



Методы гематологических исследований

План лекции

- Количественные методы подсчета клеток крови и костного мозга. Ручные и автоматизированные методы
- Подсчет количества эритроцитов, определение гематокрита, СОЭ
- Методы определения гемоглобина
- Патологические формы эритроцитов
- Подсчет количества лейкоцитов, лейкоцитарная формула. Патологические формы эритроцитов
- Подсчет тромбоцитов

Общий анализ крови

- Гемоглобин
- Эритроциты
- Лейкоциты
- Тромбоциты
- Лейкоцитарная формула
- СОЭ
- Гематокрит
- Тромбоциты
- Расчетные показатели (цветовой показатель, MCV и т.д.)

Гематитовый метод (метод Сали)

- * Основан на превращении гемоглобина при прибавлении к крови хлористо-водородной кислоты в хлоргемин (хлорид гематита) коричневого цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию гемоглобина.
- * Полученный раствор хлорида гематита разводят водой до цвета стандарта, соответствующего известной концентрации гемоглобина.

Цианметгемоглобиновый метод

- * В классическом гемиглобинцианидном методе (метод Драбкина) Fe^{2+} гемоглобина окисляется до Fe^{3+} 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.

Изменение концентрации гемоглобина

- * Повышение гемоглобина отмечается при:
 - * первичной и вторичной эритроэмии;
 - * обезвоживании (ложный эффект за счёт гемоконцентрации);
 - * чрезмерном курении (образование функционально неактивного HbCO).
- * Снижение гемоглобина выявляется при:
 - * анемии;
 - * гипергидратации (ложный эффект за счёт гемодилюции – «разбавления» крови).

Цветовой показатель

- * Отражает относительное содержание гемоглобина в эритроцитах

$$\text{Цветовой показатель} = \frac{X_{\text{гем}} \cdot 3}{\text{Первые 2 цифры } X_{\text{эр}}}.$$

- * По величине цветового показателя анемии принято делить на гипохромные ($<0,8$), нормохромные ($0,85-1,05$) и гиперхромные ($>1,1$).

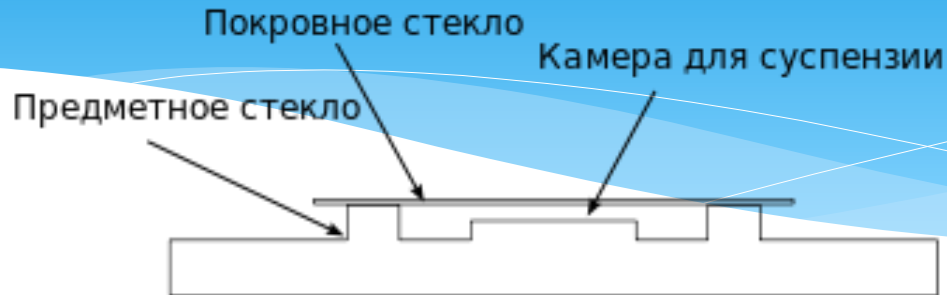
Среднее содержание гемоглобина в эритроците

- * Отражает абсолютное содержание гемоглобина в одном эритроците в пг

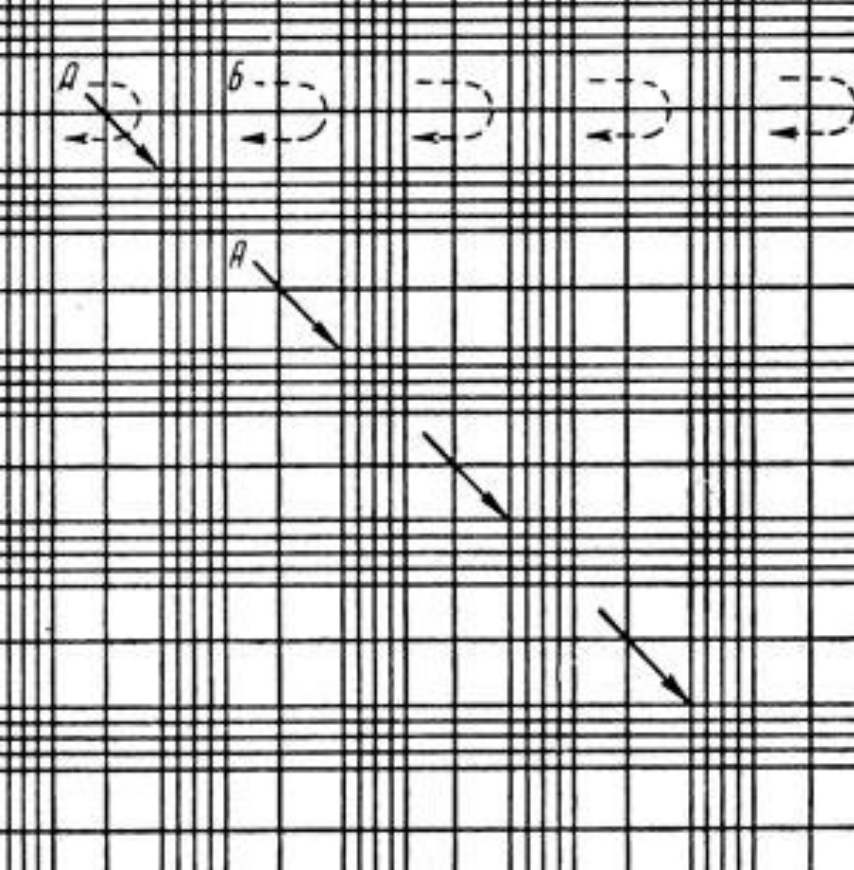
$$MCH = \text{Гемоглобин (г/дл)} \times 10 / \text{RBC} (*10^{12}/\text{л})$$

- * Снижение показателя отражает гипохромию, снижение наблюдается при железодефицитных анемиях, повышение – при макроцитарных, особенно мегалобластных анемиях

Подсчет клеток крови в камере Горяева



- Представляет собой предметное стекло с бороздами и нанесённой микроскопической сеткой.
- Размеры малых делений клетки сетки составляют 0,05 мм, а больших — 0,2 мм.
- Сетка нанесена на площадку, расположенный на 0,1 мм ниже, чем две соседние площадки. Эти площадки служат для притирания покровного стекла.



Сетка камеры Горяева

- В сетке камеры Горяева имеются
- 3600 малых квадратов: сторона $1/20$ мм, площадь $1/4000$ мм², объем $1/40000$ мкл;
- 225 больших квадратов: сторона $1/5$ мм, площадь $1/25$ мм², объем $1/250$ мкл.
- Сторона всей сетки 3 мм, площадь 9 мм², объем 0, 9 мкл; высота камеры, создающаяся при притирании шлифованного покровного стекла, – 0, 1 мм.

Работа с камерой Горяева

- * Камеру и шлифованное покровное стекло перед заполнением моют водопроводной водой, насухо вытирают.
- * На участок камеры, где нанесены сетки, укладывают шлифованное покровное стекло.
- * Притирают шлифованное покровное стекло до появления цветных колец Ньютона
- * Каплю исследуемой жидкости помещают перед щелью, образующейся между шлифовальным стеклом и счетной камерой
- * Одну из сеток заполняют для подсчета эритроцитов, вторую – для подсчета лейкоцитов. При заполнении камеры следят за тем, чтобы в пространстве над сеткой не было пузырьков воздуха и избытка жидкости

Подсчет эритроцитов и лейкоцитов в камере Горяева. Пробоподготовка.

- * Для подсчета количества эритроцитов и лейкоцитов необходимо приготовить две пробирки:
 - * для эритроцитов – с 4 мл физиологического раствора
 - * для лейкоцитов – с 400 мкл 3% раствора уксусной кислоты.
- * В обе пробирки вносят по 20 мкл крови и тщательно перемешивают содержимое.
- * Таким образом, в первой пробирке (для эритроцитов) получают разведение в 200 раз, а во второй пробирке (для лейкоцитов) – в 20 раз.
- * Одну из сеток заполняют для подсчета эритроцитов, вторую – для подсчета лейкоцитов.

Подсчет эритроцитов и лейкоцитов в камере Горяева. Подсчет эритроцитов

- * К подсчету форменных элементов в счетной камере приступают через 2-3 мин после ее заполнения
- * Эритроциты подсчитывают в 5 больших квадратах, каждый из которых разделен на 16 малых квадратов
- * Для расчета количества эритроцитов в 1 л пользуются следующей формулой: $x = (a \cdot 4000 \cdot v) / c \cdot 10^6$,
где x – количество эритроцитов в 1 л крови; a – сумма эритроцитов, подсчитанных в 5 квадратах; 4000 – множитель, приводящий результат к объему 1 мкл крови, v – разведение крови в 200 раз; c – число сосчитанных малых квадратов – 80; 10^6 – количество мкл в 1 л.
- * Таким образом,
- * **$x = a \times 10\,000 \times 10^6 / л.$**

Подсчет эритроцитов и лейкоцитов в камере Горяева. Подсчет лейкоцитов

- * Лейкоциты подсчитывают в 100 больших квадратах.
- * Расчет производят по той же формуле
 - * $y = (a \cdot 4000 \cdot v) / c \cdot 10^6$,
- * однако цифра, характеризующая разведение крови, равна 20, а количество подсчитанных малых квадратов – 1600.

$$y = \frac{a \times 4000 \times 20}{1600} \times 10^6 = a \times 50 \times 10^6$$

Метод Фонио. Пробоподготовка.

- * Основан на определении количества кровяных пластинок в окрашенных мазках крови па 1000 эритроцитов.
- * Капилляром Панченкова набирают раствор сульфата магния или ЭДТА до метки «75» и вносят в пробирку. Туда же вливают кровь, взятую из пальца капилляром Панченкова до метки «0».
- * Таким образом, получают соотношение антикоагулянта и крови 1:4.
- * Содержимое пробирки хорошо перемешивают и из смеси готовят тонкие мазки, которые фиксируют и окрашивают по Романовскому-Гимзе.

Метод Фонио. Учет результата

- * Определяют количество тромбоцитов на 1000 эритроцитов.
- * Вычисляют количество кровяных пластинок в 1 мкл крови, зная абсолютное число эритроцитов в 1 мкл крови.
- * Составляется пропорция, по которой вычисляется абсолютное количество тромбоцитов в крови.

Унифицированный метод после окраски ретикулоцитов бриллиантовым крезоловым синим

- * Принцип. Суправитальная окраска красителями, выявляющими зернисто-нитчатую субстанцию ретикулоцитов
- * Необходимо подсчитать не менее 1000 эритроцитов и отметить среди них количество эритроцитов, содержащих зернисто-нитчатую субстанцию.
- * Норма: У здоровых число ретикулоцитов составляет 2-12 ‰, или 0,2-1,2 %.

Гематокрит — это соотношение между объемом форменных элементов крови, в основном эритроцитов, и объемом плазмы.

- * Метод определения гематокрита основан на разделении плазмы и эритроцитов с помощью центрифугирования.
- * Определение производят в гематокритной трубке, представляющей собой стеклянную пипетку, разделенную на 100 равных частей.
- * Перед взятием крови гематокритную трубку промывают раствором гепарина, затем набирают в трубку капиллярную кровь до отметки «100», закрывают резиновым колпачком и центрифугируют в течение 1-1,5 часа при 1,5 тысячи оборотов в минуту. После этого отмечают, какую часть в градуированной трубке составляют эритроциты, это и есть гематокрит.

СОЭ Нормы

- * Новорождённые – 0-2 мм/ч;
- * Дети до 6 лет – 12-17 мм/ч;
- * Мужчины до 60 лет – до 8 мм /ч;
- * Женщины до 60 лет – до 12 мм/ч;
- * Мужчины старше 60 лет – до 15 мм/ч;
- * Женщины старше 60 лет – до 20 мм/ч.

Причины изменения СОЭ

- * **Увеличение СОЭ:** инфекционно-воспалительном заболевании; коллагенозах; поражении почек, печени, эндокринных нарушениях; беременности (до 45 мм/ч), в послеродовом периоде, менструации; переломах костей; оперативных вмешательствах; анемиях; онкологических заболеваниях, после приёма пищи (до 25 мм/ч).
- * **Снижение СОЭ:** гипербилирубинемии; повышении уровня желчных кислот; хронической недостаточности кровообращения; эритремии; гипофибриногенемии.

Классификация гематологических анализаторов

- * I класс - определяющие до 20 параметров, красная кровь, лейкоциты, тромбоциты, 3dif (МЕК-6400 Nihon Kohden, Адвия 60 Bayer)
- * II класс - позволяющие проводить развернутый анализ крови, в том числе полную дифференцировку лейкоцитов по 5-ти параметрам (Pentra-60, Cell-Dyn 3700, МЕК-8222).
- * III класс – дополнительно выполняющие подсчет и анализ ретикулоцитов, незрелых гранулоцитов, некоторых субпопуляций лимфоцитов; при необходимости комплектуются блоком для автоматического приготовления и окраски мазков из заданных образцов крови (Sysmex ХЕ-2100, Coulter LH750, Advia 2120, Pentra 120).

Рекомендации по правильному использованию гематологических анализаторов

- * Тщательно изучить инструкцию
- * Использовать кровь с К-ЭДТА
- * Контролировать качество работы по контрольным материалам
- * Использовать оригинальные расходники
- * Перед анализом осторожно, но тщательно перемешайте пробирку с кровью.
- * Перед выдачей результатов посмотрите на них
- * Обращайте внимание на сообщения прибора об ошибках.
- * Увеличение МСНС чаще результат ошибки измерения.
- * При выявлении ошибки обязательно устраните причину, не работайте на неисправном приборе.

Рекомендации по правильному использованию гематологических анализаторов

- * После окончания измерений тщательно промойте анализатор, не перекладывайте эту работу на других.
- * При остановке прибора на длительный срок обязательно выполните все процедуры консервации. Лучше эту работу выполнить вместе с сервис-инженером.
- * При возникновении технических проблем дождитесь сервис-инженера, авторизованного фирмой - поставщиком. Не доверяйте работать на приборе и копаться в нем необученному персоналу.
- * Заключите контракта на постоянное сервисное обслуживание с производителем прибора



Вопросы?