



Углубленный автоматизированный анализ «патологических» образцов крови Концепция Hematoflow

Русанова Екатерина Борисовна, к.б.н.
Лаборатория клинической иммунологии и
молекулярной диагностики,
ПСПбГМУ им.акад.И.П.Павлова

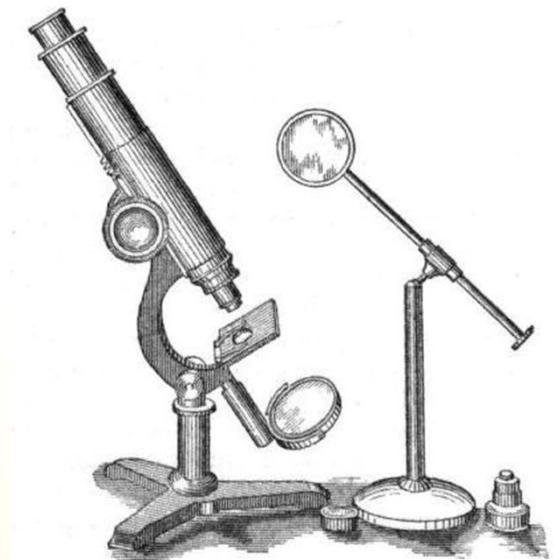


Чита, 24 апреля 2014

Simplify • Automate • Innovate

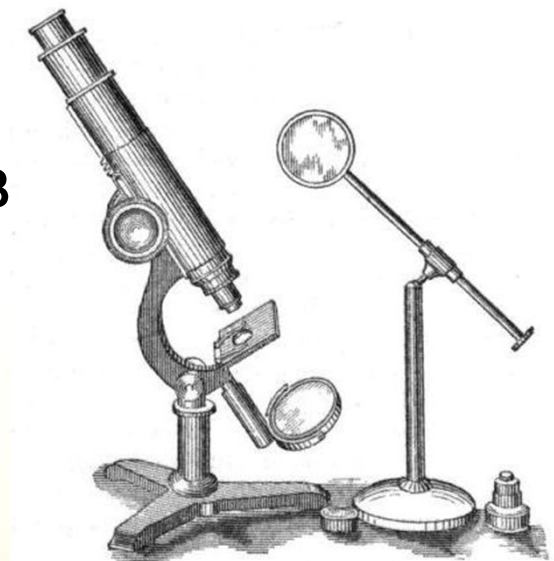
История анализа крови

- Более 330 лет назад Левенгук впервые описал красные кровяные тельца и сумел измерить диаметр клеток, используя простой микроскоп, состоящий из небольших двояковыпуклых линз



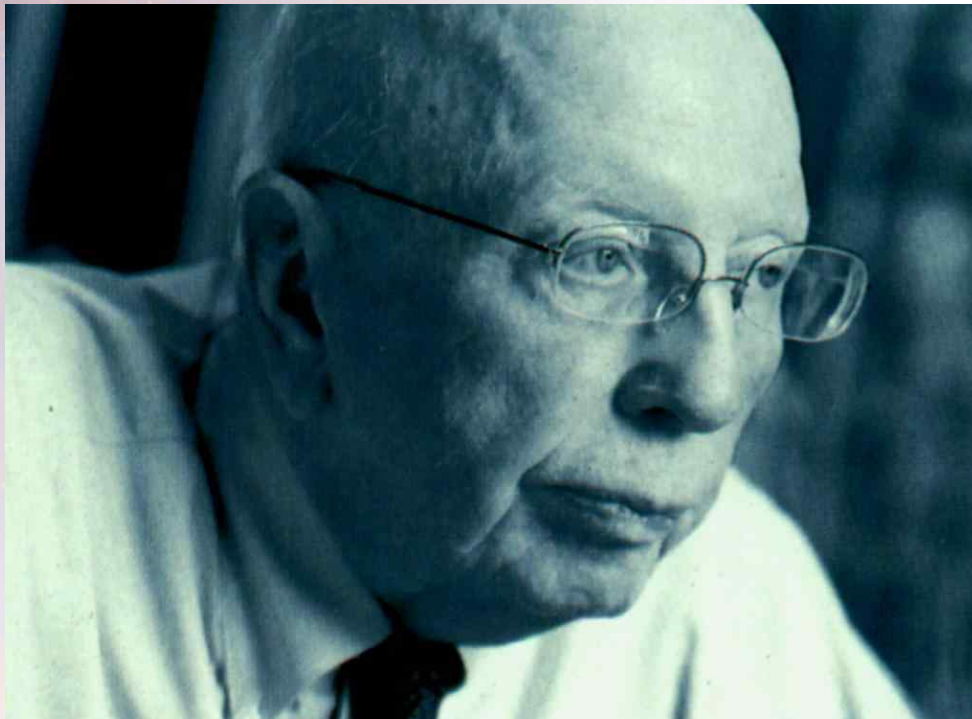
История анализа крови

- В 1877г. Пауль Эрлих окрасил клетки крови анилиновыми красителями и сумел разглядеть ядро, цитоплазму и тонкие структуры клетки. Он дифференцировал белые клетки на пять основных типов



История анализа крови

*Wallace Coulter разработал и в 1956 г.
представил первый
автоматизированный
анализатор для
подсчета и определения
размера клеток*



История анализа крови

В течение 70 - 90 годов были созданы современные автоматизированные системы, которые превосходно подходят для подсчета лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, а также для дифференциального подсчета хорошо различающихся (зрелых) субпопуляций лейкоцитов



История анализа крови

- Современная визуальная микроскопия – непревзойденный метод дифференциации клеток, в особенности незрелы основании их тонких особеннос
- Анализ мазков предоставляет информацию, дополняющую результаты, полученные с помощью анализатора, или совершенно новые данные



Современный общий анализ крови

Ручной анализ (чаще всего, исследование мазка), как правило, выполняется после автоматизированного анализа при получении результатов, удовлетворяющих определенным критериям

Частота микроскопических исследований в различных лабораториях варьирует

от 5% до 95%

Автоматизированные системы VS визуальная микроскопия

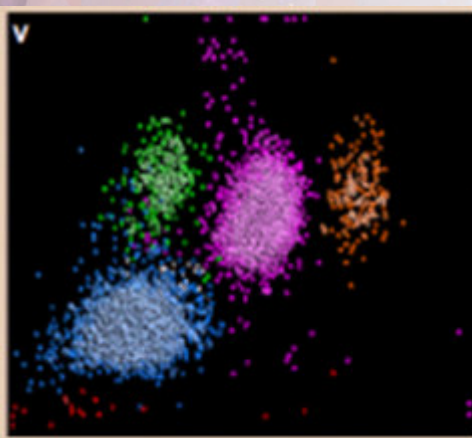


- превосходно подходят для подсчета лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, а также для дифференциального подсчета хорошо различающихся (зрелых) субпопуляций лейкоцитов, в то время как визуальная микроскопия – непревзойденный метод дифференциации клеток, в особенности незрелых, на основании их тонких особенностей



Сегодня

- Патологические пробы - микроскопия с подсчетом 100 клеток для анализа лейкоцитарной формулы



WBC	3.21	L	10 ⁹ /μL
NE %	19.88	L	%
LY %	57.77	H	%
MO %	12.87	H	%
EO %	8.53	H	%
BA %	0.95		%
NRBC %	0.00		%

Пример:
микроскопия и подсчет 100 клеток :

1й подсчет: 3 эозинофила,

0 миелоцитов

2й подсчет: 1 эозинофил,
4 миелоцит

WBC Est		
Neut	52	60
Lymph	35	29
Mono	7	8
Eos	1	3
Baso	1	
NRBC		
Band		
Imm Gran		
Var Lymph		
Blast		

Myelo. 4

Точность ручного метода счета

Ruemke Table

a	n = 100	n = 200	n = 500	n = 1.000	n = 10.000
0	0 - 3.6	0 - 1.8	0 - 0.7	0 - 0.4	0 - 0.1
1	0.0 - 5.4	0.1 - 3.6	0.3 - 2.3	0.5 - 1.8	0.8 - 1.3
2	0.2 - 7.0	0.6 - 5.0	1.0 - 3.6	1.2 - 3.1	1.7 - 2.3
3	0.6 - 8.5	1.1 - 6.4	1.7 - 4.9	2.0 - 4.3	2.6 - 3.4
4	1.1 - 9.9	1.7 - 7.7	2.5 - 6.1	2.9 - 5.4	3.6 - 4.5
5	1.6 - 11.3	2.4 - 9.0	3.3 - 7.3	3.7 - 6.5	4.5 - 5.5
6	2.2 - 12.6	3.1 - 10.2	4.1 - 8.5	4.6 - 7.7	5.5 - 6.5
7	2.9 - 13.9	3.9 - 11.5	4.9 - 9.6	5.5 - 8.8	6.5 - 7.6
8	3.5 - 15.2	4.6 - 12.7	5.8 - 10.7	6.4 - 9.9	7.4 - 8.6
9	4.2 - 16.4	5.4 - 13.9	6.6 - 11.9	7.3 - 10.9	8.4 - 9.6
10	4.9 - 17.6	6.2 - 15.0	7.5 - 13.0	8.2 - 12.0	9.4 - 10.7
15	8.6 - 23.5	10.4 - 20.7	12.0 - 18.4	12.8 - 17.4	14.3 - 15.8
20	12.7 - 29.2	14.7 - 26.2	16.6 - 23.8	17.6 - 22.6	19.2 - 20.8
25	16.9 - 34.7	19.2 - 31.6	21.3 - 29.0	22.3 - 27.8	24.1 - 25.9
30	21.2 - 40.0	23.7 - 36.9	26.0 - 34.2	27.2 - 32.9	29.1 - 31.0
35	25.7 - 45.2	28.4 - 42.0	30.8 - 39.4	32.0 - 38.0	34.0 - 36.0
40	30.3 - 50.3	33.2 - 47.1	35.7 - 44.4	36.9 - 43.1	39.0 - 41.0
45	35.0 - 55.3	38.0 - 52.2	40.6 - 49.5	41.9 - 48.1	44.0 - 46.0
50	39.8 - 60.2	42.9 - 57.1	45.5 - 54.5	46.9 - 53.1	49.0 - 51.0
55	44.7 - 65.0	47.8 - 62.0	50.5 - 59.4	51.9 - 58.1	54.0 - 56.0
60	49.7 - 69.7	52.9 - 66.8	55.6 - 64.3	56.9 - 63.1	59.0 - 61.0
65	54.8 - 74.3	58.0 - 71.6	60.6 - 69.2	62.0 - 68.0	64.0 - 66.0
70	60.0 - 78.8	63.1 - 76.3	65.8 - 74.0	67.1 - 72.8	69.0 - 70.9
75	65.3 - 83.1	68.4 - 80.8	71.0 - 78.7	72.2 - 77.7	74.1 - 75.9
80	70.8 - 87.3	73.8 - 85.3	76.2 - 83.4	77.4 - 82.4	79.2 - 80.8
85	76.5 - 91.4	79.3 - 89.6	81.6 - 88.0	82.6 - 87.2	84.2 - 85.7
90	82.4 - 95.1	85.0 - 93.8	87.0 - 92.5	88.0 - 91.8	89.3 - 90.6
91	83.6 - 95.8	86.1 - 94.6	88.1 - 93.4	89.1 - 92.7	90.4 - 91.6
92	84.8 - 96.5	87.3 - 95.4	89.3 - 94.2	90.1 - 93.6	91.4 - 92.6
93	86.1 - 97.1	88.5 - 96.1	90.4 - 95.1	91.2 - 94.5	92.4 - 93.5
94	87.4 - 97.8	89.8 - 96.9	91.5 - 95.9	92.3 - 95.4	93.5 - 94.5
95	88.7 - 98.4	91.0 - 97.6	92.7 - 96.7	93.5 - 96.3	94.5 - 95.5
96	90.1 - 98.9	92.3 - 98.3	93.9 - 97.5	94.6 - 97.1	95.5 - 96.4
97	91.5 - 99.4	93.6 - 98.9	95.1 - 98.3	95.7 - 98.0	96.6 - 97.4
98	93.0 - 99.8	95.0 - 99.4	96.4 - 99.0	96.9 - 98.8	97.7 - 98.3
99	94.6 - 99.9	96.4 - 99.9	97.7 - 99.7	98.2 - 99.5	98.7 - 99.2
100	96.4 - 100	98.2 - 100	99.3 - 100	99.6 - 100	99.9 - 100

Референсный метод сегодня - микроскопия

H20-A2
Vol. 27 No. 4
Replaces H20-A
Vol. 12 No. 1

Reference Leukocyte (WBC) Differential
Count (Proportional) and Evaluation of
Instrumental Methods; Approved
Standard—Second Edition

Published in 2007

Ограничения существующего референсного метода

The 400-cell differential count and the statistical evaluation as outlined in the previous sections have served reasonably well since the first version of this document in 1981. However, its performance characteristics have been criticized for a number of reasons, including subjectivity of the blood film examiner and also its relatively large imprecision, particularly with basophil and monocyte counting when counting 200 or 400 WBC on a manually prepared blood film. Uneven distribution of nucleated cells on wedge films can lead to additional problems.

The automated instrumental identification of WBC and the counting of larger numbers of WBC can result in more accurate and precise WBC differentials, as well as a more reliable differentiation of immature granulocytes.

A 400-cell differential count lacks the accuracy, reproducibility and precision to be treated as a true reference standard in light of currently available technologies

Альтернативный референсный метод

- Альтернативный метод - использование МКАТ и многоцветной проточной цитометрии для идентификации и подсчета популяций лейкоцитов
- Проточная цитометрия:
 - Более пригодна для идентификации малоклеточных популяций и морфологически трудно разделяемых популяций
 - Объективный метод
 - Возможно идентифицировать не только морфологически различные популяции, но и функционально разные типы клеток (активированные MO, LY, NE)

Применение проточной цитометрии в медицине

- Иммунофенотипирование лимфоцитов
- Типирование лейкозов и лимфом
- Исследование ликвора, костного мозга, продукта афереза
- HLA-B27
- Мониторинг стволовых клеток
- Мониторинг после трансплантации/контроль сепсиса
- Кровотечение при беременности
- Оценка функций гранулцитов
- Оценка функций тромбоцитов
- Анализ клеточного цикла
- ...

... и подтверждение аномальных результатов, полученных при стандартном гематологическом исследовании

HematoFlow

Новая концепция для анализа патологических образцов

- Анализ CBC/Diff/Retic на гематологическом анализаторе LH или DxH 800
- Результаты отправляются на REMISOL Advance для валидации
 - Для патологических образцов создается заказ на дополнительное исследование на проточном цитометре
- Валидация результатов на основе данных гем анализатора и проточника
- Микроскопия используется только для специальных случаев (Morphology, RBC and Platelets etc)

НematoFlow и CytoDiff

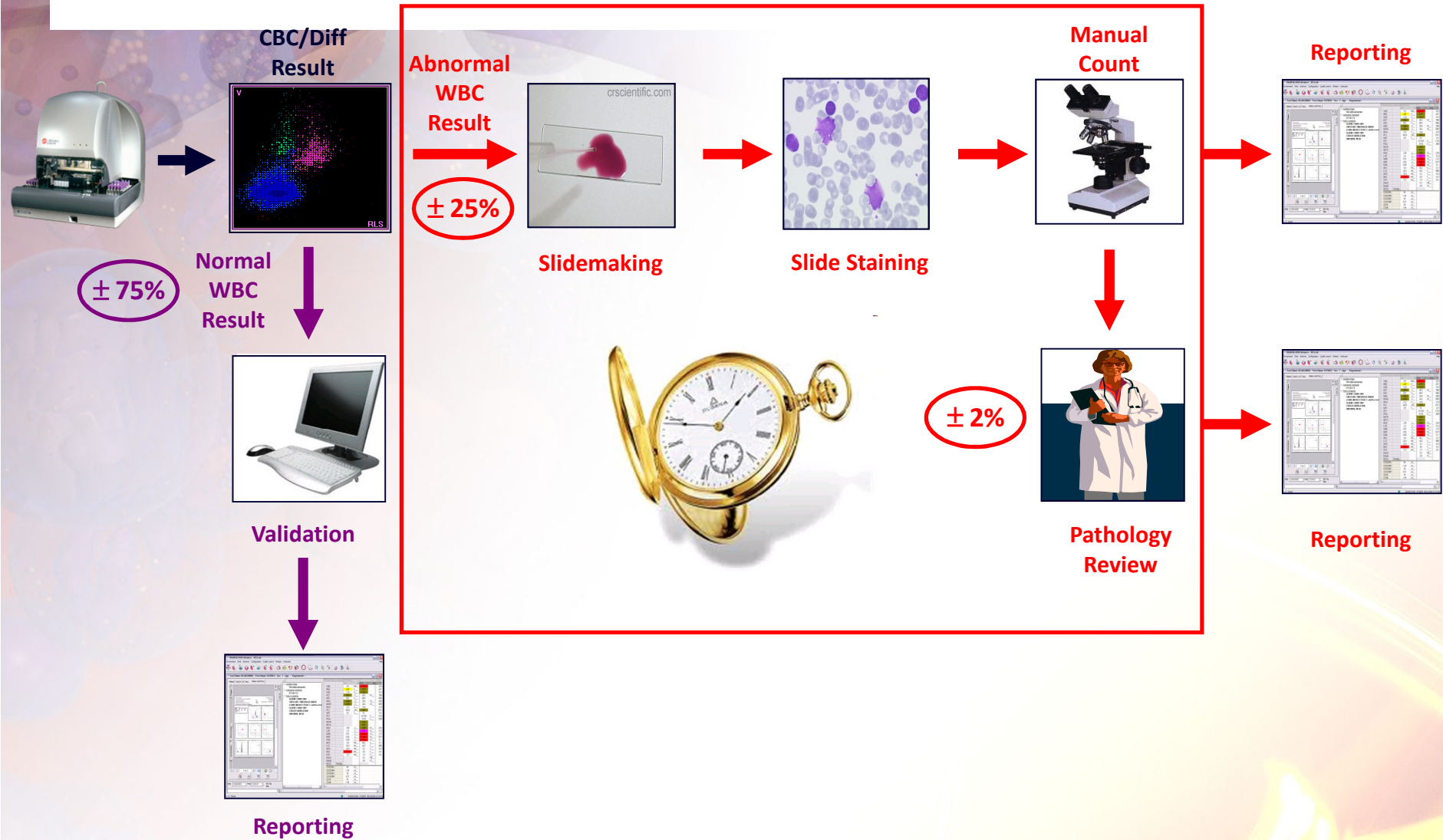
НematoFlowTM

Комплексный подход с внедрением проточного цитометра в рутинную гематологическую лабораторию

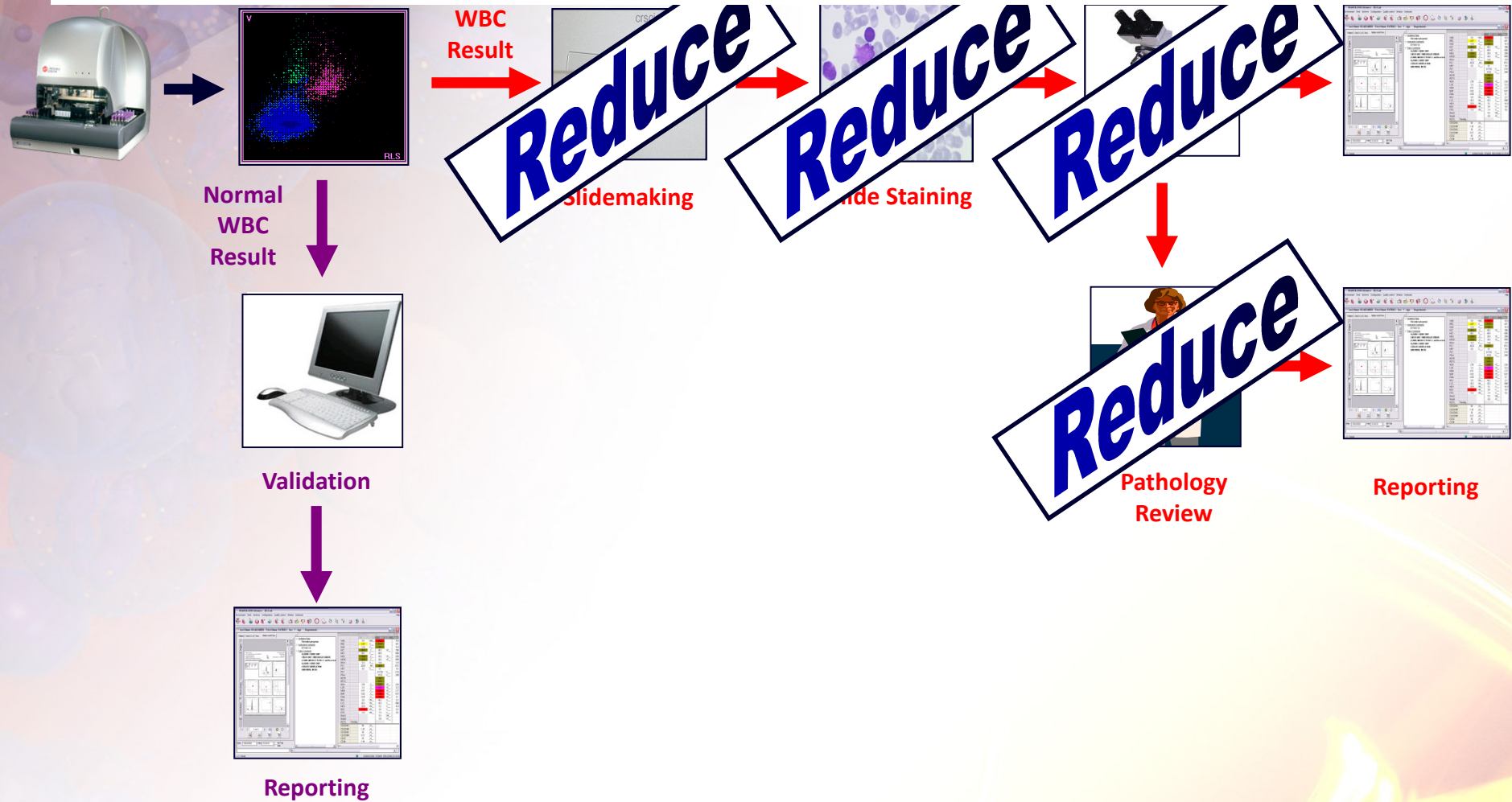
CytoDiffTM

5 –цветный коктейль из 6 антител, который позволяет идентифицировать 16 клеточных популяций

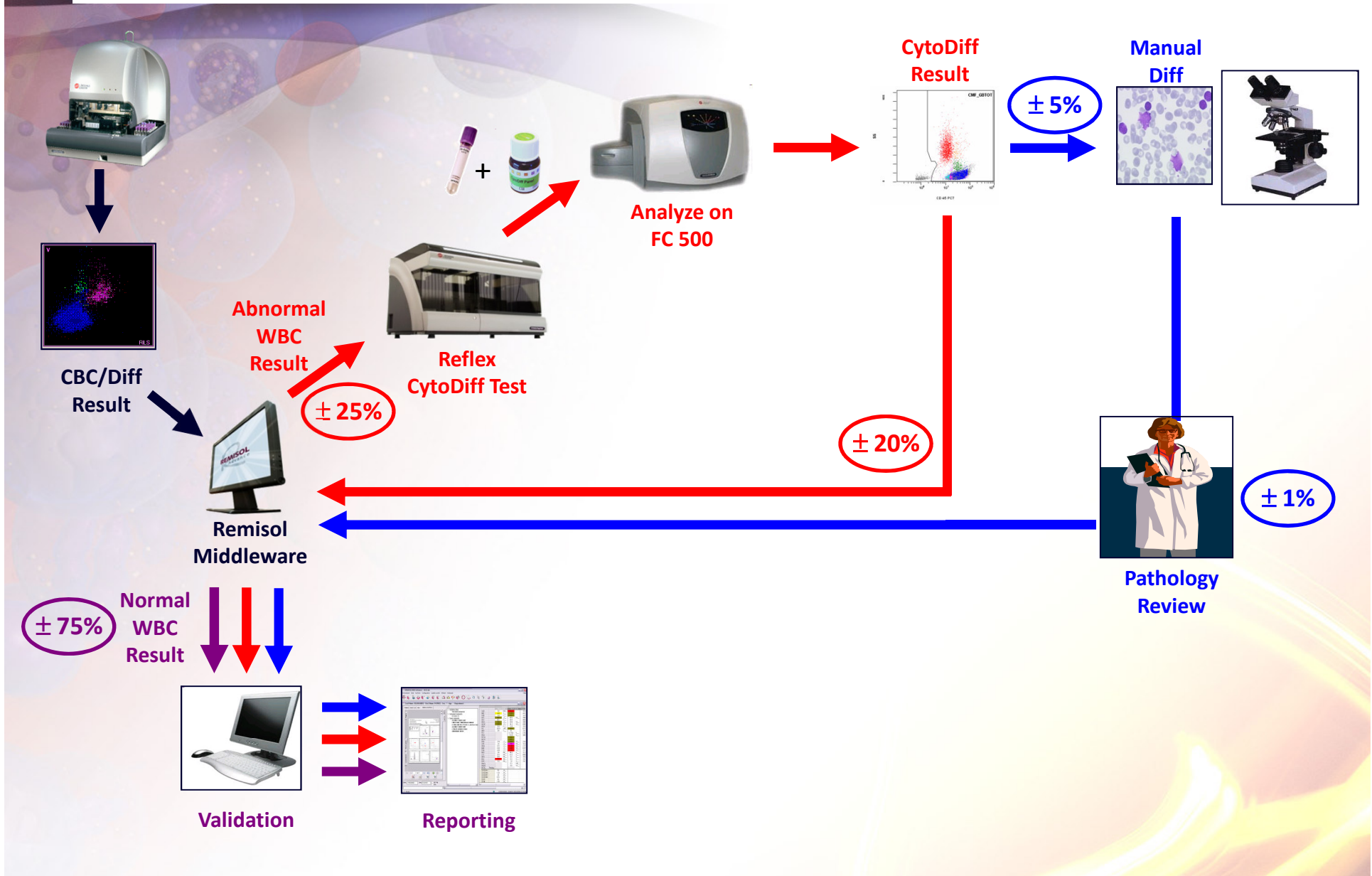
Лабораторный процесс без HematoFlow



Лабораторный процесс без HematoFlow



Лабораторный процесс с HematoFlow



CytoDiff

Расширенный анализ лейкоцитов 16 популяций

Комбинация моноклональных антител
6 антител

CD36-FITC	Моноциты, Эритроциты, Тромбоциты
CD2-PE	Т-Лимфоциты, НК клетки, Т - бласты
CD294-PE	Эозинофилы, Базофилы, Активированные Т клетки
CD19-ECD	В-Лимфоциты, В-бласты
CD16-PC5	Нейтрофилы, провоспалительные моноциты, цитотоксические Т/НК клетки
CD45-PC7	Все лейкоциты

Определяемые клеточные популяции

- Лимфоцитарная формула
 - **В-лимфоциты**
 - **Нецитотоксические Т-лимфоциты**
 - **Цитотоксические Т/НК-лимфоциты**
- Моноцитарная формула
 - **Циркулирующие покоящиеся CD16-моноциты**
 - **«Провоспалительные» CD16+ моноциты – предшественники макрофагов**

Определяемые клеточные популяции

- Базофилы
- Эозинофилы
- Гранулоцитарная формула
 - **Зрелые нейтрофилы**
 - **CD16- незрелые гранулоциты**
- Подсчет бластных клеток с первичным определением линии: миелоидной, В или Т

Примеры гистограмм

Institution: immunotech

Protocol: CytoDiff_Advanced_009.PRO

Listmode Replay: New Protocol

Analysis Date: 25-Feb-2010, 10:05:27

Settings File: VERIFYING_CytoDiff panel 7th july settings.pro, 07-Jul-2009, 13:2...

Listmode File: 00003711 073.LMD

Run Date: 07-Jul-09, 13:22:31

Sample ID: 00003705

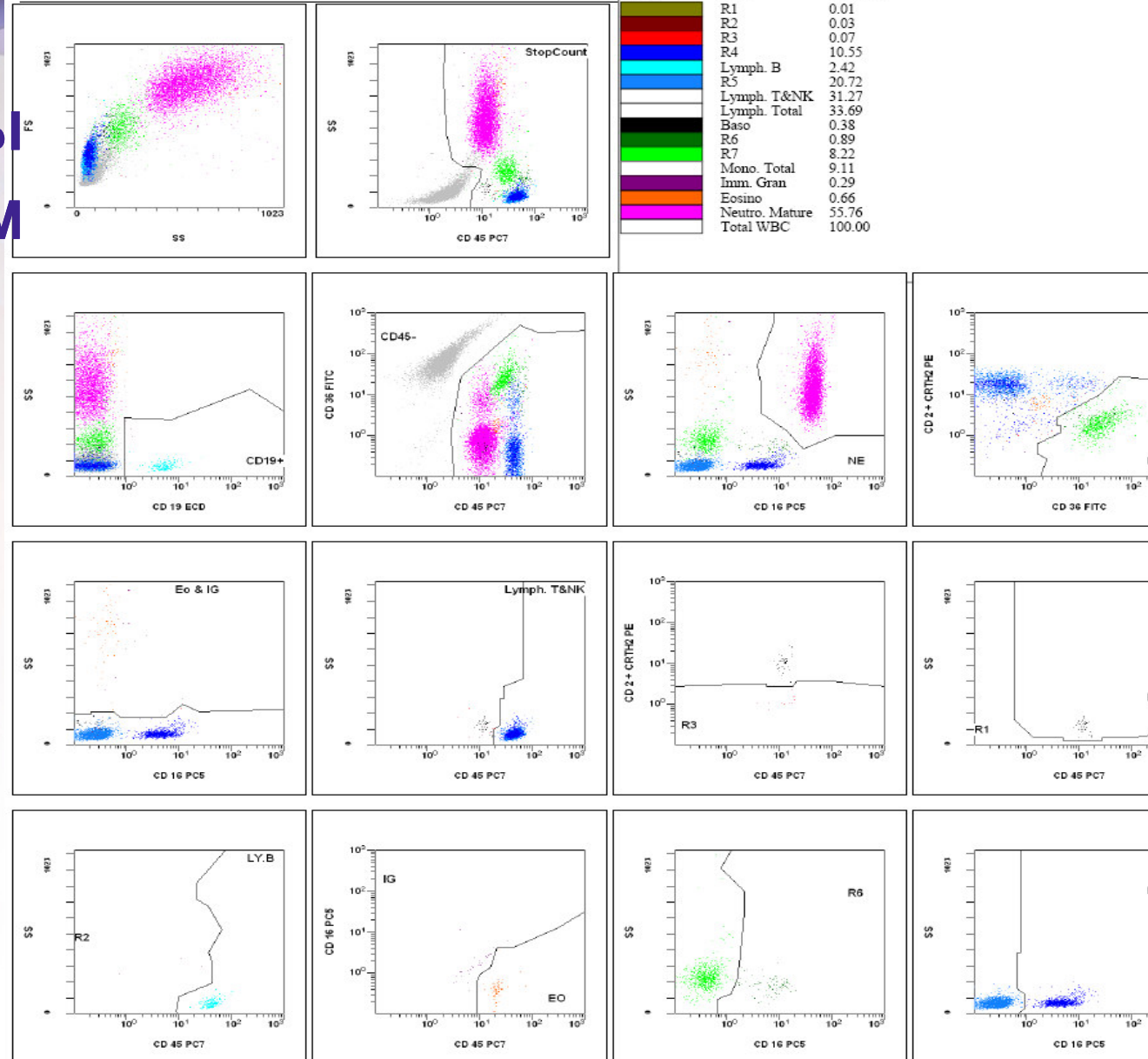
User ID: Gaëlle

Acquisition Time/Events: 80.9s / 32735 (PROTOCOL)

Tube ID: NoRead

(F1)[NOT (CD45-) OR (CD19+)] 00003711 073.LMD : Legend

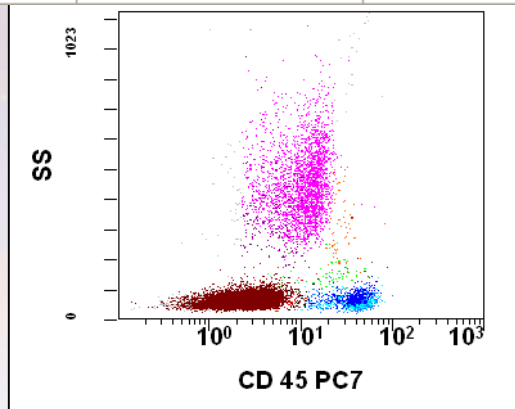
Color	Name	% Gated
	R1	0.01
	R2	0.03
	R3	0.07
	R4	10.55
	Lymph. B	2.42
	R5	20.72
	Lymph. T&NK	31.27
	Lymph. Total	33.69
	Baso	0.38
	R6	0.89
	R7	8.22
	Mono. Total	9.11
	Imm. Gran	0.29
	Eosino	0.66
	Neutro. Mature	55.76
	Total WBC	100.00



ОЛЛ

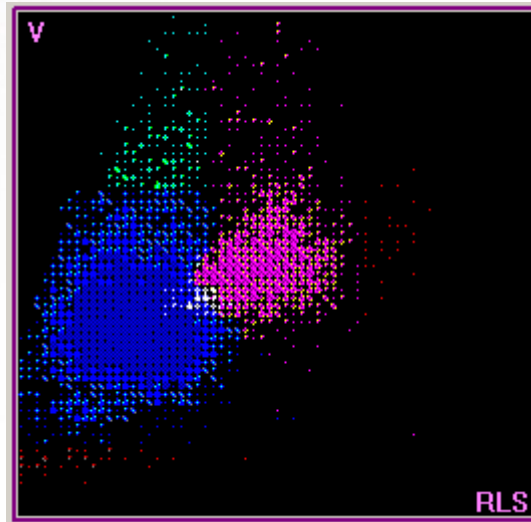
Flow Diff

Color	Name	% Gated
	R1	0.01
	R2-BlastsB	67.22
	R3-BlastsnBnT	1.27
	R4-grT&NK-Ly	2.69
	Lymph. B	1.49
	R5	4.93
	Lymph. T&NK	7.62
	Lymph. Total	9.11
	Baso	0.41
	R6-ProinflMO	0.12
	R7	0.54
	Mono. Total	0.66
	Imm. Gran	1.49
	Eosino	0.56
	Neutro. Mature	19.28
	Total WBC	100.00



VCS Diff

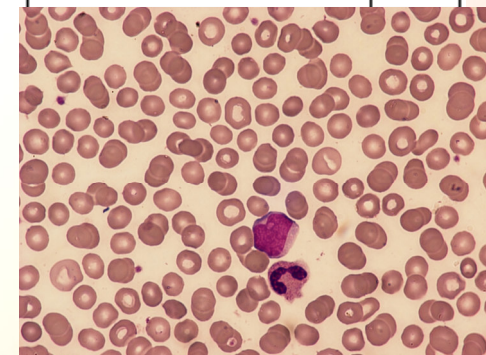
WBC	11.4	H			
NE %	20.9	L	NE #	2.4	
LY %	75.9	H	LY #	8.7	aH
MO %	2.2		MO #	0.3	
EO %	0.3		EO #	0.0	
BA %	0.7		BA #	0.1	
NRBC %	0.0		NRBC #	0.0	



	NE		LY		MO	
	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD
V	136.6	25.77	102.2	22.41	194.0	21.56
C	145.2	9.45	107.6	13.19	115.0	7.42
S	124.2	17.12	56.9	20.42	77.9	10.70

Manual Diff

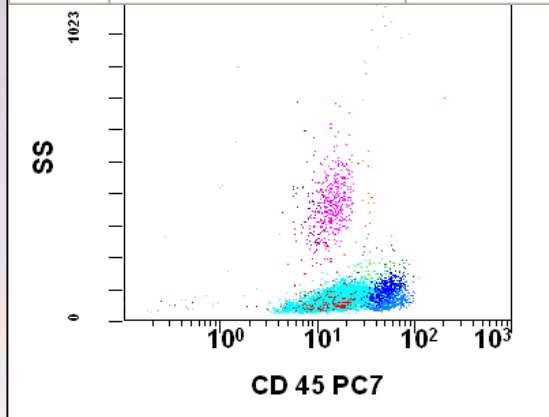
Blasts	67
Promyelocytes	
Myelocytes	
Metamyelocytes	
Bands	1
Segm. Neutrophils	13
Eosinophills	1
Basophills	1
Prolymphocytes	
Lymphocytes	15
Atypical Lymph.	
Promonocytes	
Monocytes	
Plasma cells	2
Eritroblasts	



Flow Diff

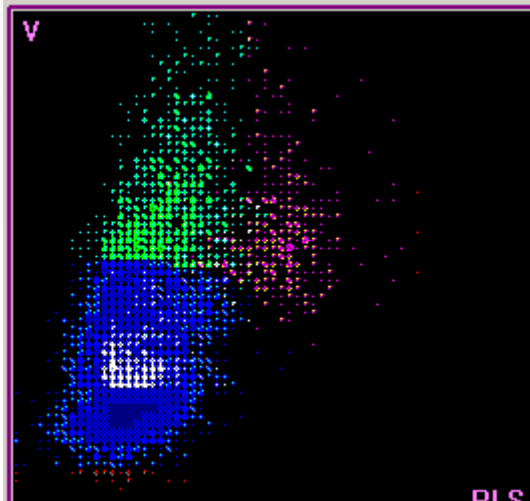
ХЛЛ

Color	Name	% Gated
	R1	0.00
	R2-BlastsB	0.07
	R3-BlastsnBnT	1.79
	R4-grT&NK-Ly	3.68
	Lymph. B	80.58
	R5	7.63
	Lymph. T&NK	11.31
	Lymph. Total	91.89
	Baso	0.12
	R6-ProinflMO	0.35
	R7	0.63
	Mono. Total	0.99
	Imm. Gran	0.78
	Eosino	0.22
	Neutro. Mature	4.13
	Total WBC	100.00



VCS Diff

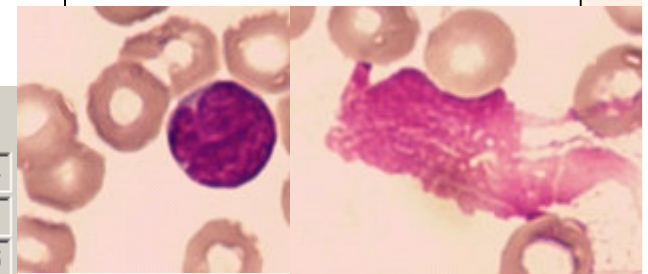
WBC	46.2	H			
NE %	5.8	L	NE #	2.7	
LY %	78.2	H	LY #	36.1	aH
MO %	12.7	H	MO #	5.8	aH
EO %	0.0		EO #	0.0	
BA %	3.3	aH	BA #	1.5	aH
NRBC %	0.0		NRBC #	0.0	



	NE		LY		MO	
	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD
V	155.0	36.59	72.0	24.82	167.3	29.54
C	144.7	7.72	118.8	16.36	121.5	8.38
S	129.5	19.84	59.5	15.99	83.6	16.26

Manual Diff

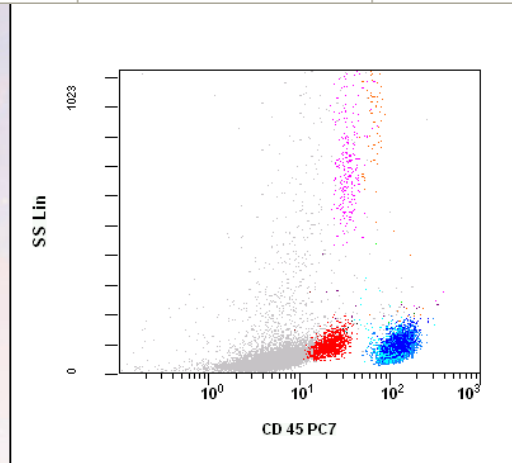
Blasts	
Promyelocytes	
Myelocytes	
Metamyelocytes	
Bands	3
Segm. Neutrophils	7
Eosinophils	
Basophils	
Prolymphocytes	
Lymphocytes	56
Atypical Lymph.	23
Promonocytes	
Monocytes	8
Plasma cells	1
Eritroblasts	



OMJI

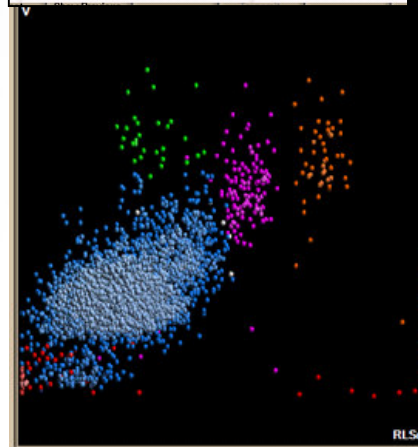
Flow diff

Color	Name	% Gated
Green	R1-BlastsT	0.00
Brown	R2-BlastsB	0.06
Red	R3-Blasts_nBnT	12.11
Blue	R4-gr_T&NK_Ly	6.12
Cyan	Lymph. B	6.35
Light Blue	R5_noncyt_T&NK_Ly	71.04
	Lymph. T&NK	77.16
	Lymph. Total	83.51
Black	Baso	0.10
Dark Green	R6-Proinfl_Mo	0.05
Bright Green	R7-noninfl_Mo	0.08
	Mono. Total	0.13
Purple	Imm. Gran	0.15
Orange	Eosino	1.08
Magenta	Neutro. Mature	2.87
	Total WBC	100.00



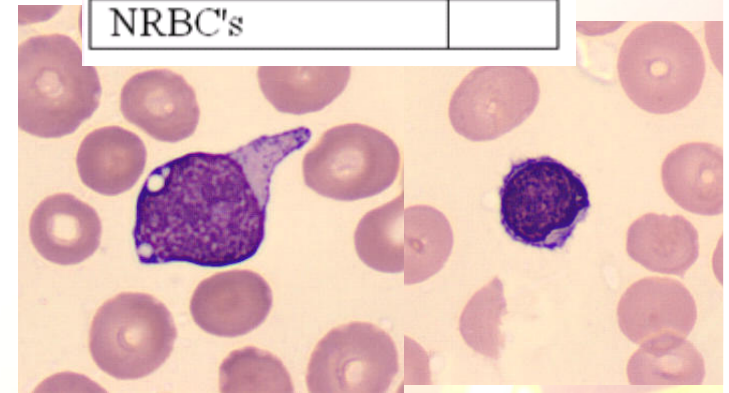
M0 VCS diff

NE	2.8
LY	95.2
MO	0.7
EO	1.2
BA	0.1
NE#	0.0
LY#	1.4
MO#	0.0
EO#	0.0
BA#	0.0
NRBC	0.9
NRBC#	0.01



Manual diff

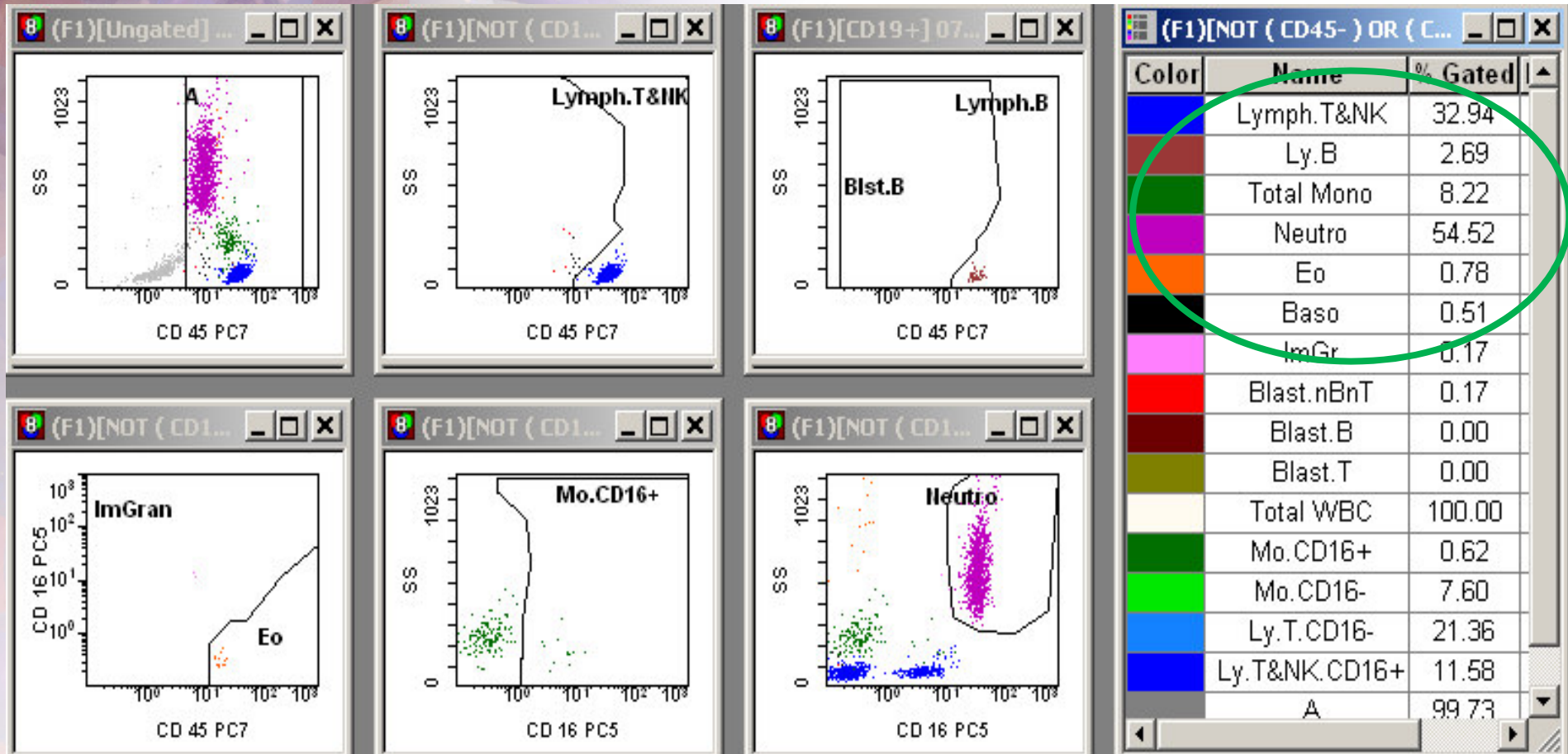
Blasts	3
Promyelocytes	
Myelocytes	
Metamyelocytes	
Bands	
Segm. Neutrophils	2
Eosinophils	2
Basophils	
Prolymphocytes	
Lymphocytes	92
Atypical Lymph.	
Promonocytes	
Monocytes	1
Plasma cells	
NRBC's	



200 образцов периферической крови

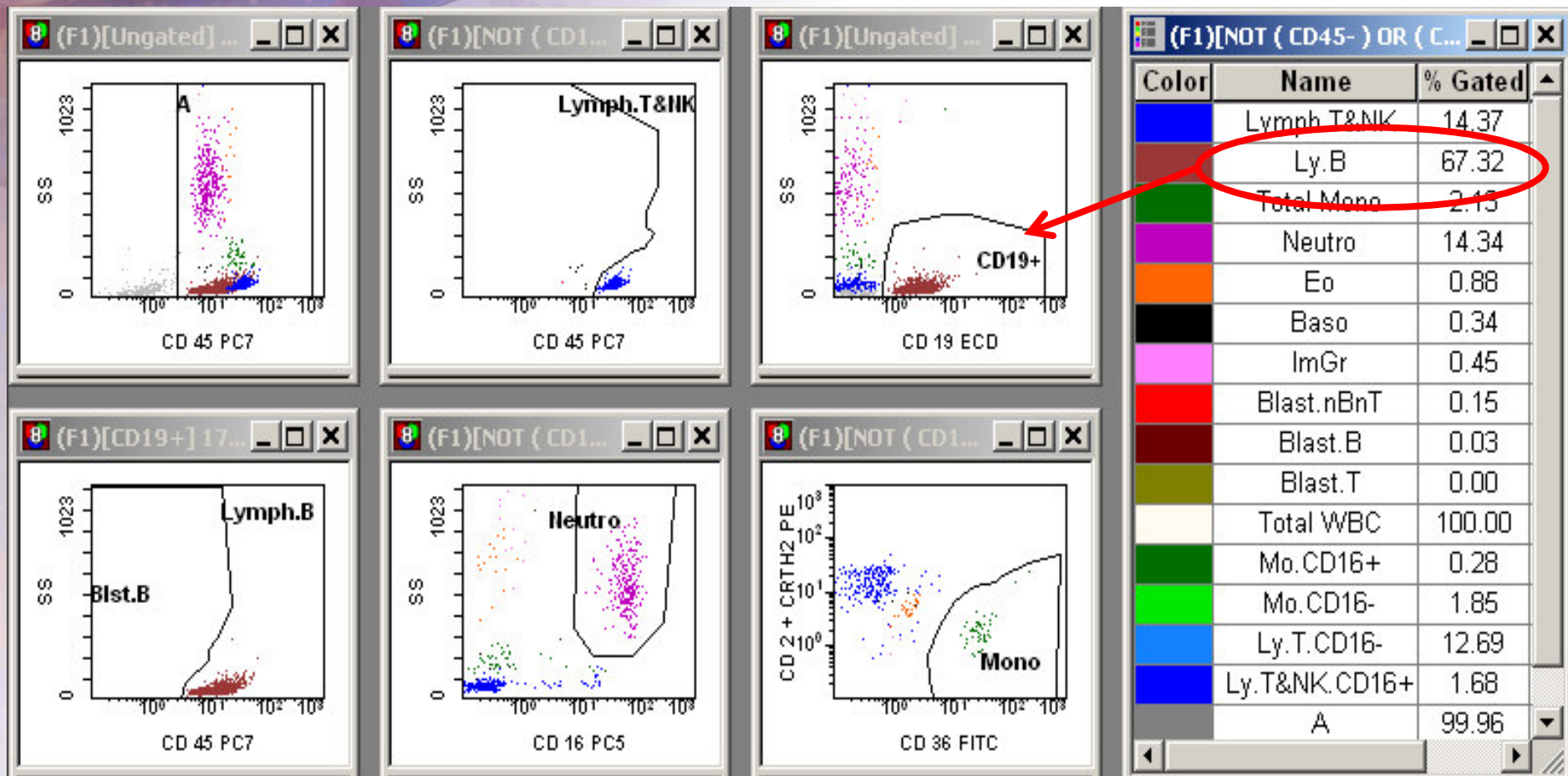
Характеристика	Кол-во
Больница	5
Женщины/ Мужчины	92 / 108
Клинический диагноз неизвестен	47
Острый лейкоз	58
ХЛПЗ	51
ХМЛ	15
Миелома	11
B23	15

Образец ПК, не имеющий «флагов» на гематологическом анализаторе



Четкое разделение всех популяций

ХЛПЗ

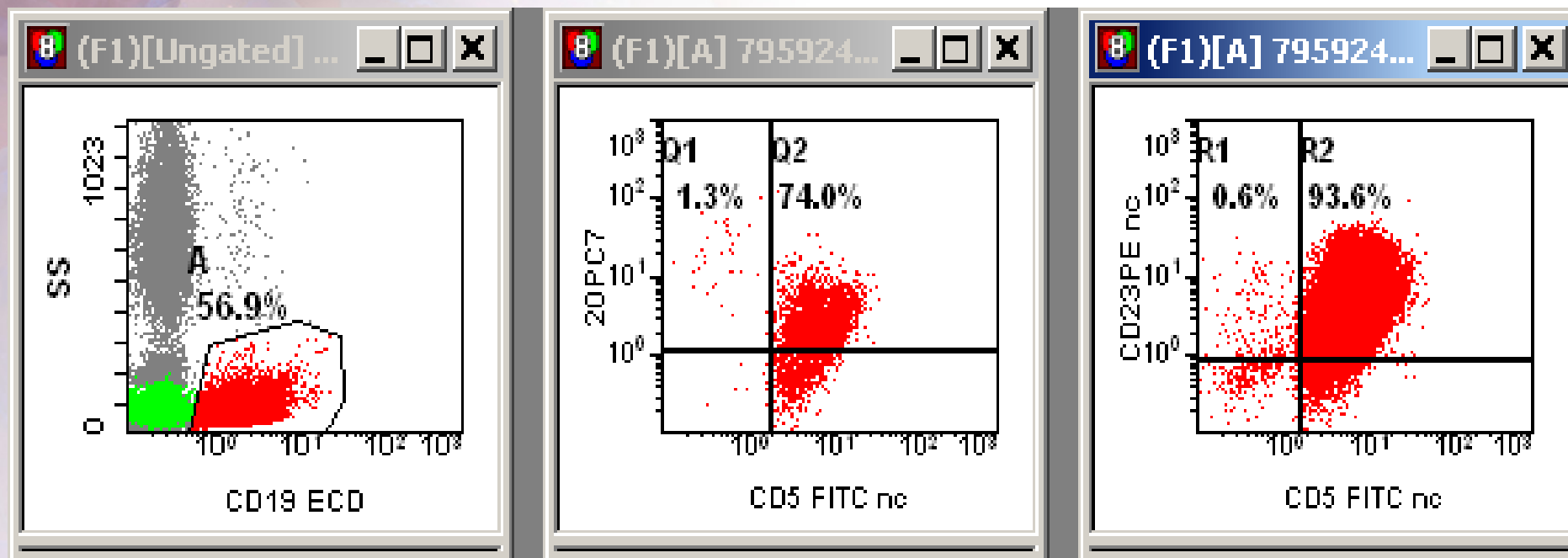


Женщина, 31 г.

Лейкоцитоз $43,9 \times 10^9/\text{л}$

Клональное В-клеточное заболевание ?

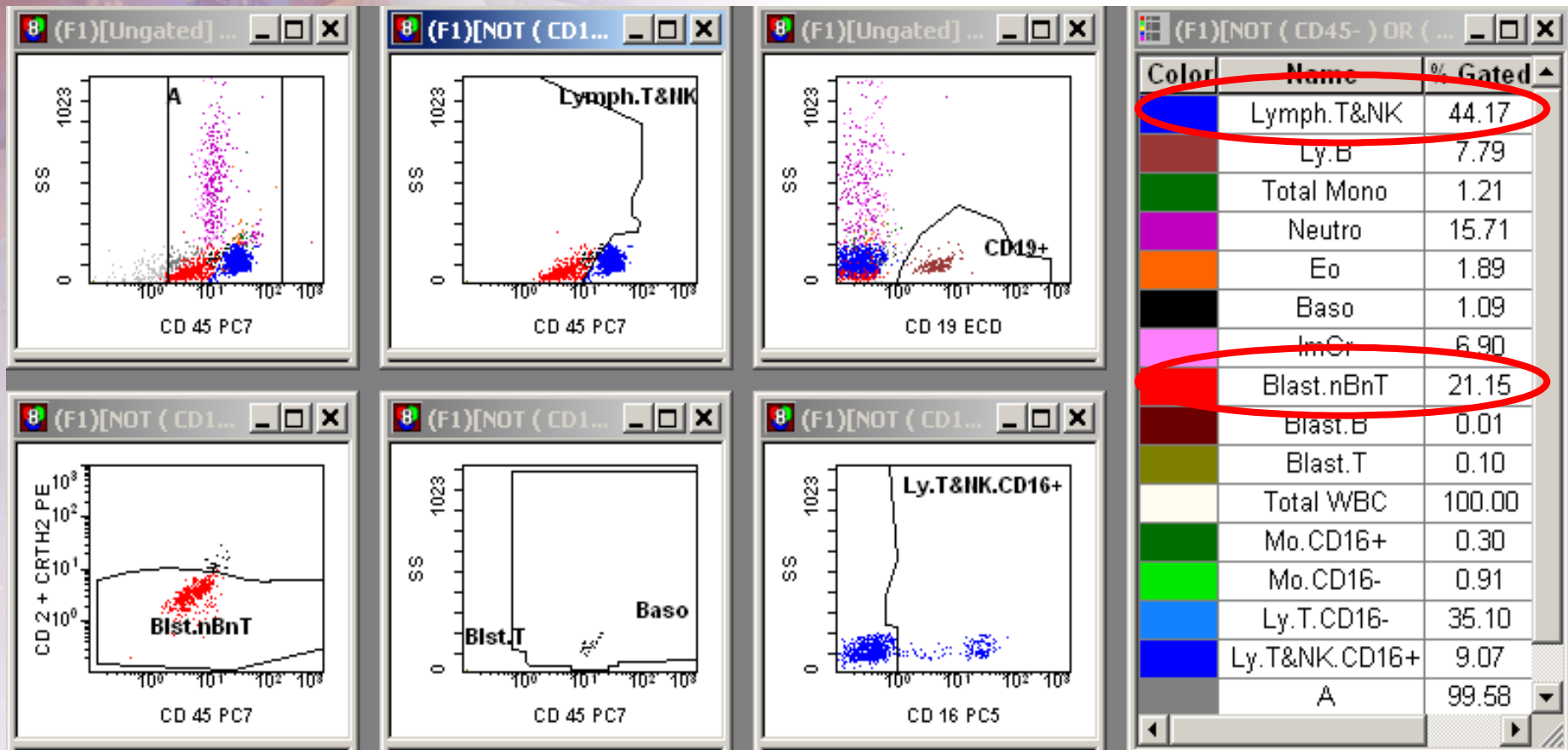
Панель ИФТ для диагностики ХЛПЗ



CD5+CD19+CD20dim+CD23

В-клеточный хронический лимфолейкоз

ХЛПЗ?

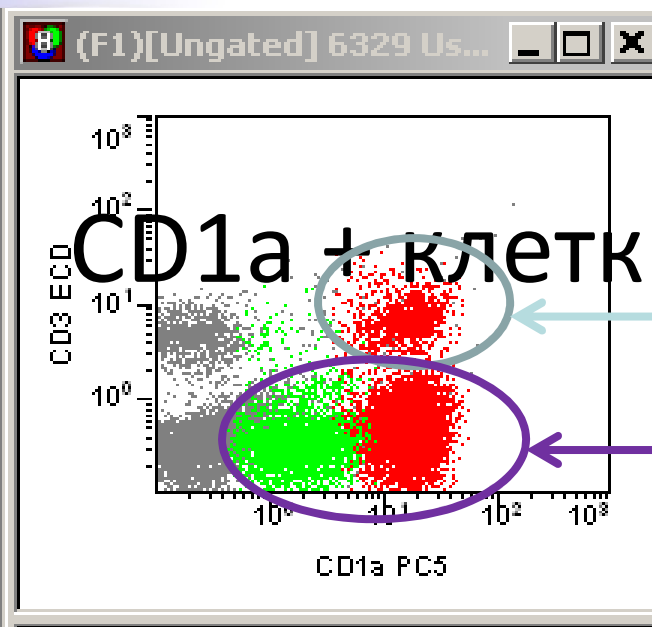
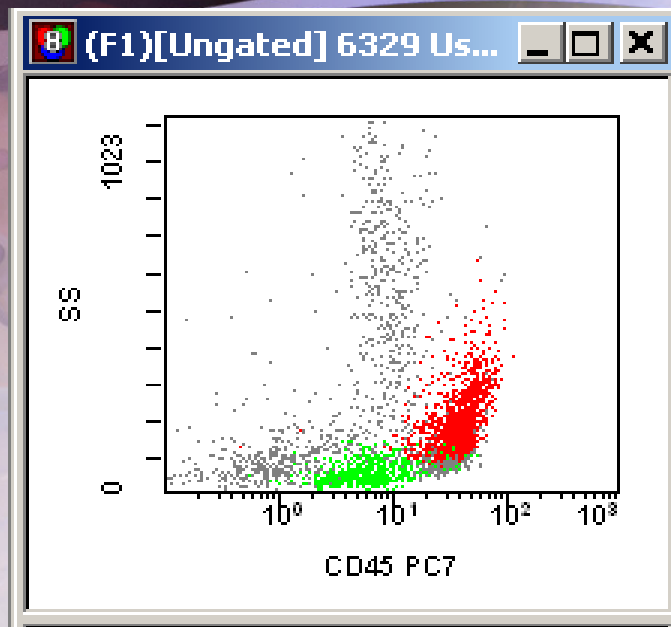


Мужчина, 32 г.

Лейкоцитоз $9,2 \times 10^9/\text{л}$

Миелобласты?

Панель ИФТ для диагностики острого лейкоза



CD1a + клетки

CD3+

CD3 negative
CD1a+CD4+CD8+

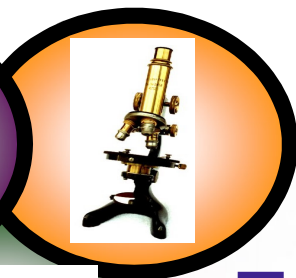
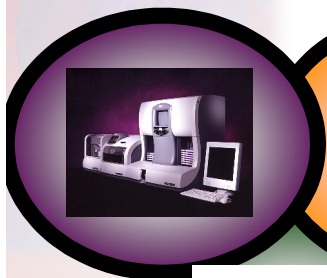
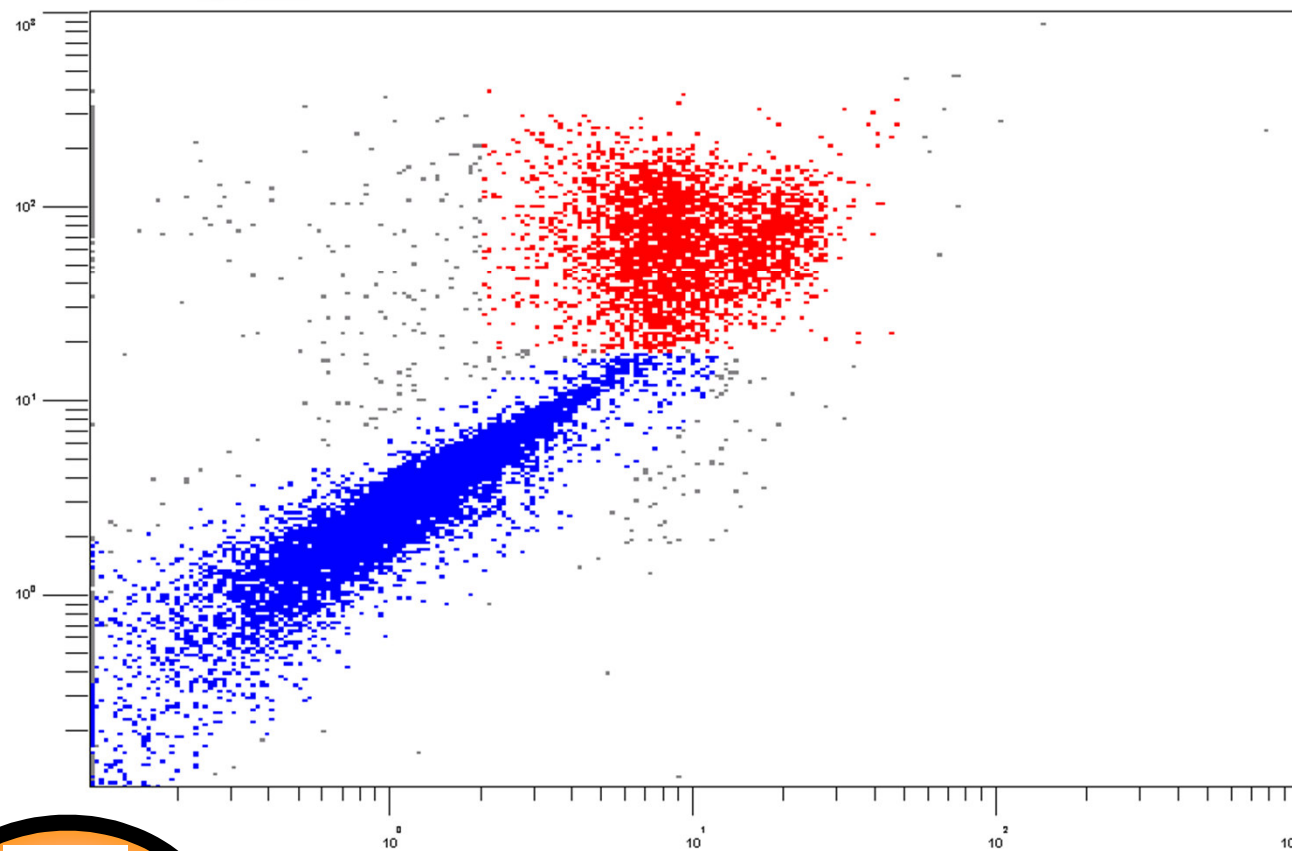
CD5+CD7+
CD8-

Features	Lymphoid cells, %
CD3+CD19-	16,3
CD3+CD4+	16,3
CD3-CD4+	81,0
CD3+CD8+	0,0
CD3-CD8+	71,0
CD5+CD7+	89,2
CD1a+CD3+	13,6
CD1a+CD3-	71,8

✓CD3^{neg}CD1a⁺

CD4⁺CD8⁺

Острый лимфобластный
лейкоз из Т-клеток
предшественников



Благодарю за внимание!