (A-D) demonstrating progression of the platelet plug formation at the aperture. The tests were terminated at 15, 45, 80, and 110 s (closure), and the membrane disks were processed for microscopy.

PFA 100 (200)

NH:

- kolagen / epinefrin (85 – 165 s)
- kolagen / ADP (71 - 118 s)

Závisí na:

- počtu trombocytů
- funkci trombocytů
- vWF
- Htc
- Afibrinogénemii

Nezávisí na:

- koagulačních faktorech (VIII, IX, XI)
- kumarinech
- heparinu

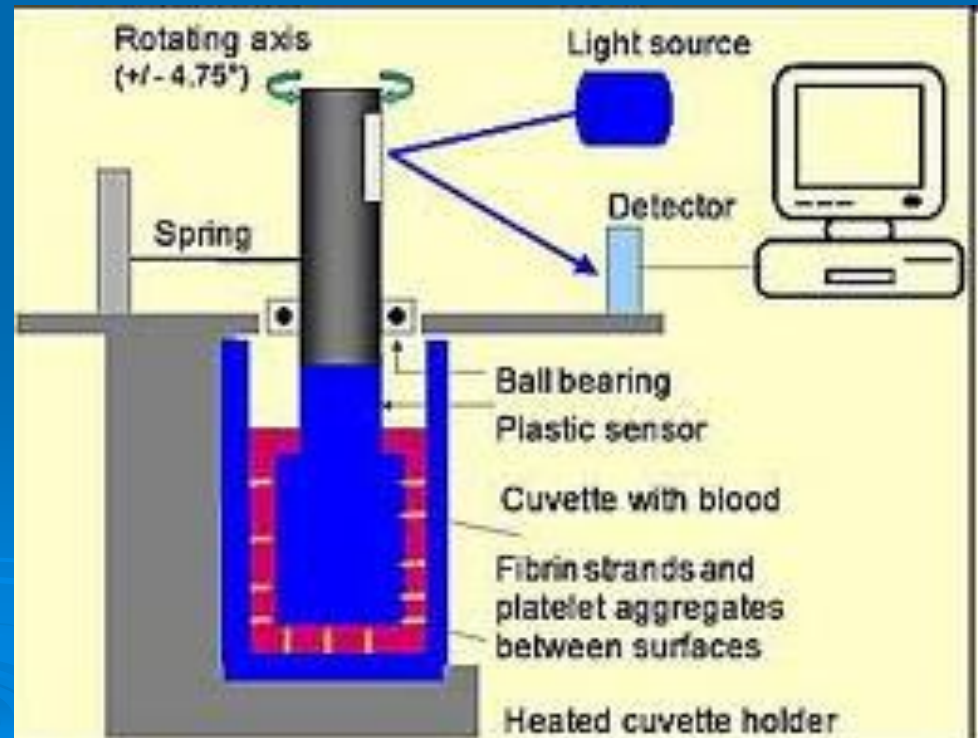
Přístroje používané i mimo koag. laboratoř

JIP, ARO:

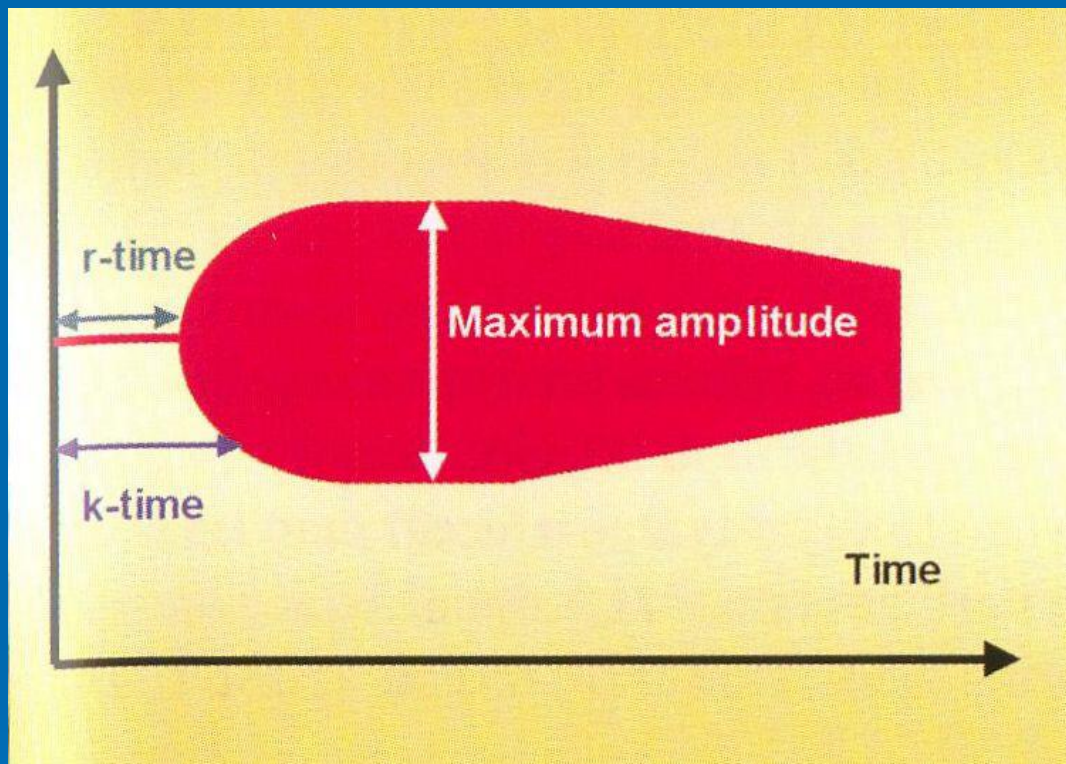
- TEG
- ACT

Trombelastograf (TEG)

- již od roku 1948
- inovace - ROTEG
- rychle dostupný komplexní přehled hemostatické situace u pacienta
- dochází ke změně elasticity během tvorby trombu mezi stěnou kyvety a pístem



Trombelastogram



- **r-time** (čas od přidání Ca^{2+} do první známky formace fibrinu)
- **k-time** (kinetika tvorby trombu)
- **maximální amplituda** (zjišťuje pevnost a stabilitu sraženiny, fce koncentrace Fbg, počtu Plt a jejich kvality, interakce mezi fibrinem a destičkovou zátkou)

ACT

- Aktivovaný koagulační čas
- Z plné krve
- Monitorování vysoce dávkované léčby heparinem
- Použití u extrakorporálních oběhů,
ECMO
- ARO, JIP, kardiologie, dialýza