3ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Παιδιατρικής κλινικής, Νοσοκομείο Metropolitan,
30 ΝΟΕΜΒΡΙΟΥ 2019, Divani-Caravel

Η πρακτική εφαρμογή και οι δυνατότητες των νέων αιματολογικών αναλυτών

Λυδία Κόσσυβα

Επίκουρη καθ. Παιδιατρικής

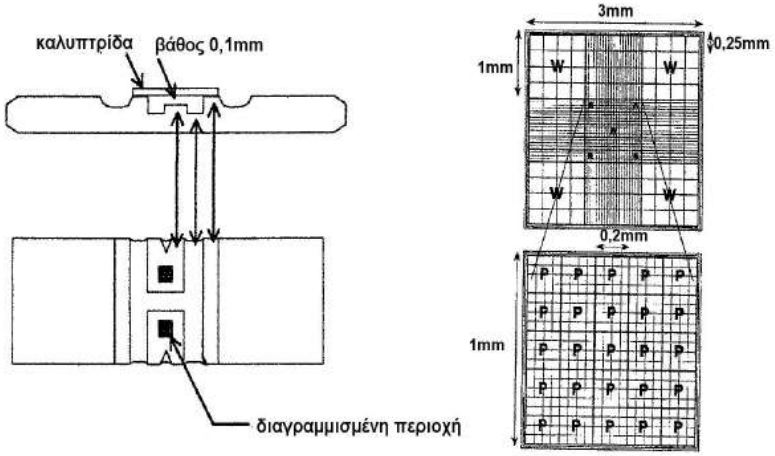
Β' Παιδιατρική Κλινική Παν/μίου Αθηνών

Γενική εξέταση αίματος (CBC)

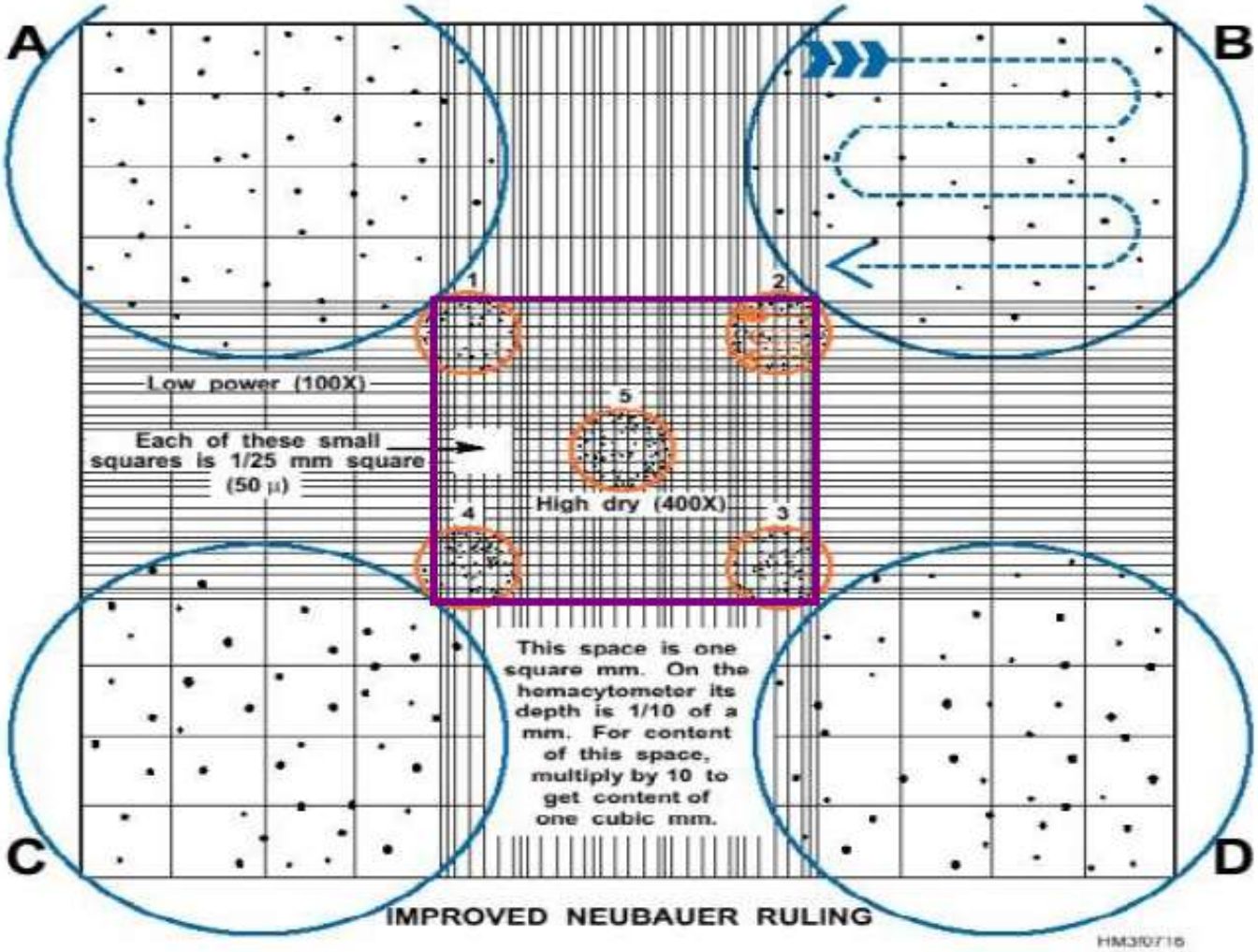
- Η πιο συχνή εξέταση
- Παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τα έμμορφα στοιχεία του αίματος
- Αυτοματοποιημένη ανάλυση από τους αιματολογικούς αναλυτές

Για την ιστορία....

- Χειρωνακτική μέτρηση έμμορφων συστατικών αίματος σε αντικειμενοφόρες πλάκες
- Χρήση μικροσκοπίου



HEMACYTOMETER (COUNTING CHAMBER)



A - B - C - D ARE FIELDS USED IN DOING THE WHITE BLOOD CELL COUNT.

1 - 2 - 3 - 4 - 5 ARE FIELDS USED IN DOING THE RED BLOOD CELL COUNT.

Wallace Coulter

- Μηχανολόγος από το Chicago
- **1949:** Αρχή ηλεκτρονικής μέτρησης μικροσκοπικών σωματιδίων
- **1956**: πρώτος αυτόματος αναλυτής

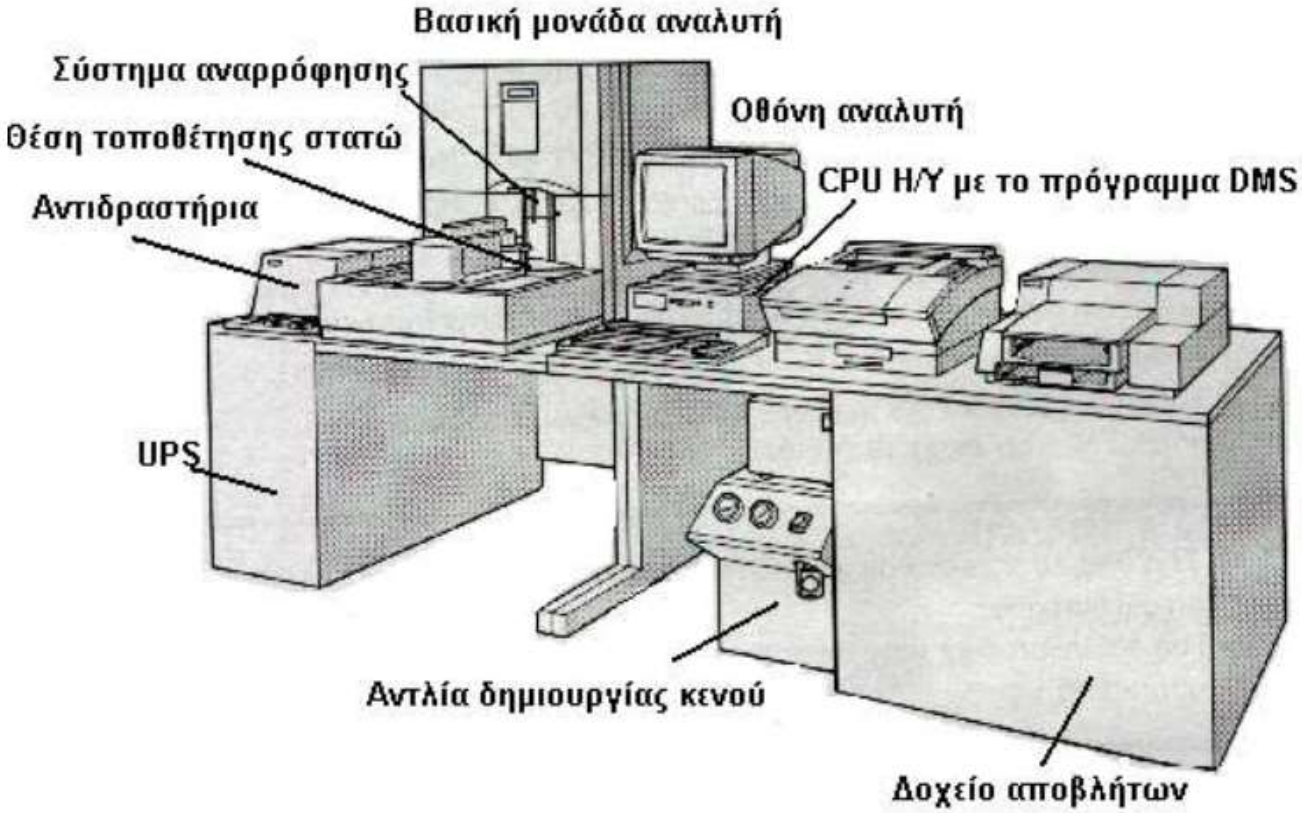
'You can't patent a hole.'

The Model A Coulter Counter® with the industrial version of the sample stand shown at the right.

Marshall Don. Graham Journal of Laboratory Automation 2003;8:72-81

Wallace (left) and Joseph Coulter in the mid 1990s.

Marshall Don. Graham Journal of Laboratory Automation 2003;8:72-81



Τα τμήματα ενός αιματολογικού αναλυτή

ΠΑΥΣΙΜΟ ΚΑΘΕ ΜΕΡΑ ΚΑΙ
ΣΤΟΥΣ ΔΥΟ ΑΝΑΛΥΤΕΣ
ΠΡΟΣΟΧΗ ΣΤΑ ΣΑΚΟΥΛΑΚΙΑ ΠΟΥ
ΑΛΛΑΖΟΝΤΑΙ ΜΑΖΙ ΜΕ
Τ'ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΤΩΝ ΔΕΚ ΚΑΙ ΤΟ
ΔΝΒ (ΠΡΑΣΙΝΟ)
001 11 61008
XE-5000

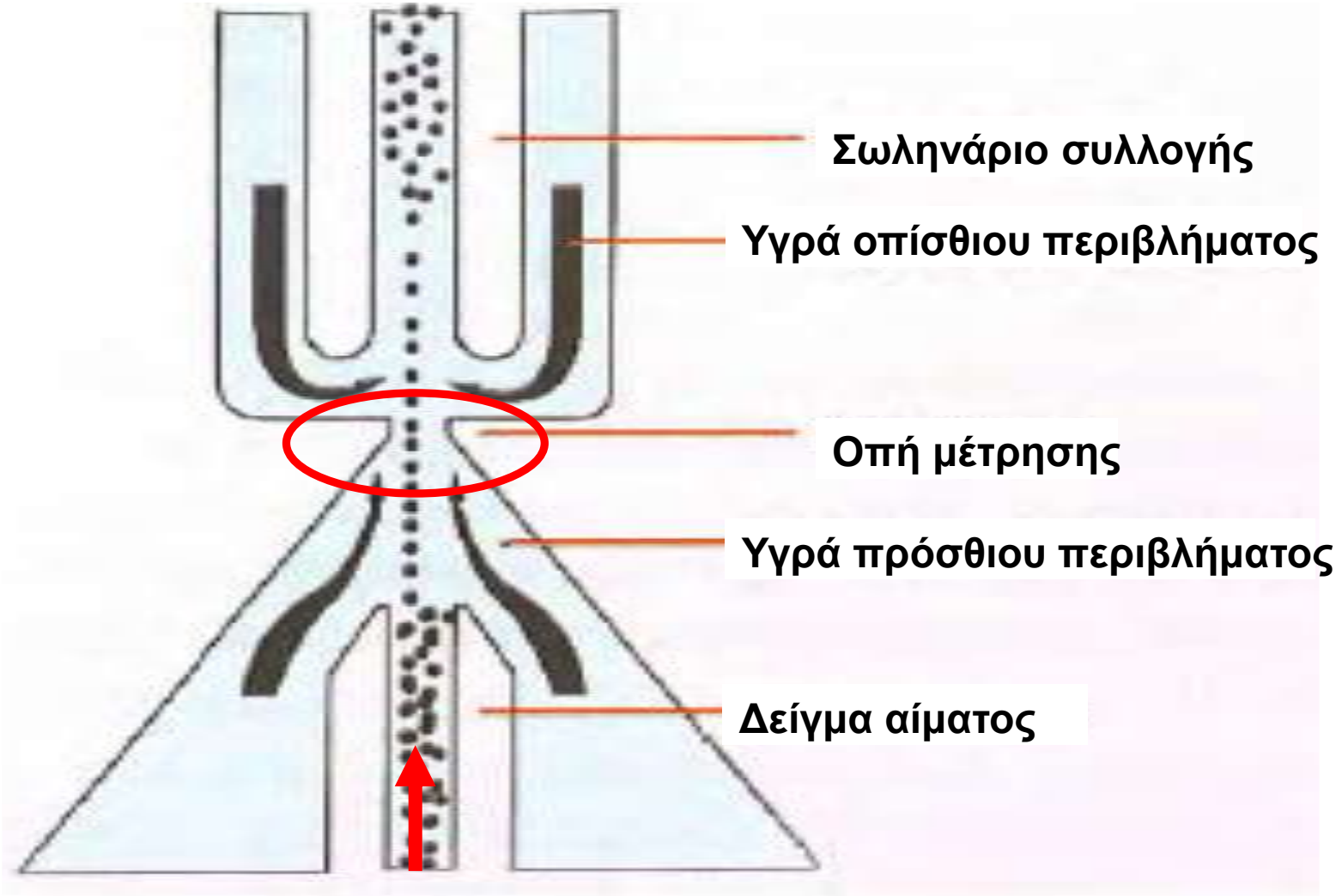
Οι αιματολογικοί αναλυτές επιβλήθηκαν λόγω:

- Ταχύτητας
- Ακρίβειας
- Μέτρησης μεγάλου αριθμού κυττάρων
- Παροχής ολοένα αυξανόμενου όγκου πληροφοριών

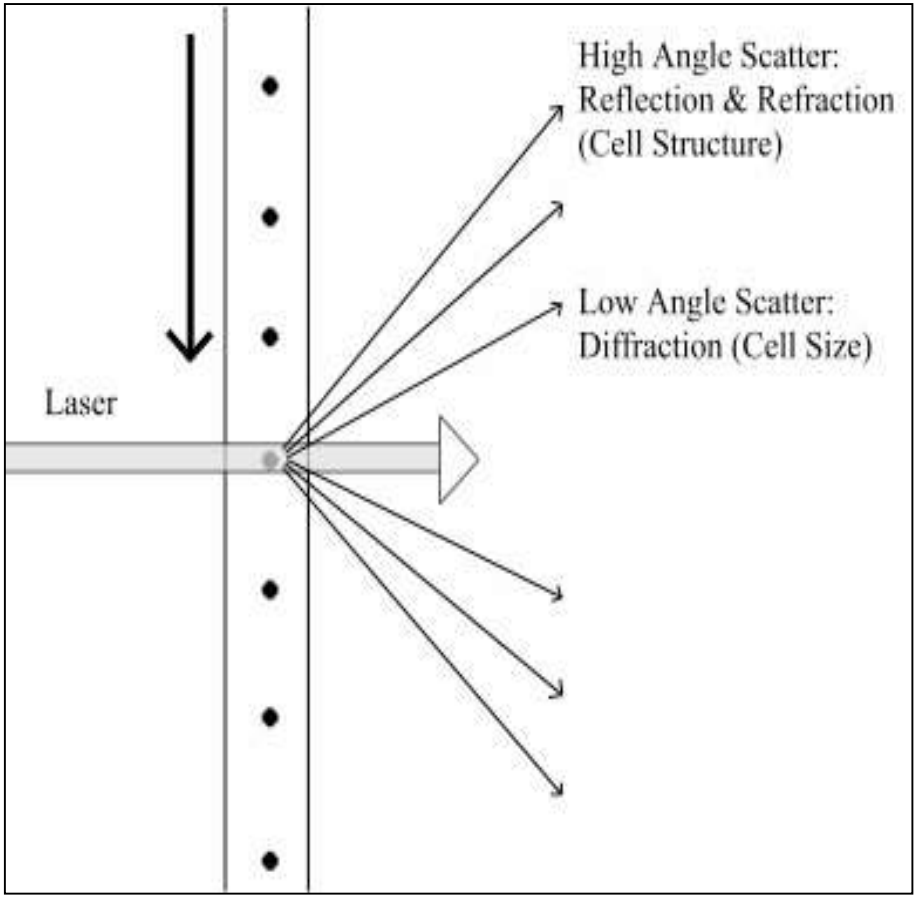
Αρχές λειτουργίας των αναλυτών

- Αρχή μεταβολής ηλεκτρικής αντίστασης (impedance)(Coulter)
- Οπτική αρχή – σκεδασμός ακτίνας laser (πρόσθιος-πλάγιος)
- Συνδυασμός αρχής αντίστασης και οπτικής αρχής
- Κυτταρομετρία ροής με χρήση φθοριοχρωμάτων

Μεταβολή Ηλεκτρικής Αντίστασης Οπής - Ηλεκτρονική Μέτρηση



Οπτική Μέθοδος



- Σκεδασμός ακτίνας Laser
- Ανίχνευση σκεδασμού από ειδικό φωτοαισθητήρα και μετατροπή σε ηλεκτρικό παλμό
- Ο αριθμός των παλμών ανάλογος του αριθμού των διερχόμενων κυττάρων
- Εκτίμηση αριθμού, μεγέθους, δομής και αντανακλαστικότητας κυττάρων

Τρία σήματα από κάθε κύτταρο

Πρόσθιος σκεδασμός	Μέγεθος
Πλάγιος σκεδασμός	Εσωτερική δομή
Πλάγιος φθορισμός	RNA/DNA

Εξέλιξη αιματολογικών αναλυτών

RBC, WBC, PLT, Ht, Hb, MCH, MCHC, MCV

Όλα τα παραπάνω + Τύπος WBC, άωρες μορφές, RDW, MPV, PDW

Όλα τα παραπάνω + ΔΕΚ + Μυελός

Παράμετροι αναλυτών

- ✓ **ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ**
- ✓ **ΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΤΑΣΕΙΣ**

ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

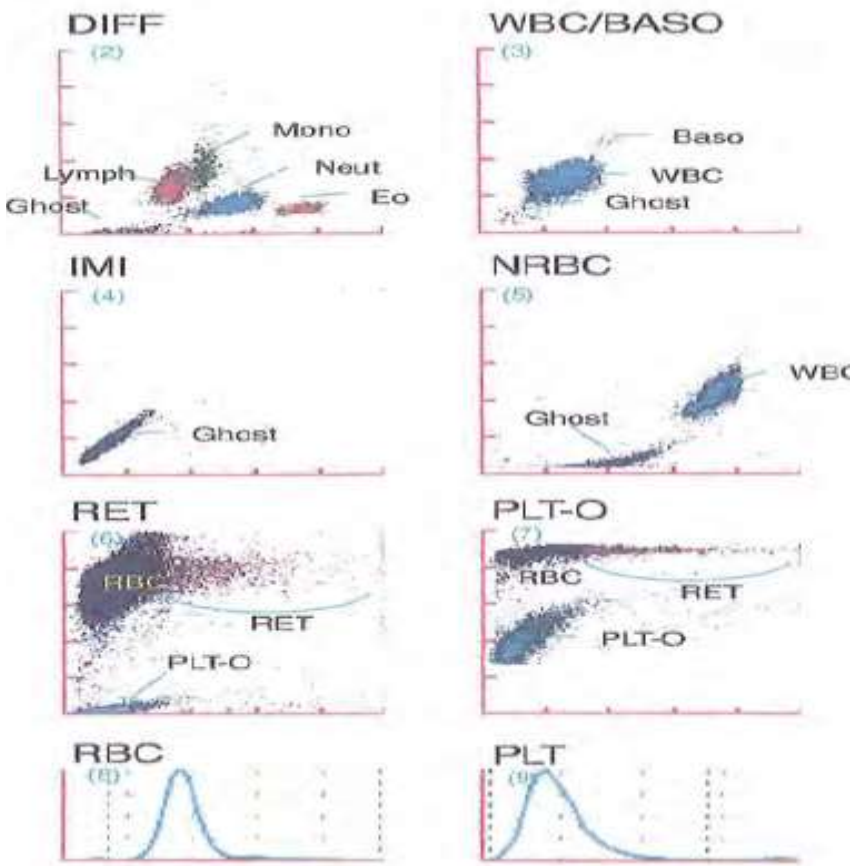
- ***<u>Ποσοτικές</u>***
  - Κλασικές
  - Στατιστικές
  - Γνωστής αξίας στην οπτική μικροσκόπηση
- ***<u>Ποιοτικές</u>***
  - flags

(1)

WBC	6.90	[10^9/L]		
RBC	4.64	[10^{12}/L]		
HGB	154	[g/L]		
HCT	0.440	[%]		
MCV	94.8	[fL]		
MCH	33.1	[pg]		
MCHC	350	[g/L]		
PLT	353	[10^9/L]		
RDW-SD	46.0	[fL]		
RDW-CV	0.134	[%]		
PDW	11.6	[fL]		
MPV	10.6	[fL]		
P-LCR	0.300	[%]		
PCT	0.0037	[%]		
NEUT	4.19	[10^9/L]	0.607	[%]
LYMPH	1.54	[10^9/L]	0.223	[%]
MONO	0.51	[10^9/L]	0.074	[%]
EO	0.60	[10^9/L]	0.087	[%]
BASO	0.06	[10^9/L]	0.009	[%]
NRBC	0.00	[10^9/L]	0.000	[%]
RET	0.0170	[%]	78.9	[10^9/L]
IRF	0.067	[%]		
LFR	0.933	[%]		
MFR	0.061	[%]		
HFR	0.006	[%]		

ΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΤΑΣΕΙΣ

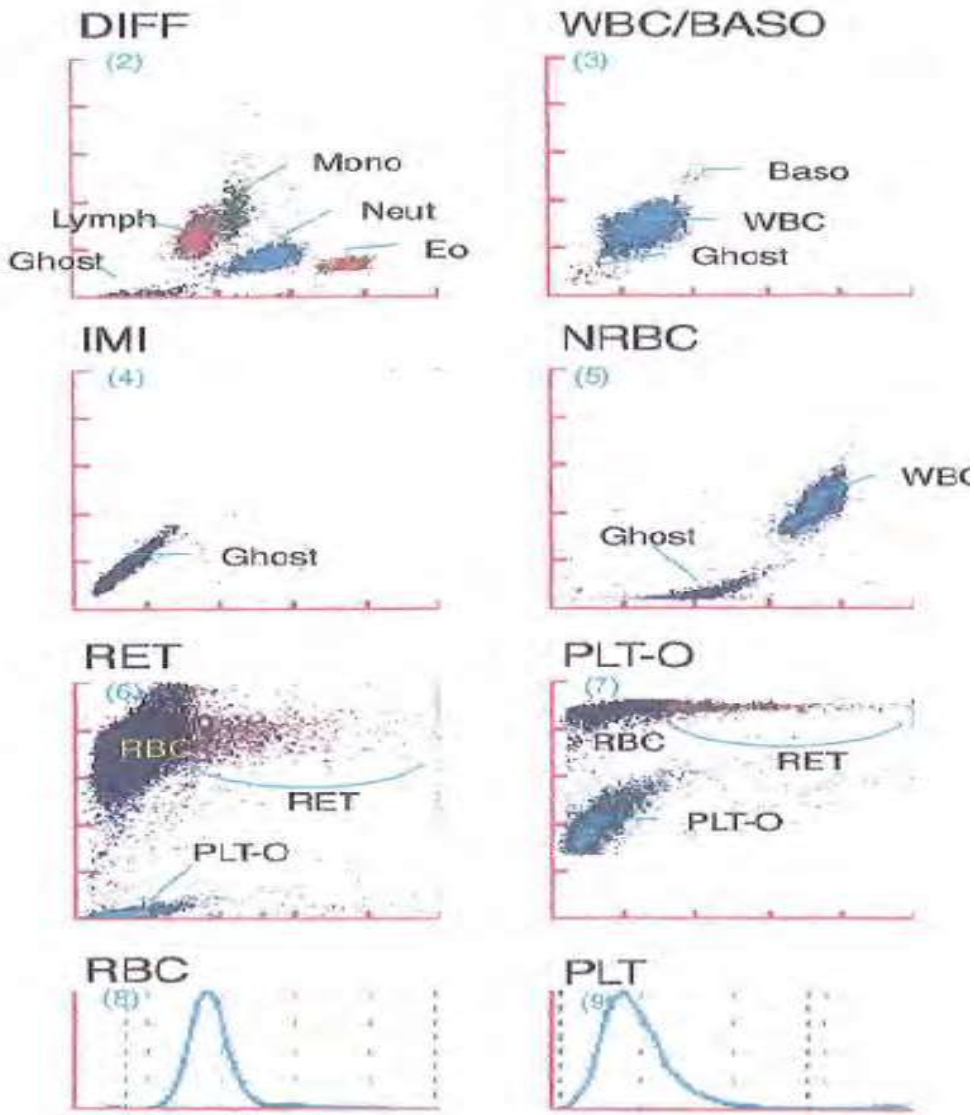
- ***Ιστογράμματα***
  - Κατανομή ***μιας*** παραμέτρου
- ***Κυτταρογράμματα*** *(νεφελογράμματα)*
  - Συνδυασμός ***δύο*** παραμέτρων



Γενική Εξέταση Αίματος

(1)

WBC	6.90	[10^9/L]		
RBC	4.64	[10^{12}/L]		
HGB	154	[g/L]		
HCT	0.440	[%]		
MCV	94.8	[fL]		
MCH	33.1	[pg]		
MCHC	350	[g/L]		
PLT	353	[10^9/L]		
RDW-SD	46.0	[fL]		
RDW-CV	0.134	[%]		
PDW	11.6	[fL]		
MPV	10.6	[fL]		
P-LCR	0.300	[%]		
PCT	0.0037	[%]		
NEUT	4.19	[10^9/L]	0.607	[%]
LYMPH	1.54	[10^9/L]	0.223	[%]
MONO	0.51	[10^9/L]	0.074	[%]
EO	0.60	[10^9/L]	0.087	[%]
BASO	0.06	[10^9/L]	0.009	[%]
NRBC	0.00	[10^9/L]	0.000	[%]
RET	0.0170	[%]	78.9	[10^9/L]
IRF	0.067	[%]		
LFR	0.933	[%]		
MFR	0.061	[%]		
HFR	0.006	[%]		



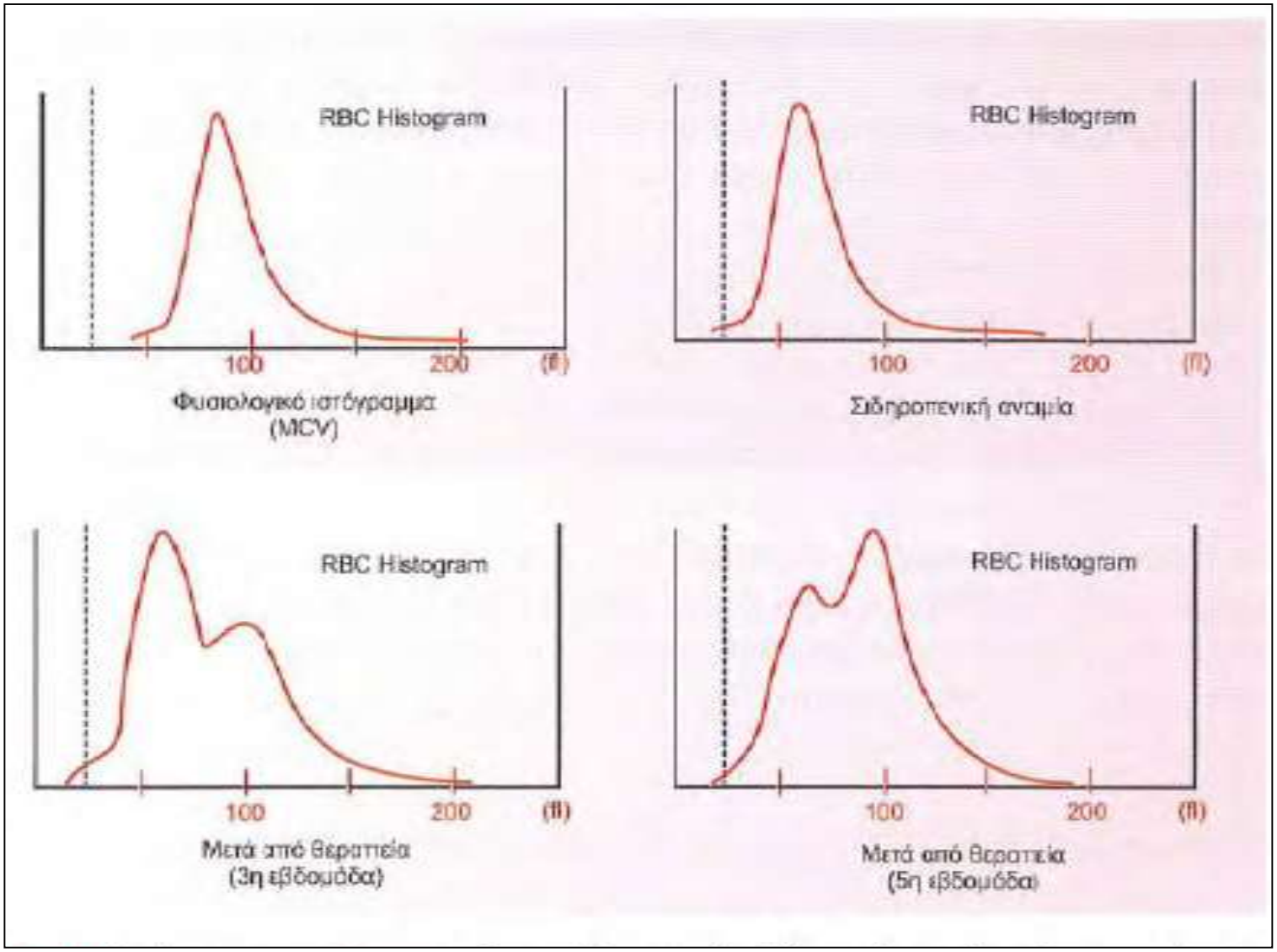
Ποσοτικές μεταβλητές

- **Κλασικές**
  - *RBC, Ht, Hb, MCV, MCH, MCHC*
  - *WBC, NEUT% (#), LYM%(#), MONO%(#), EOS%(#)*
  - *PLT*
- **Στατιστικές**
  - *RDW, MSCV, MPV, PDW*
- **Γνωστής αξίας στην οπτική μικροσκόπηση**
  - *%(#) ΔΕΚ*
  - *Κλάσμα άωρων ΔΕΚ*
  - *Ερυθροβλάστες*

Κλασικές ποσοτικές μεταβλητές

- ***RBC, Ht, Hb***
  - Αναιμία
- ***MCV (mean corpuscular volume-μέσος όγκος)***
  - ***Δείκτης με επαναληψιμότητα***
  - ***Αναιμία***
    - ***Μικροκυτταρική >80 fl,***
    - ***Ορθοκυτταρική 80-100 fl,***
    - ***Μακροκυτταρική > 100 fl***

MCV


RBC Histogram
100
200
(fl)
Φυσιολογικό ιστόγραμμα
(MCV)
RBC Histogram
100
200
(fl)
Σιδηροπενική αναιμία
RBC Histogram
100
200
(fl)
Μετά από θεραπεία
(3η εβδομάδα)
RBC Histogram
100
200
(fl)
Μετά από θεραπεία
(5η εβδομάδα)

Ποσοτικές μεταβλητές

- **Κλασικές**
  - *RBC, Ht, Hb, MCV, MCH, MCHC*
  - *WBC, NEUT% (#), LYM%(#), MONO%(#), EOS%(#)*
  - *PLT*
- **Στατιστικές**
  - *RDW, MSCV, MPV, PDW*
- **Γνωστής αξίας στην οπτική μικροσκόπηση**
  - *%(#) ΔΕΚ*
  - *Κλάσμα άωρων ΔΕΚ*
  - *Ερυθροβλάστες*

Σημαντική διαγνωστική αξία!!!

- ***RDW*** **(*red distribution width- εύρος κατανομής)***
  - (*RDW-CV:* 13±1 %, *RDW-SD*: 45.5±5 fL)
- ***MSCV*** ***(mean sphered corpuscular volume - μέσος όγκος σφαιροποιημένων RBC)***

RDW (Δείκτης ανισοκυττάρωσης)

- ↑ RDW: πρώιμη ένδειξη σιδηροπενίας
- ΔΔ σιδηροπενικής αναιμίας / Ετερ. α ή β – ΜΑ

Φύλο	Φυσιολ. Τιμές RDW %	Ετερ. α-ΜΑ	Ετερ. β-ΜΑ	Σιδηροπενική αναιμία
Α	13 ± 0.6	14.9 ± 1.3	15.4 ± 0.9	**17.7 ± 3.1**
Γ	13.2 ± 0.8	14.9 ± 0.7	15.1 ± 1.0	**17.2 ± 2.2**

Δ.Δ Σιδηροπενίας-θαλασσαιμίας

	Σιδηροπενική αναιμία	Θαλασσαιμία
Hb	↓	↓
MCV	↓	↓
TIBC	↑	κφ
Ferritin	↓	κφ
ΔΕΔ	↓	↑
Δείκτης Mentzer MCV/RBC	>13	<13
RDW	>22	<22
Ηλεκτροφόρηση Hb	κφ	↑ Hb A2 ± ↑ Hb F

MSCV (mean sphered corpuscular volume)

- Φυσιολογικά: ***MSCV ≥ MCV***

- Κληρονομική σφαιροκυττάρωση: ***MSCV < MCV***

  - ***MCV – MSCV > 10 fl***
  - ***MRV-MSCV < 25 fl***
    - ✓ευαισθησία (84-100%)
    - ✓ειδικότητα (93-94%)

Int J Lab Hematol, 2010
Indian J Pathol & Microb, 2015

Ποσοτικές μεταβλητές

- **Κλασικές**
  - *RBC, Ht, Hb, MCV, MCH, MCHC*
  - *WBC, NEUT% (#), LYM%(#), MONO%(#), EOS%(#)*
  - *PLT*
- **Στατιστικές**
  - *RDW, MSCV, MPV, PDW*
  - Σημαντική διαγνωστική αξία!
- **Γνωστής αξίας στην οπτική μικροσκόπηση**
  - *%(#) ΔΕΚ*
  - *Κλάσμα άωρων ΔΕΚ*
  - *Ερυθροβλάστες*

ΔΕΚ (%) & (#)

- Οπτική αρχή / φθορισμός
- % ΔΕΚ: Διόρθωση για το βαθμό αναιμίας

  ΔΕΔ = % ΔΕΚ × Hb ασθενούς/Hb φυσιολογ. × 0.5
- Προτιμάται ο # (δε χρειάζεται διόρθωση)
- Αναιμία
  - MCV κφ + ↑ ΔΕΚ: **«αναγεννητικού» τύπου**
  - MCV κφ + ↓ ΔΕΚ :**«μη αναγεννητικού» τύπου**

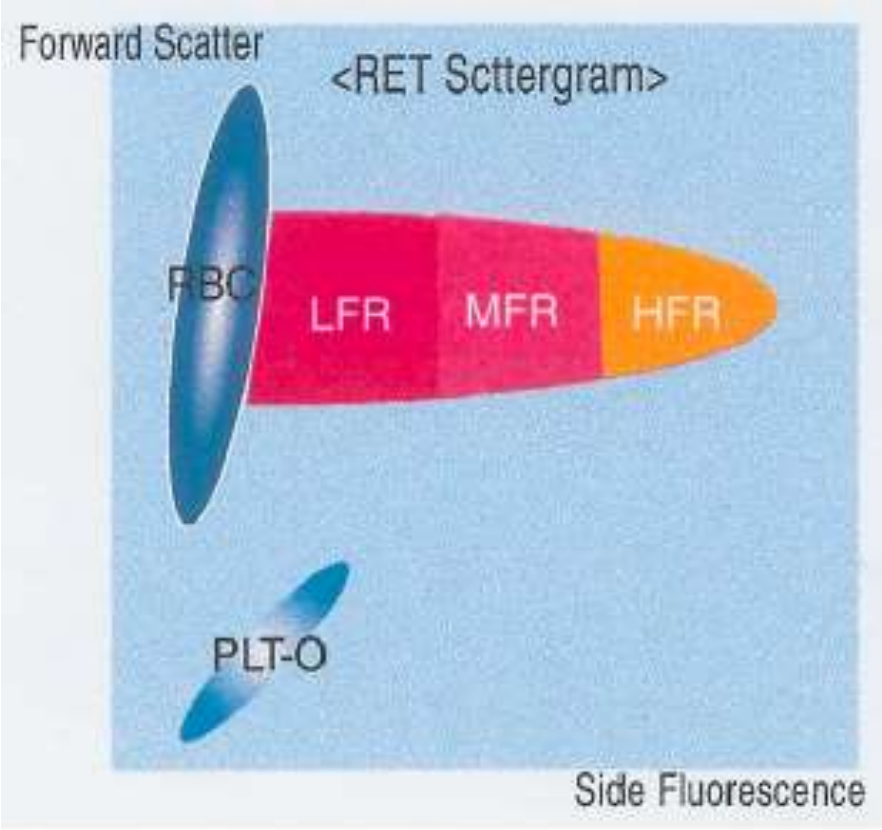
Μέση ποσότητα Hb ΔΕΚ

CHr (Bayer) / Ret-He (Sysmex)(φτ: 28-38 pg)

- Πληροφορίες για την τρέχουσα διαθεσιμότητα Fe
- Αξιόπιστος και πλέον ακριβής δείκτης σιδηροπενίας στο βρεφικό screening (CHr<27.5 pg)
- Εκτίμηση λειτουργικής σιδηροπενίας – Δεν επηρεάζεται από παρουσία φλεγμονής
  - Ret-He < 25 pg ➔ Σιδηροπενική αναιμία
  - Ret-He > 25 pg ➔ Αναιμία χρονίας νόσου
- Η εφαρμογή του στην παρακολούθηση των ασθενών με ΧΝΑ μείωσε τη χορήγηση ενδοφλέβιου σιδήρου
- Εκτίμηση αποτελεσμάτων αγωγής με Fe εντός 3 ημερών
- ***Ένας σημαντικος δείκτης!!!***

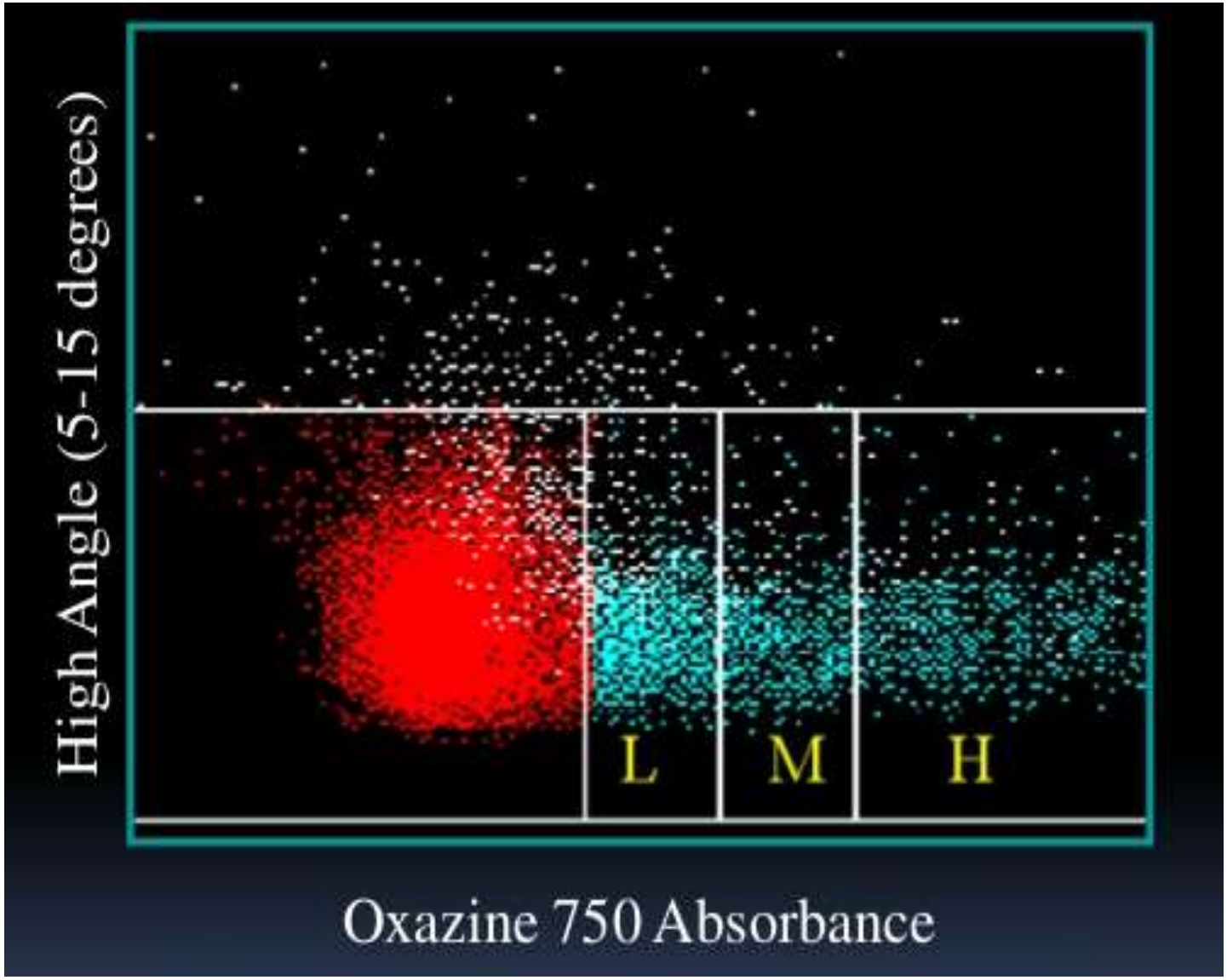
JAMA, 2005
British J of Haematol, 2013

Κλάσμα άωρων ΔΕΚ (IRF: Immature ret fraction)



- **LFR, MFR, HFR** (πρόσθιος σκεδασμός, φθορισμός RNA)
- Δείκτης ωριμότητας ΔΕΚ

  (IRF) = MFR + HFR
- Φτ:1.6-12.1%


High Angle (5-15 degrees)
L
M
H
Oxazine 750 Absorbance

Κλινική σημασία IRF

IRF>20%

- ✓ Επιτυχής εγκατάσταση μοσχεύματος σε μεταμόσχευση ΜΟ
- ✓ Απάντηση ασθενών με ΑΑ στην κυκλοσπορίνη
- ✓ Έξοδος από μυελική απλασία μετά ΧΜΘ
- ✓ Απάντηση ασθενών με ΧΝΑ στην ΕΡΟ

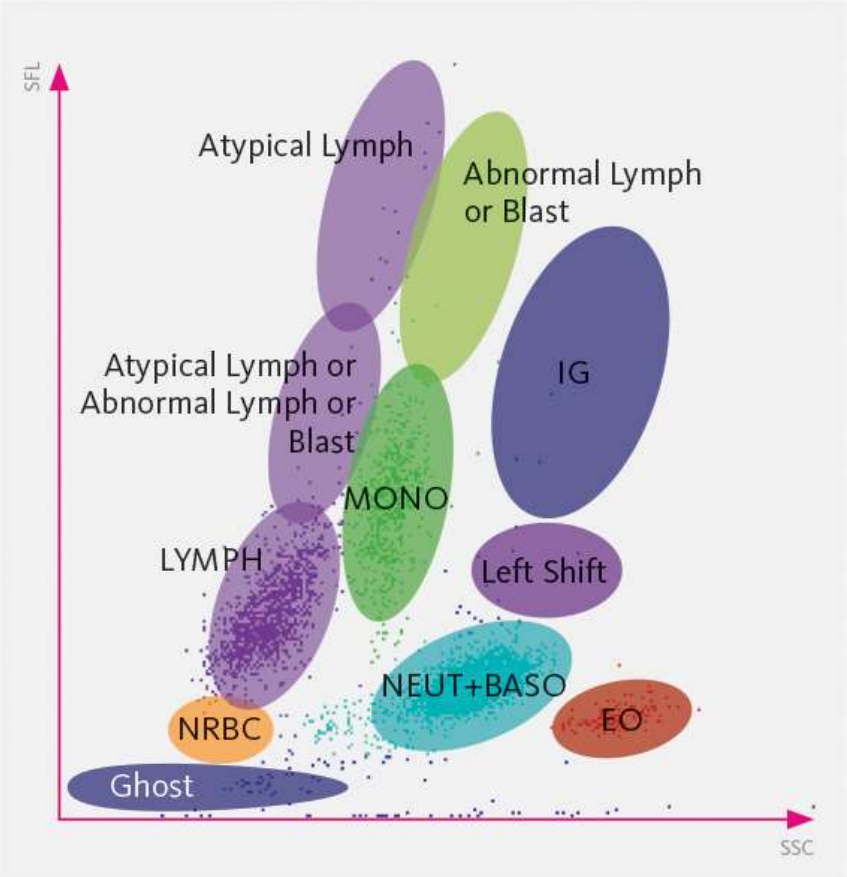
Εμπύρηνα Ερυθρά Αιμοσφαίρια(NRBC)

- Συνδυασμός πρόσθιου σκεδασμού και φθορισμού (PI) συνδέεται με DNA των πυρήνων των ΕΒ
- Στα νεογνά ανευρίσκονται NRBC στο περιφ. αίμα
- **Κλινική σημασία**
  - NRBC < 5%: ικανοποιητικό πρόγραμμα μεταγγίσεων
  - NRBC 30%: ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς με σοβαρή ενδονοσοκομειακή λοίμωξη

J Lab Clin Med, 2002

Λευκά αιμοσφαίρια

- Οι υποπληθυσμοί πάντα συγκρίνονται με τις τιμές αναφοράς για την ηλικία
- Η ένδειξη “flags” υποδεικνύει την παρουσία μορφολογικών αλλοιώσεων και επιβάλλει τη μικροσκόπηση του δείγματος



		Τιμές Αναφοράς			Τιμές Αναφοράς			Τιμές Αναφοράς
WBC	30,1 x10^3/μl	4,5-13,0	RBC	3,87 x10^6/μl	4,5-5,9			
			HGB	11,0 g/dl	13,5-17,5	PLT	57,0 x10^3/μl	130-400
NE %	— %		HCT	31,5 %	37-49	MPV	7,4	
LY %	— %		MCV	81,4 fl	78-98	PCT	0,040	
MO %	— %		MCH	28,4 pg	25-35	PDW	7,1	
EO %	0,3 %		MCHC	34,9 g/dl	29,0-36,0			
BA %	0,6 %		RDW*	15,9	11,5-14,5			
NE #	— x10^3/μl	1,5-8,0						
LY #	— x10^3/μl	1,2-5,2	RET %		0,4-2,0	IRF		
MO #	— x10^3/μl	0,03-1,50	RET #			HLR %		
EO #	0,1 x10^3/μl	0,05-0,70				HLR #		
BA #	0,2 x10^3/μl							

Εμπύρηνα Ερυθρά: 0 **Τ.Κ.Ε. 1η ώρα***

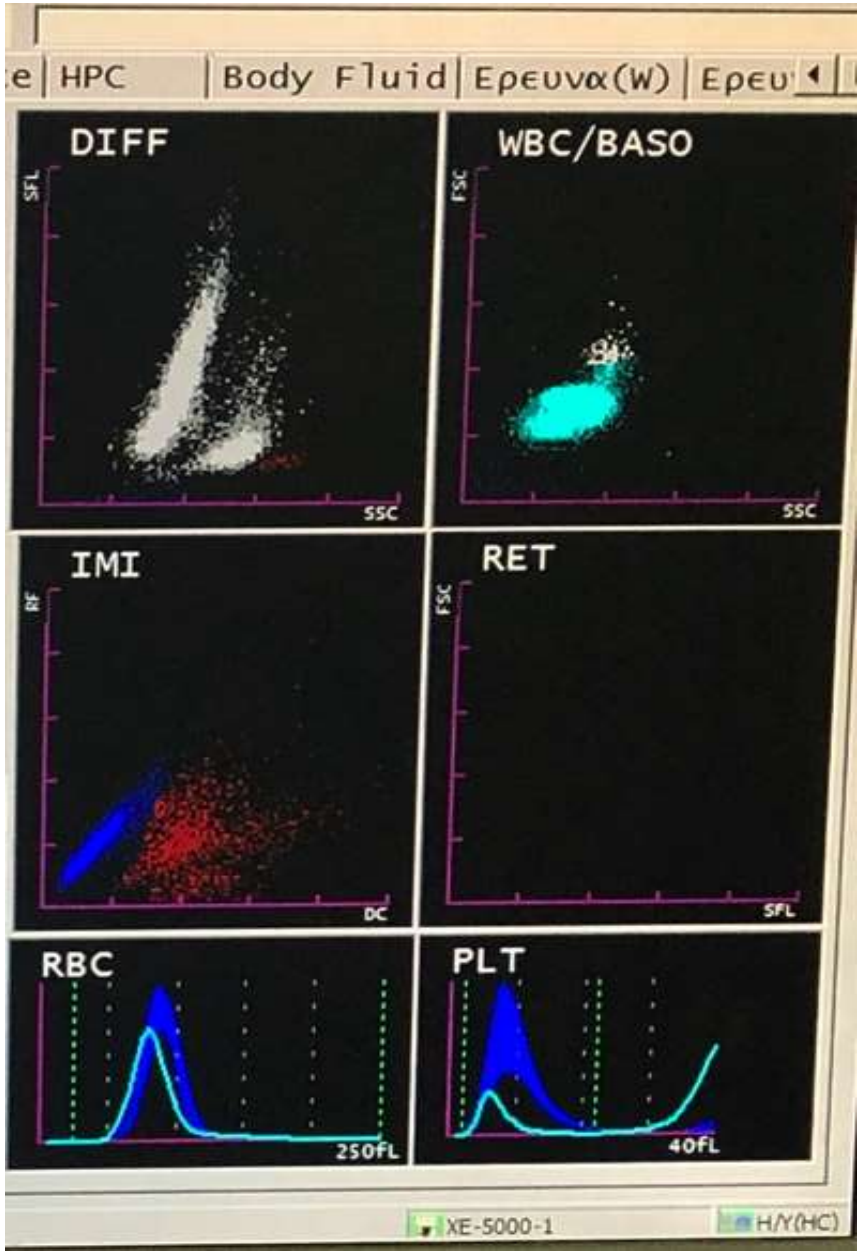
ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ

ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ		ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΕΡΥΘΡΩΝ
Πολυμορφοπύρηνα	8 %	Υποχρωμία
Λεμφοκύτταρα	12	Ανισοκυττάρωση
Μονοπύρινα	5	Μικροκύτταρα
Ηωσινόφιλα		Μακροκύτταρα
Βασεόφιλα		Ποικιλοκυττάρωση
Ραβδοπύρηνα		Στοχοκύτταρα
Μυελοκύτταρα	2 %	Πολυχρωματόφιλα
Μεταμυελοκύτταρα		Βασεόφιλη Στίξη
Προμυελοκύτταρα		Στοματοκυττάρωση
Βλάστες	73	Σχιστοκυττάρωση
		Σφαιροκυττάρωση

Εξετάσεις που σημαίνονται με αστερίσκο (*), βρίσκονται εκτός πεδίου διαπίστευσης ΕΣΥΔ.

Παρατηρήσεις:

Ο Ιατρός

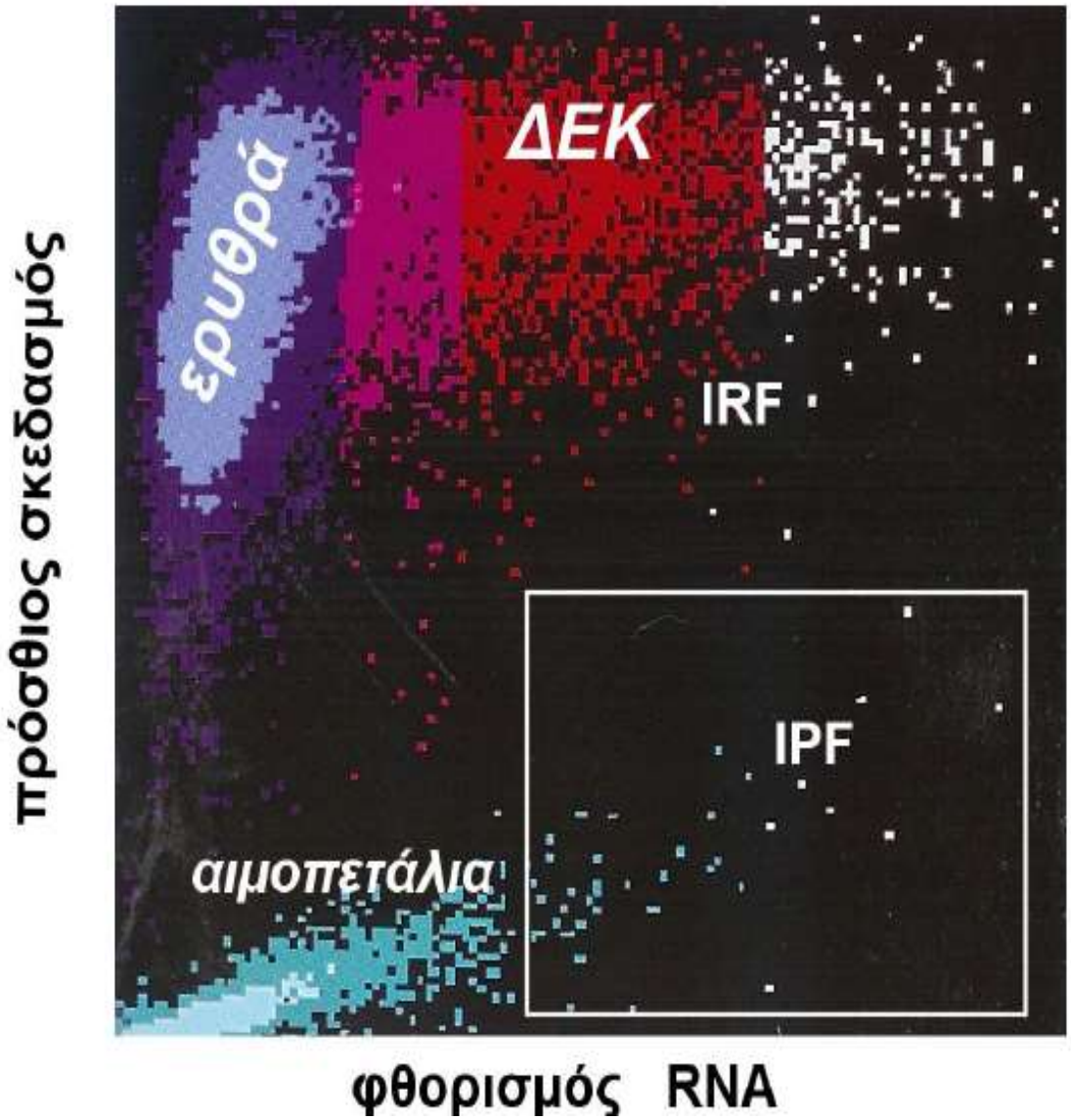


Χρήσιμοι δείκτες αιμοπεταλίων

- ***MPV*** *(μέσος όγκος PLT, φτ 8-12 fl)*
  - ↑ σε ITP
  - ↓ σε μειωμένη μυελική παραγωγή (Wiskott-Aldrich)
- ***PDW*** *(εύρος κατανομής PLT, φτ 7-12%)*
  - ↑ σε ITP
  - ↑ σε οξεία παγκρεατίτιδα (αρνητικός προγνωστικός παράγων)

Gastroenterology Research and Practice, 2017

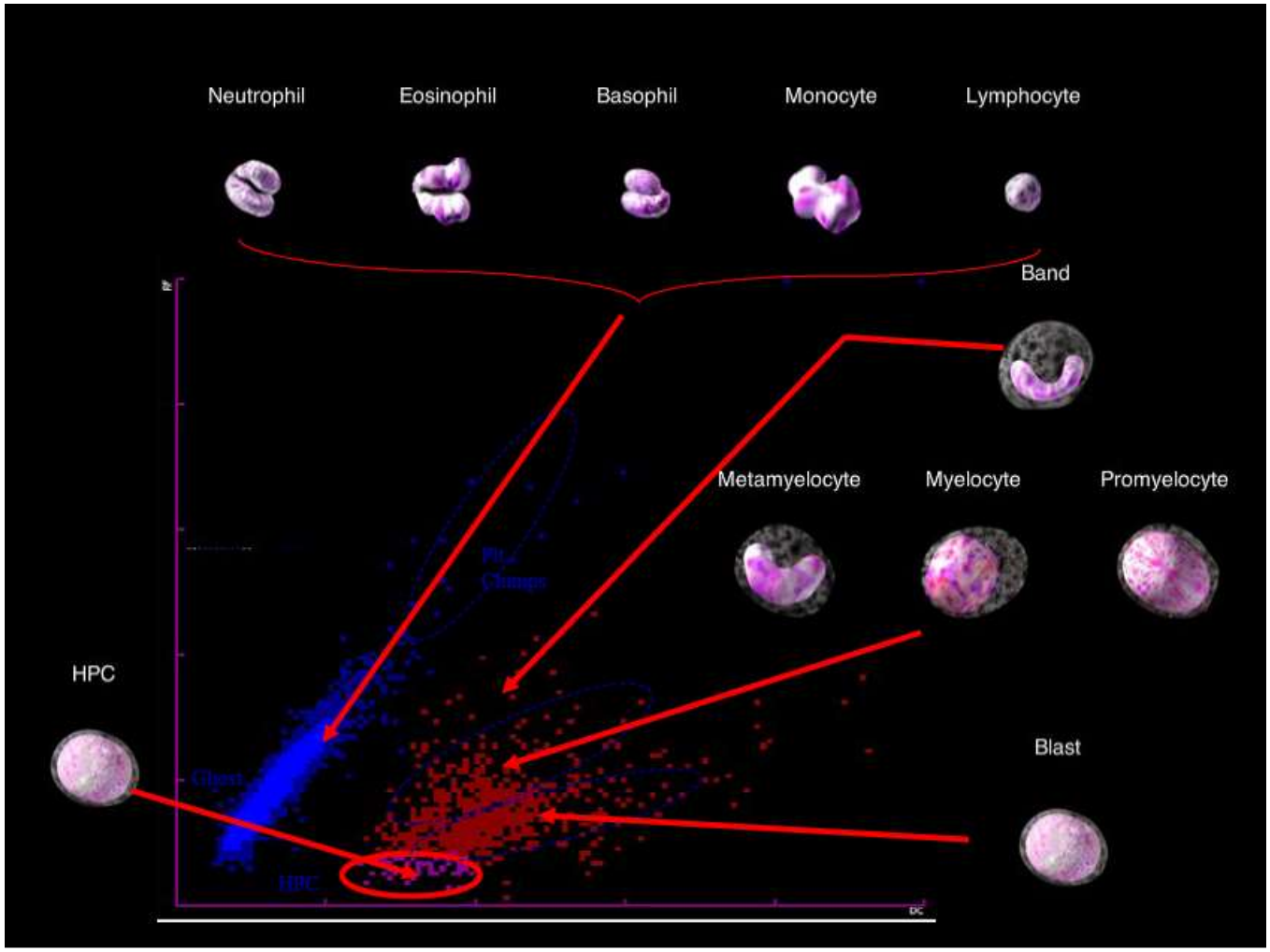
- ***IPF*** *(κλάσμα άωρων PLT, φτ 1.1-6.1%)*
  - ↑ ITP



Το κλάσμα των άωρων αιμοπεταλίων (IPF) είναι 3,4% (1,1-6,1%)

ITP 22,3 (9,2-48,3%)

Μέτρηση Μυελού Οστών



Σφάλματα στις μετρήσεις……

	RBC	WBC	PLT
Ψευδώς ↑	↑WBC	NRBC	
	↑μεγεθους PLT	↑μεγεθους PLT	
	Κρυοσφαιρίνες	Κρυοσφαιρίνες	Κρυοσφαιρίνες
		Παραπρωτεϊναιμία	
		Υπερλιπιδαιμία	Υπερλιπιδαιμία
Ψευδώς ↓	Μικροπήγματα	Μικροπήγματα	Μικροπήγματα
	Αιμόλυση		↑μεγεθους PLT
	Ψυχροσυγκολλητίνες		

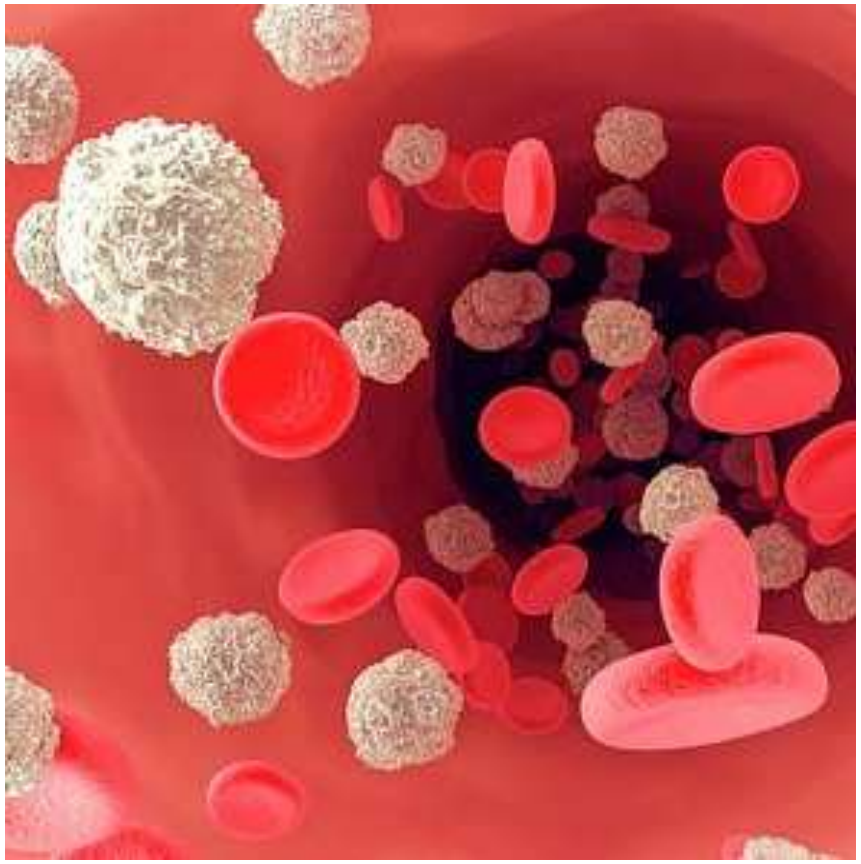
Ποιοτικός έλεγχος αναλυτών

- **Εσωτερικός έλεγχος ποιότητας**
  - Καθημερινός έλεγχος των αναλυτών με τα διαλύματα ελέγχου (controls).
  - Ανταλλαγή δειγμάτων μεταξύ δύο παρόμοιας τεχνολογίας αιματολογικών αναλυτών του εργαστηρίου
- **Εξωτερικός έλεγχος ποιότητας**
  - Κρατικά προγράμματα (NEQAS, National External Quality Assessment Scheme).
  - Διεθνή προγράμματα (Sysmex-IQAS, International Quality Assurance System, IQAS on line).

Συμπερασματικά.....

- Οι αυτόματοι αιματολογικοί αναλυτές προσφέρουν γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα.
- Ο εργαστηριακός γιατρός πρέπει να γνωρίζει καλά τα τεχνικά χαρακτηριστικά του αναλυτή, να αξιολογεί τα ευρήματα, να αναγνωρίζει και να διορθώνει τις ψευδείς μετρήσεις.
- Η παραδοσιακή αιματολογία παραμένει σταθερή αξία καθώς οι αυτόματοι αναλυτές δε μπορούν να λειτουργήσουν ανεξάρτητα από το οπτικό μικροσκόπιο.

Ευχαριστώ!!!



Lucy Wills (1888-1964)