

# **Vérképvizsgálat a laboratóriumban: hematológiai automaták működési elve**

Kristóf Katalin

Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet,  
Mikrobiológiai Laboratórium

## Mikor, miért mérünk?

Teljes vérkép (kvalitatív és kvantitatív)indikációi:

- Általános kivizsgálás
- Gyulladásos, fertőzőes betegségek
- Hematológiai betegségek
- Vérvesztés (akut és krónikus)
- Folyadékterek változásai (só- vízháztartás változásainak követése)
- Hemosztázis celluláris zavarai
- Endokrin és tumoros betegségek
- Vérzékenység
- Autoimmun betegségek, allergiás betegségek

Egyéb vizsgálatok, melyek egyes hematológiai kórképek diagnosztikájában nélkülözhetetlenek:

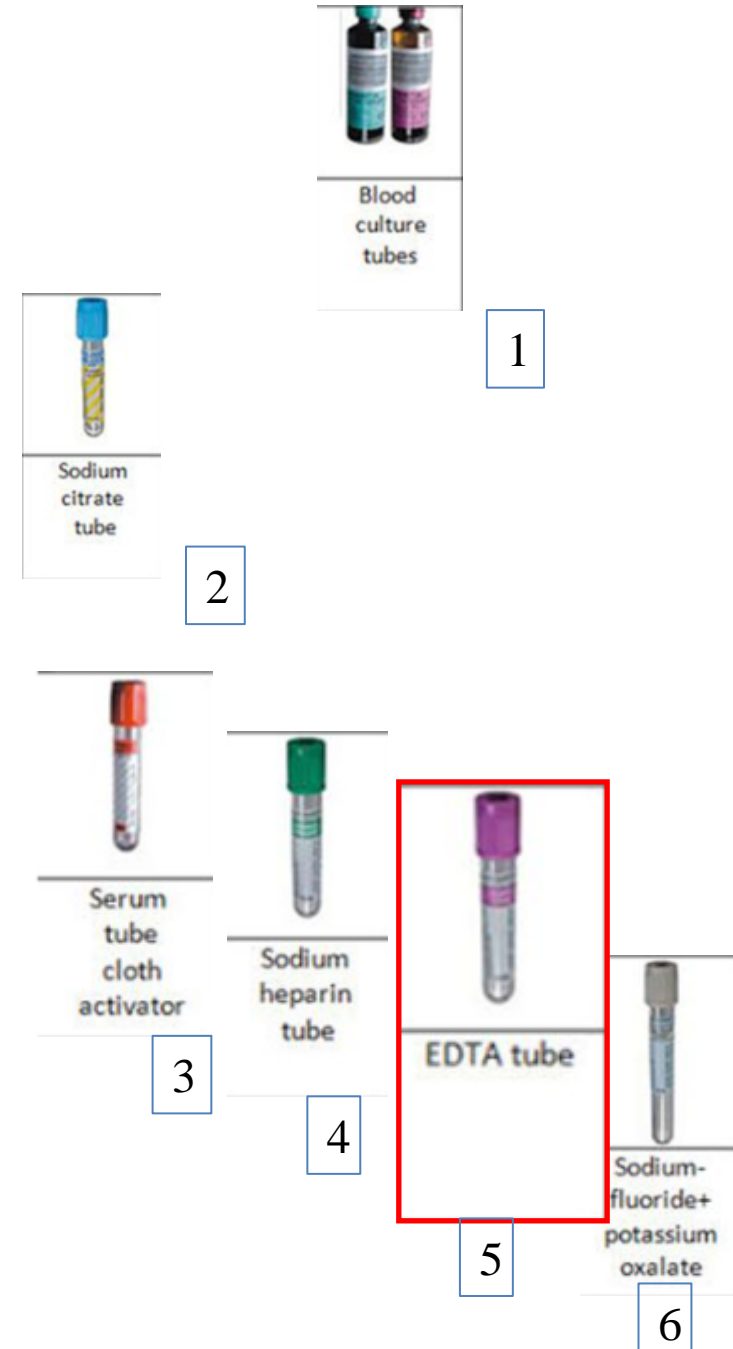
- We
- CRP
- PCT
- LDH
- Haptoglobin
- Folsav
- B12
- Ca, P, ALP
- Fe, TVK, sTfR  
transzferrin, ferritin
- Elektroforézis
- Immunfixáció
- Immunglobulinok

# Preanalitika

## VÉRVÉTELI CSŐ: „lila kupakos” műanyag cső

EDTA-kálium alvadásgátlót tartalmaz  
VÉRVÉTEL után csőfordítás 8-10-szer,  
óvatosan, azonnal.

- 8 órán belül lemérendő
- 24 órán belül mérni kell, ha  $+4^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk
- Kenet készítés 4 órán belül!



## Szobahőmérsékleten való tároláskor 8 óra után bekövetkező változások:

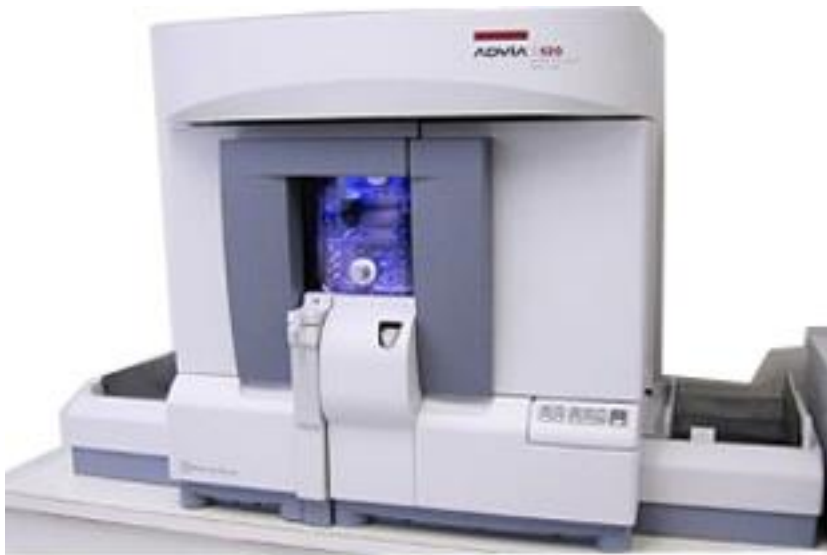
- vörösvérsejtek elvesztik bikonkáv alakjukat
- MCV ↑, Ht↑
- fehérvérsejt szám↓
- abszolút limfocita↓
- retikulocita szám már 6 óra után↓
- magas vörösvérsejtek 24-36 óra után eltűnnek
- MPV↑, IRF (éretlen retikulocita frakció)↓

# Mit látunk a leleten? - Kvantitatív vérkép

- **WBC** 4-10 G/l
- **RBC** 4-5,5 T/l
- **HGB** 130-160 g/l
- **HCT** 0,4-0,52 l/l
- **MCV** 80-95 fl
- **MCH** 28-32 pg
- **MCHC** 330-370 g/l
- **(CHCM)** 330-370 g/l
- **RDW** 11,5-14,5%
- **HDW** 2,2-3,2 g/dL
- **PLT** 130-400 G/l
- **MPV** 7-11 fl
- **PDW** 25-65%
- **PCT** 0,12-0,36%
- **FRAGM**
- **%MICRO**
- **%MACRO**
- **%HYPO**
- **%HYPER**

Alkalmazott automatától függ!

# Hematológiai analizátorok



Advia 2120 Siemens

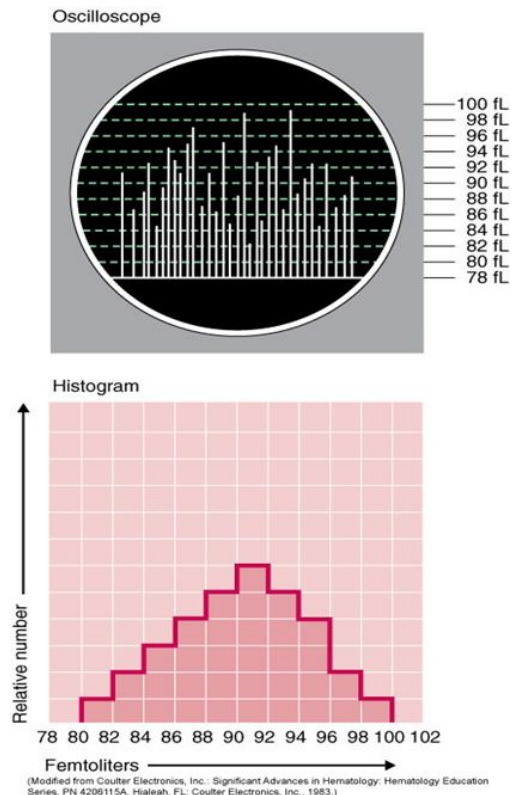
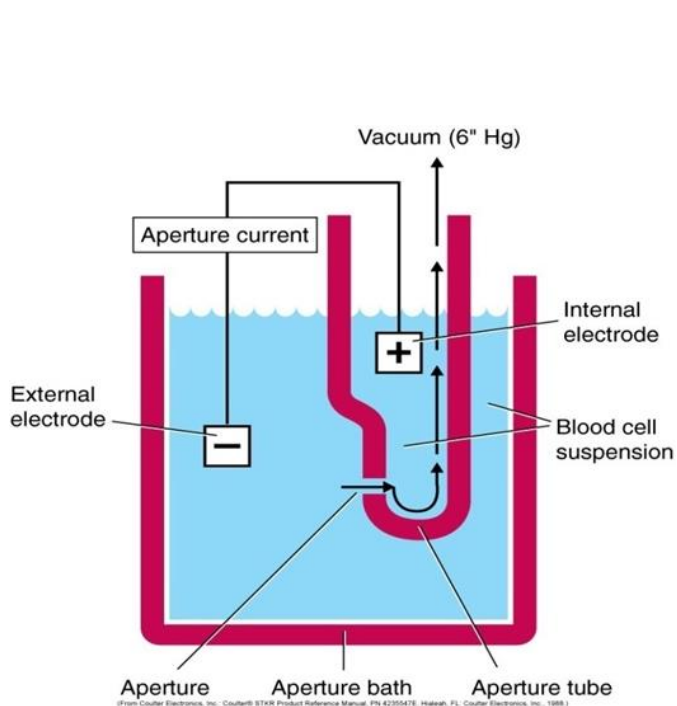


Sysmex  
XE

# Hematológiai automaták mérési elvei

Az elektromos vezetőképesség mérésén alapuló sejtszámlálók  
(Impedancia elvű mérés)

- a sejtek vezetőképessége kisebb => elektromos ellenállás hirtelen megnő, amikor a mérőcellán részecske halad át => „részecskeszám”
- az elektromos impulzus a sejtnagyságtól/térfogattól függ => sejtek differenciálása



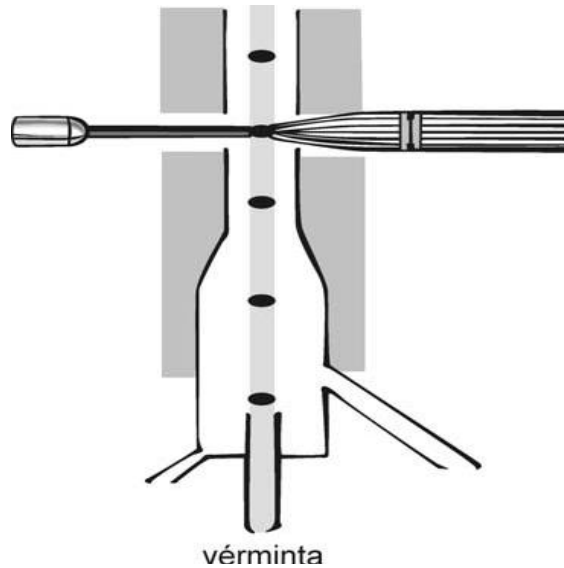
„Korai” automaták:

„3 part – diff”

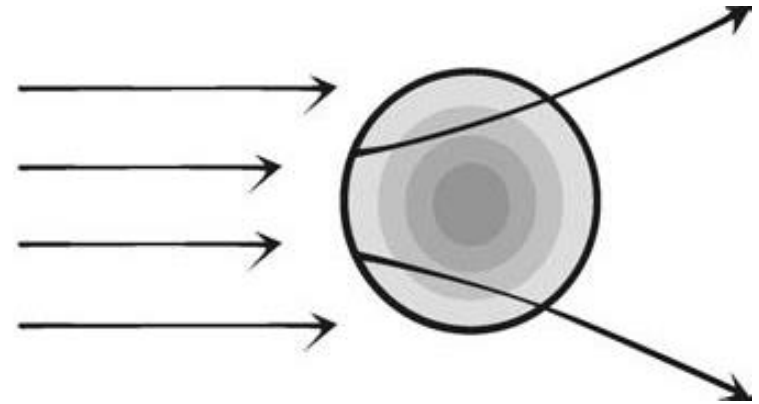
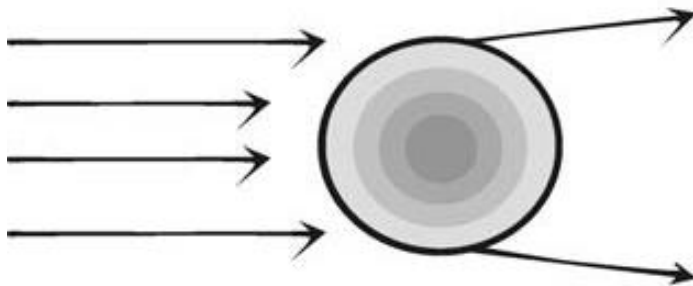
- Kis sejtek ~ limfocita
- Közepes ~ mo, eo, bas
- Nagy ~ neutrofilek



# Optikai, fényszórás (vagy szórt lézer) elvű mérés



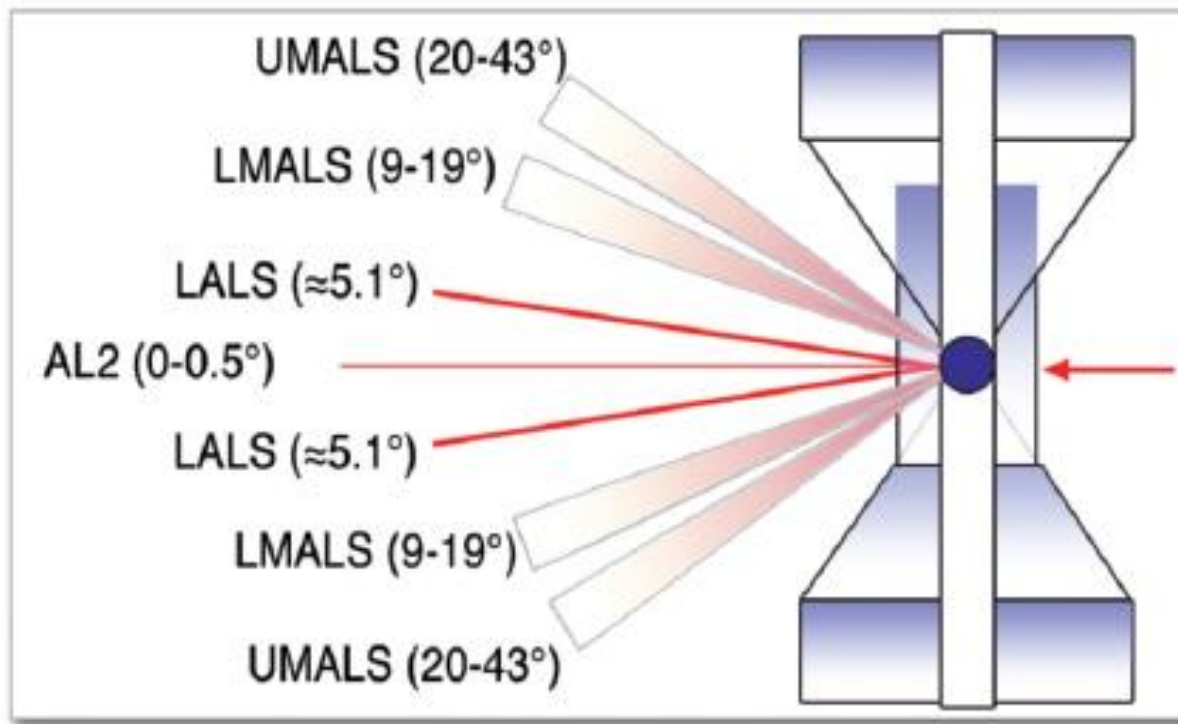
Hidrodinamikailag fókuszált  
sejtáramlás,  
megvilágító lézer fény és  
detektor



**Kis szög (2-4°) alatti fényszórás a sejt mérettel,  
a nagyobb szög alatti (10-15°) fényszórás a sejt tartalommal** (pl. hemoglobin koncentráció,  
vagy sejtmag sűrűség) arányos

(A kis és a nagy szög alatt szórt fény intenzitásának komplex matematikai összefüggését  
a Mie teória írja le)

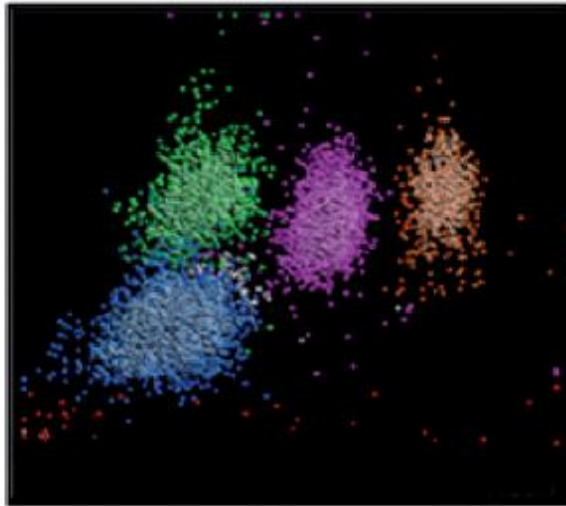
## Optikai, fényszórás (vagy szórt lézer) elvű mérés 5 lézer detektorral



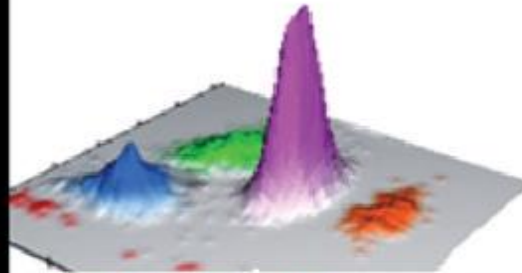
**Beckman Coulter  
DXH-800**

- Volume (térfogat)
  - Conductivity (vezetőképesség)
  - Axial light loss (AL2) → **fényáteresztő képesség (transparency)**
  - Low angle light scatter (LALS) → **sejt komplexitás**
  - Median angle light scatter (MALS)
  - Lower median angle light scatter (LMALS)
  - Upper median angle light scatter (UMALS)
- sejt granularitás,  
sejtmembrán felszíne**

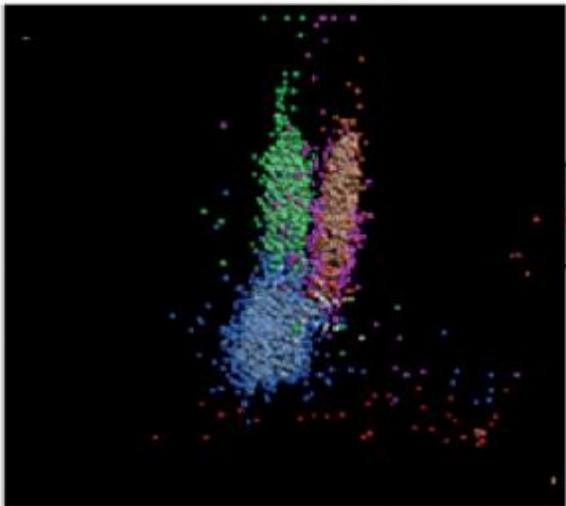
# Fehérvérsejt differenciálás festés nélkül



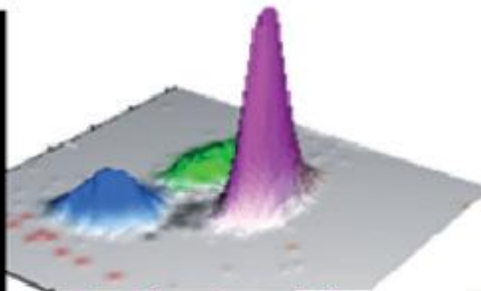
**Diff 1: Volume vs RMALS**



- Neutrophil
- Lymphocyte
- Monocyte
- Eosinophil
- Basophils
- Non-White Cells



**Diff 2: Volume vs OP**



- Neutrophil
- Lymphocyte
- Monocyte
- Eosinophil
- Basophils
- Non-White Cells

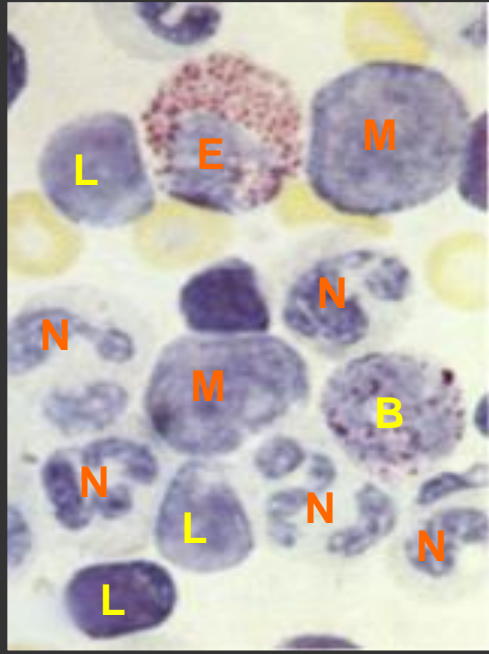
A lézersugár előtt egyesével elhaladó sejtek fényszórásának és depolarizációjának mérése a különböző irányban elhelyezett optikai detektorokkal=>

## „Felhő-diagramok”

Kétdimenziós pontfelhők  
Minden detektált sejt egy pont

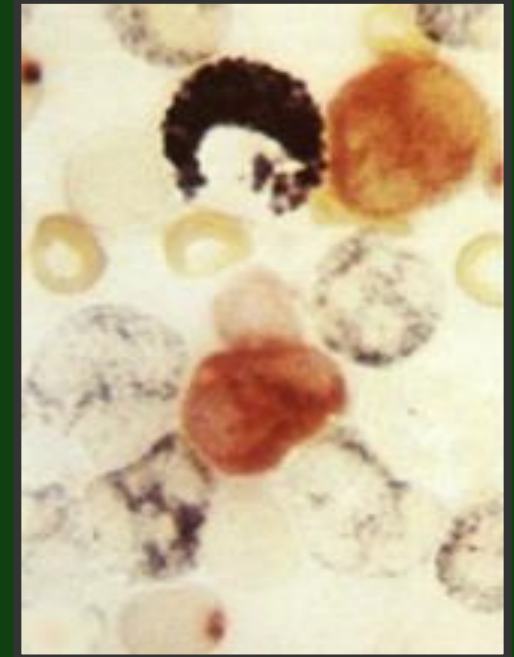
# Fehérvérsejtek további tipizálása

## 1.a Peroxidáz pozitív sejtek



Wright festés

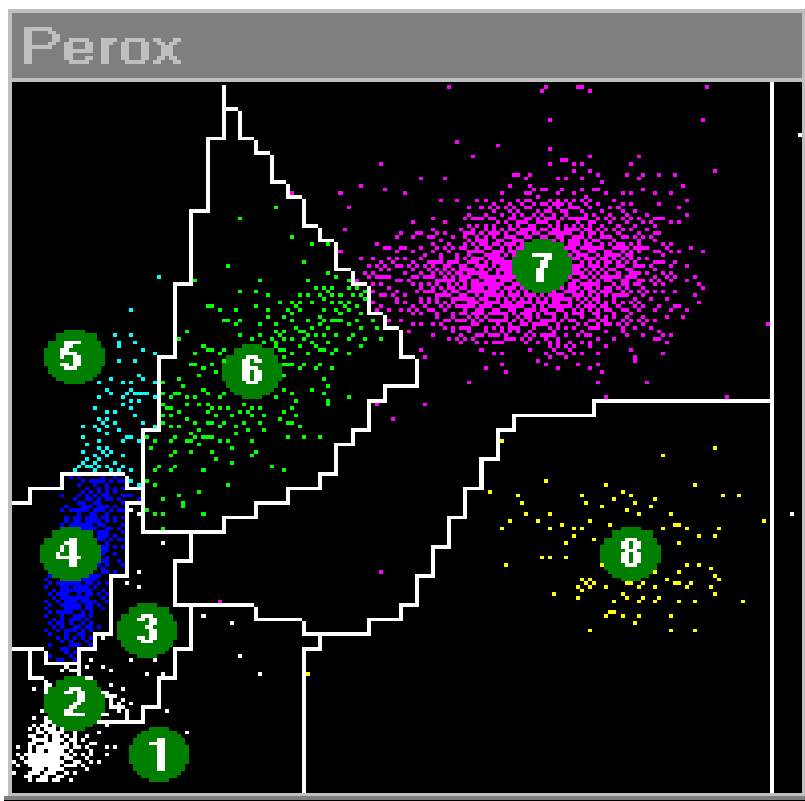
**M = Monocyta**  
**N = Neutrophil**  
**E = Eosinophil**  
**L = Lymphocyta**  
**B = Basophil**



Peroxidáz festés

**Peroxidáz csatorna:** vvt. lizálása után 65-70°C-on pár másodperces mieloperoxidáz reakció  
Optikai érzékelők: mieloperoxidáz aktivitást méri, másik a fényszóródást (sejtméret)

# Felhődiagram peroxidáz festéssel



- 1 Zaj
- 2 Magvas vörösvérsejt
- 3 Összetapadt trombociták
- 4 Limfociták és bazofilek
- 5 Large Unstained Cells (LUC)
- 6 Monociták
- 7 Neutrofilek
- 8 Eosinofilek

## Morfológiai flag-ek:

- ATYP (Atípusos limfociták)
- IG (Éretlen granulociták)
- MPO (Myeloperoxidase hiány)
- NRBC (Magvas vörösvérsejtek)
- PLT-CLM (Összetapadt trombociták)

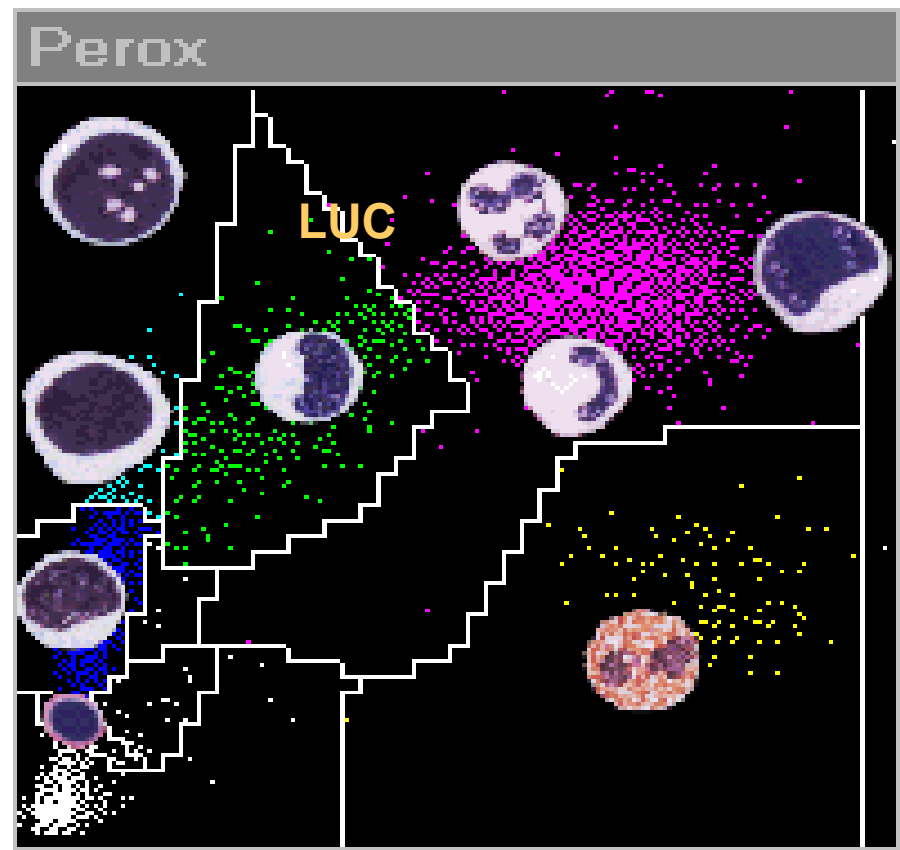
# LUC (Large Unstained Cells)

## Nagy nem festődő sejtek:

- Aktivált limfociták
- Plazmasejtek
- Hajas sejtek
- Gyermekkori nagy limfociták
- Mieloperoxidáz negatív blasztok
- Mieloperoxidáz negatív neutrofil granulociták

## Morfológiai flag-ek:

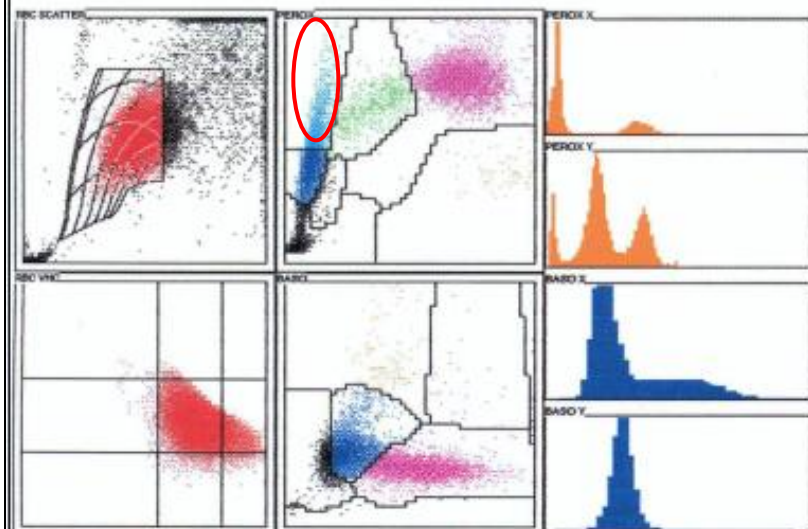
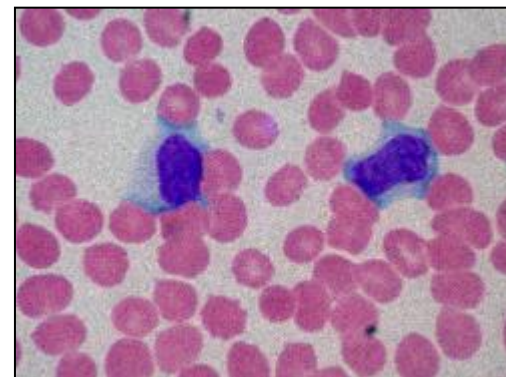
- **ATYP** (Atípusos limfociták)
- **BLASTS** (Blasztok)
- **MPO** (Mieloperoxidáz hiány)

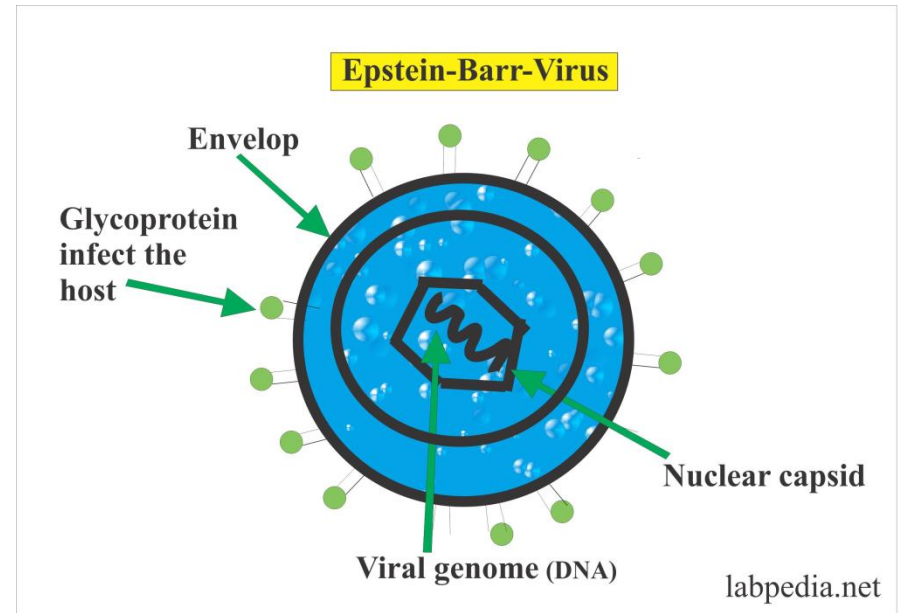
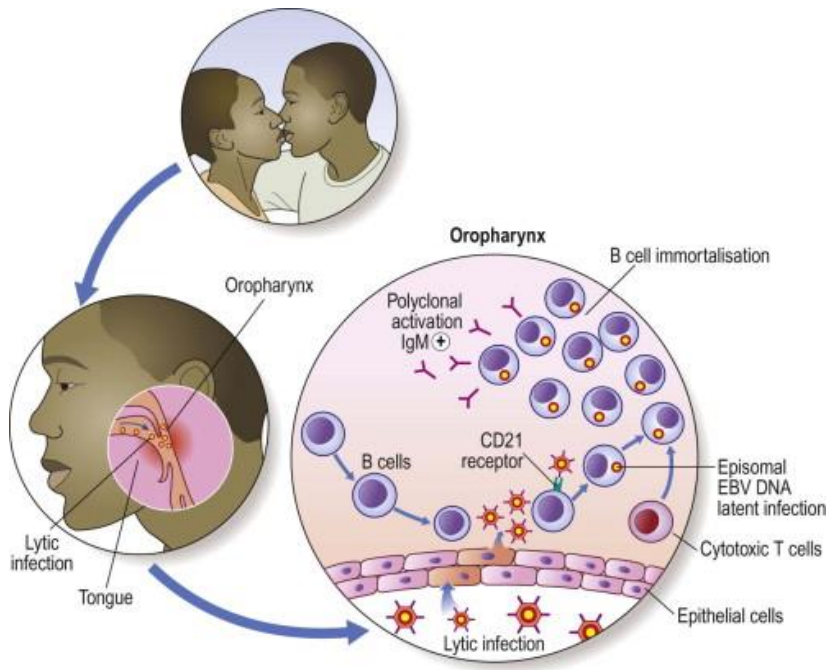




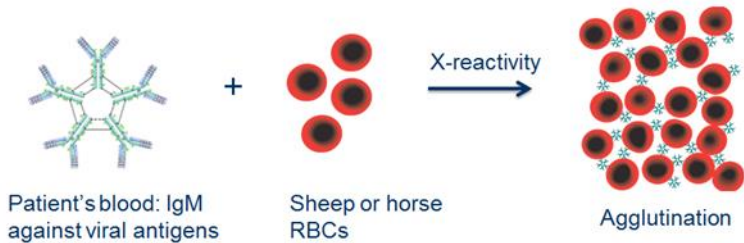
## 20 éves ffi, fül-orr-gége ambulancián; láz, nyelési nehézség

TEST	RESULT	ABN	NORMALS	UNITS
WBC		12.04	( 4 - 10 )	x10.e3 /uL
%NEUT		29.5	( 40 - 74 )	%
%LYMPH		50.8	( 19 - 48 )	%
%MONO	5.5		( 3.4 - 9 )	%
%EOS	0.6		( 0 - 7 )	%
%BASO	1.2		( 0 - 1.5 )	%
%LUC		13.4	( 0 - 5 )	%
RBC	4.69		( 4 - 5.5 )	x10.e6 /uL
HGB	138		( 130 - 160 )	g/dL
HCT	0.402		( 0.4 - 0.52 )	%
MCV	85.5		( 80 - 94 )	fL
MCH	29.5		( 27 - 31 )	pg
MCHC	345		( 330 - 370 )	g/dL
RDW	12.9		( 11.5 - 14.5 )	%
PLT	201		( 130 - 400 )	x10.e3 /uL
MPV	8.6		( 7.2 - 11.1 )	fL

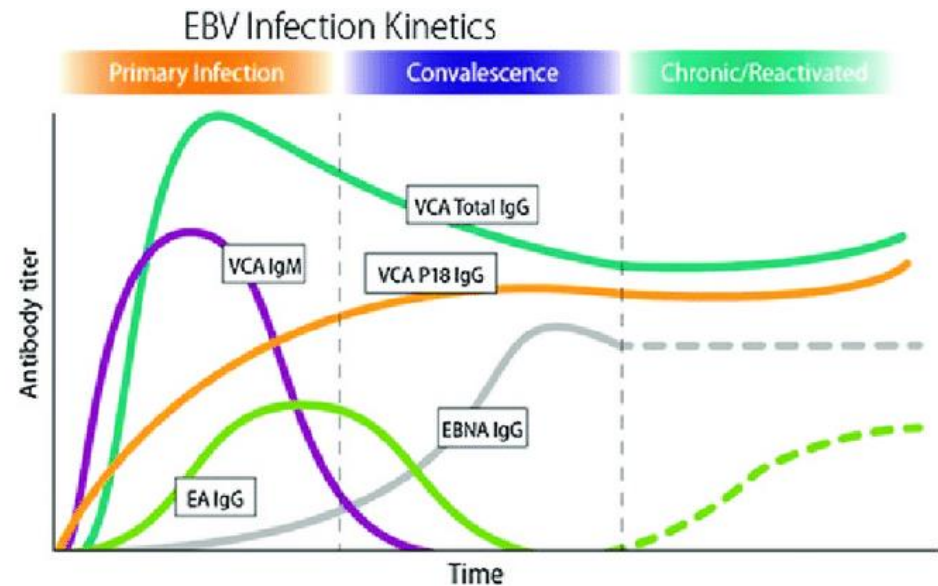




## Heterophile Antibody (Monospot)



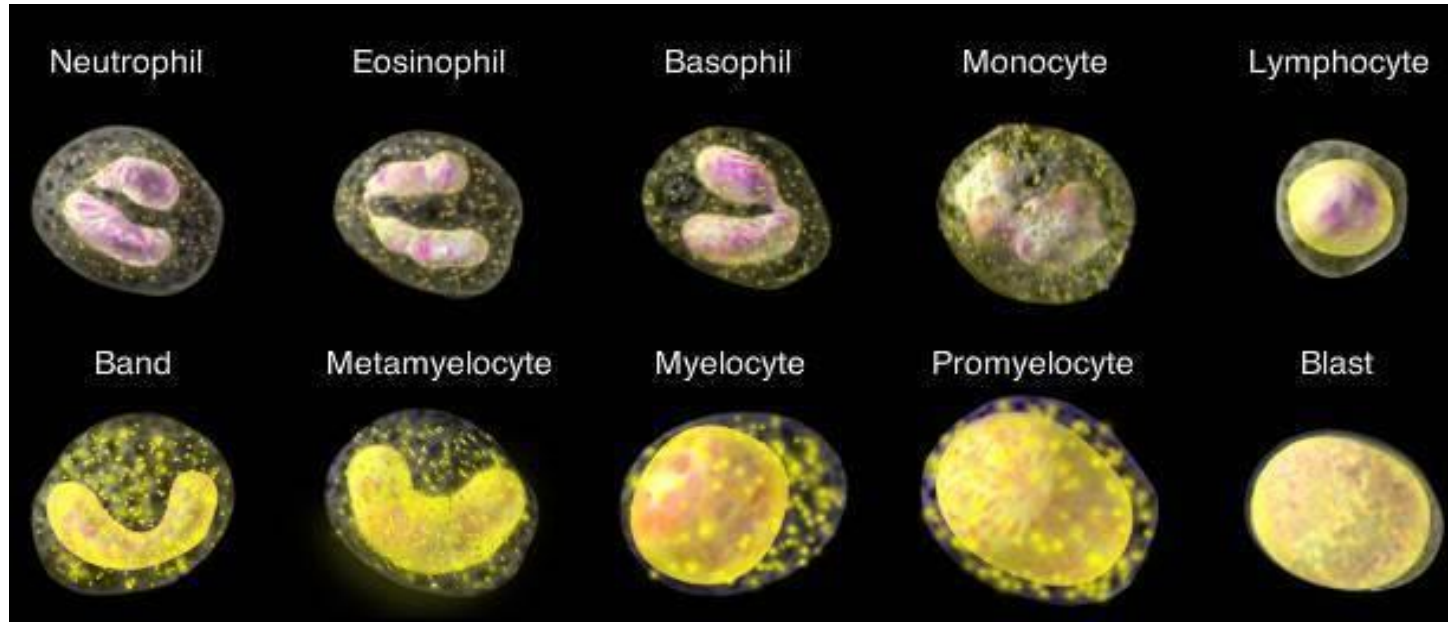
- Sensitivity: 90-95% after 1<sup>st</sup> week, but only 75% in the 1<sup>st</sup> week
- Specificity: 94%. False (+): infections (CMV, Toxo, acute HIV), malignancy, autoimmune (SLE)
- \*No longer recommended by the CDC given false (+) and (-)\*





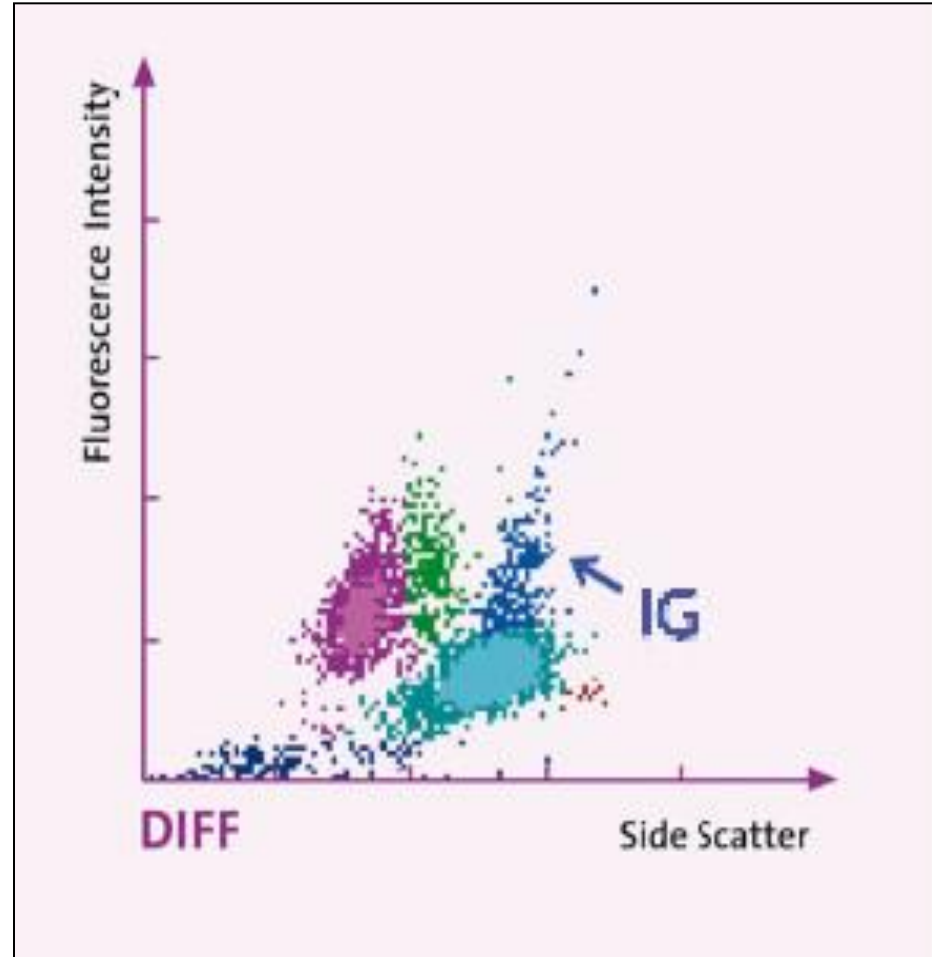
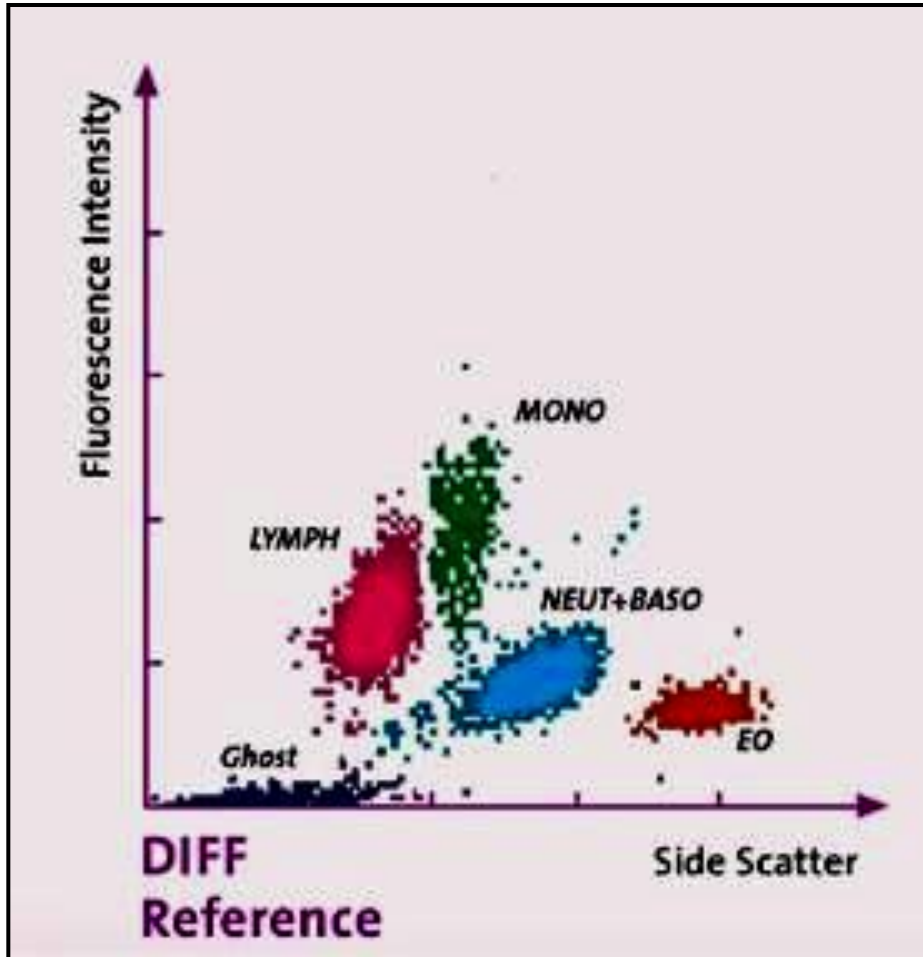
# Fehérvérsejtek további tipizálása

## 1.b Fluoreszcens festés

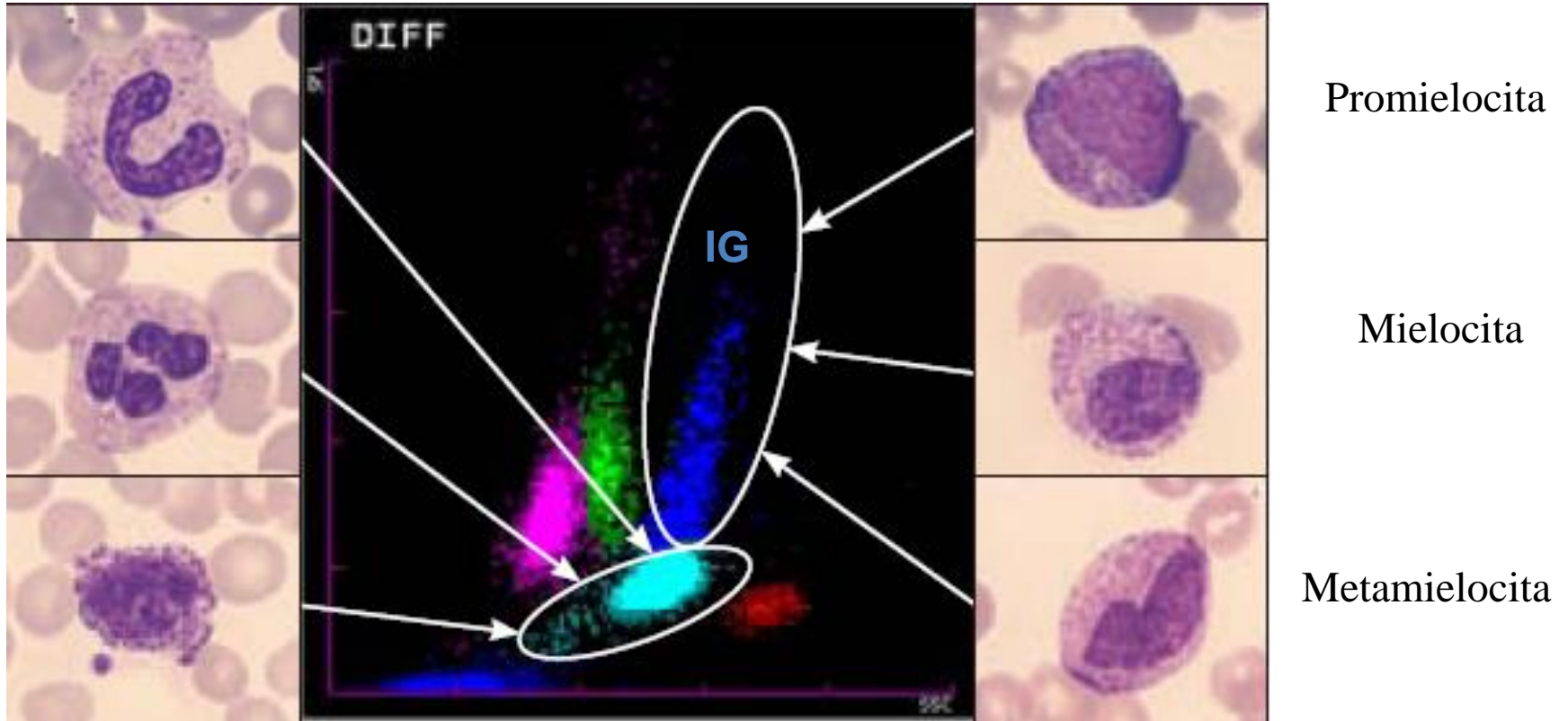


A sejtek emelkedett nukleinsav (DNS vagy RNS) tartalmával arányos a fluoreszcens jel nagysága

# Felhődiagram fluoreszcens festéssel Sysmex XE-2000 automatán



# IG (Immature Granulocytes)



# IG (Immature Granulocytes)

## *Emelkedhet:*

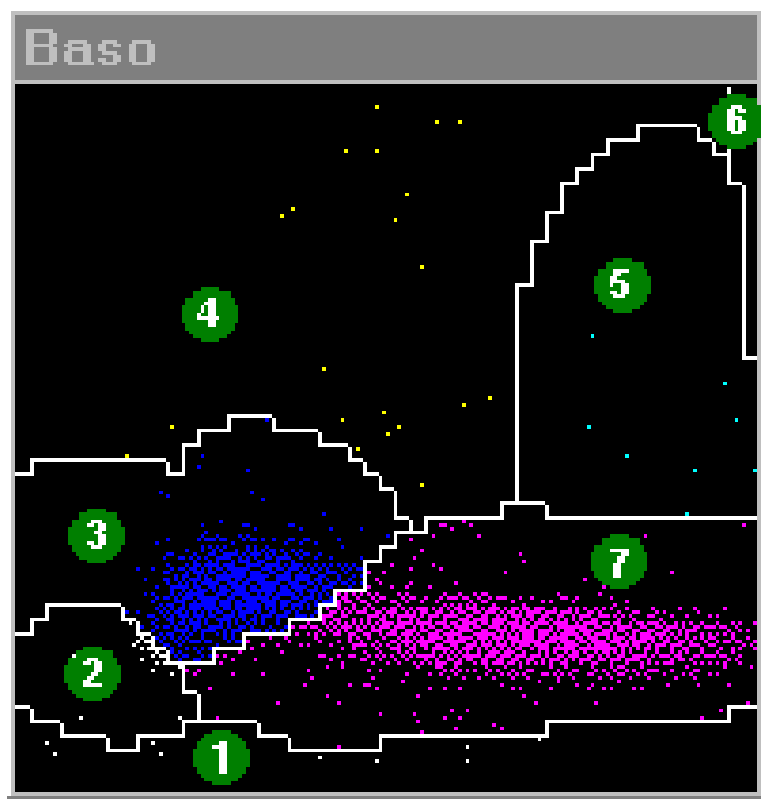
- Bakteriális infekció
- Akut gyulladás
- Tumor (csontvelő metastasis)
- Szövet nekrozis
- Akut transzplantátum rejekció
- Sebészeti, ortopédiai trauma
- Myeloproliferatív betegség
- Szteroid
- Terhesség (harmadik trimeszter)

## *Nagyobb jelentőségű az emelkedés (IGs>2%):*

- idősek, újszülöttek, koraszülöttek akut infekció
- mieloszupresszált betegek akut infekció
- neutropeniával járó szepszis

# Fehérvérsejtek további tipizálása

## 2. Felhődiagram a bazofil csatornán



1. Zaj
2. **Blasztok sejtmagja**
3. **Monociták és limfociták sejtmagja**
4. **Bazofil sejtek**
5. Bazofil gyanús sejtek
6. Szaturáció
7. **Neutrofil** és eosinofil sejtmagok

Morfológiai flag-ek:

BLASTS (Blasztok)

LS (Nem szegmentált granulociták)

Speciális savas reagens hatására a bazofil sejtek stabilizálódnak

# Lehetőségek és korlátok

- A készülék által használt **festésből adódó különbségek:**
  - peroxidáz festésnél LUCs (large unstained cells)
  - fluorescens festésnél: IGs( Immature Granulocytes)
  - HPCs (Hematopoetic progenitor cells) és NRBC (Nucleated RBCs)
- **Új paraméterek klinikai használata:**
  - IRF (immature reticulocyt fraction)
  - MCVr (mean reticulocyt volume)
  - CHr ( mean reticulocyte hemoglobin content)
  - FRBC (fragmented RBC)
  - IPF (immature platelet fraction)

# Lehetőségek és korlátok

- A hematológiai automatákból **teljesen megbízható értékeket** kapunk:
  - fehérvérsejtszám, vörösvérsejtszám, hemoglobin koncentráció, MCV
- **Nagyobb odafigyelést kíván:**
  - a kvalitatív eloszlás, a reticulocita és a thrombocita szám (főként alacsony tartományban)
- **Standardizáció hiánya miatt készülékfüggő:**
  - RDW (RBC distribution width)
  - MPV ( mean platelet volume)
  - PDW (platelet distribution width)

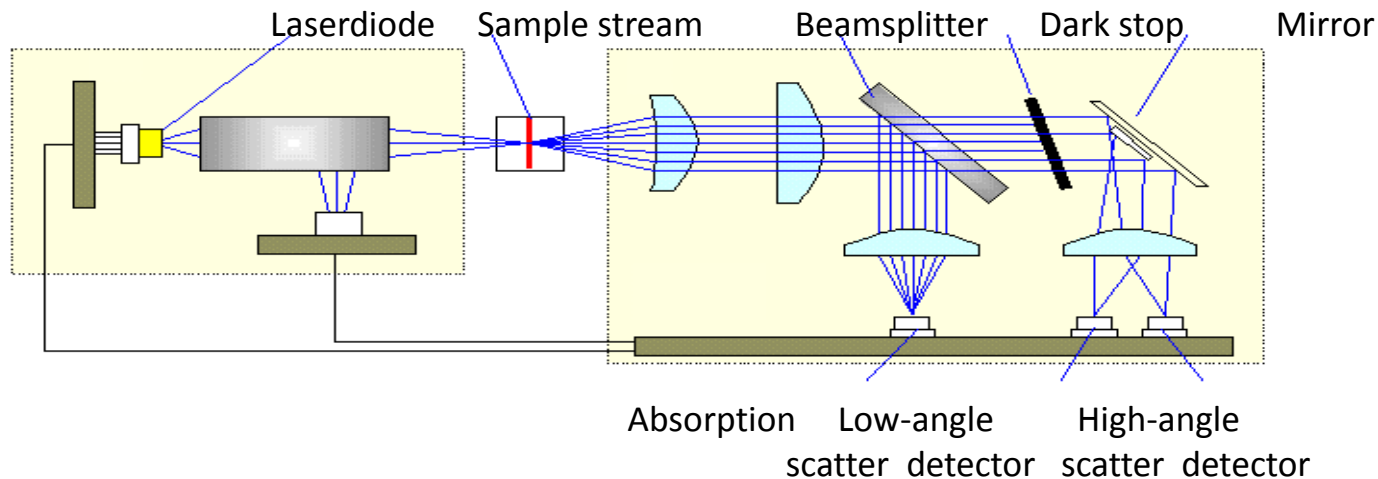
# A vörösvérsejt mérés



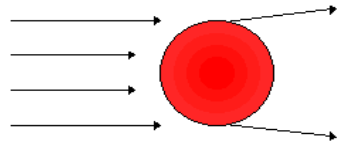
Izovolumetriás gömbbé alakítás



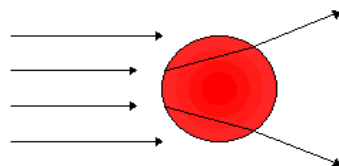
# A vörösvérsejtek optikai detektálása



Alacsony szögű fényszórás  $2^\circ - 3^\circ$  (Térfogat)



Nagy szögű fényszórás  $5^\circ - 15^\circ$  (HGB koncentráció)



## Hemoglobinkoncentráció mérése:

Vvt-k lízise

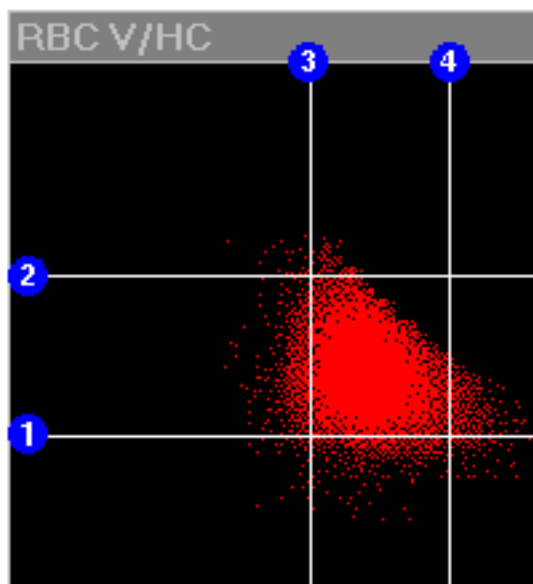
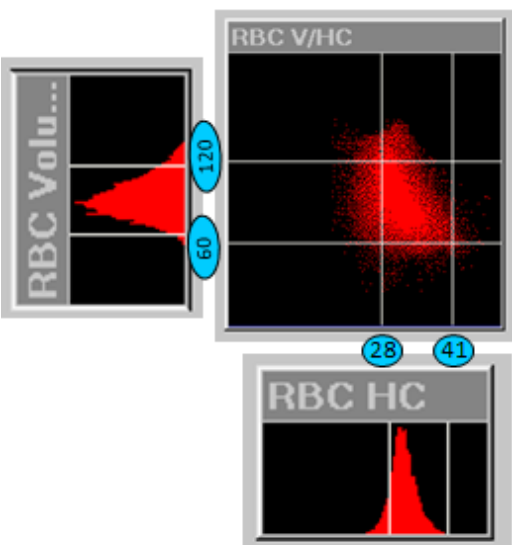
Hgb + nátrium-laurilszulfát (SLS)

⇒ Hgb fehérjeláncában  
konformációváltozás, oxidálódik

⇒ stabilis **methemoglobin-SLS**  
komplex jól mérhető  
fotometriásan

# A vörösvérsejtek optikai detektálása

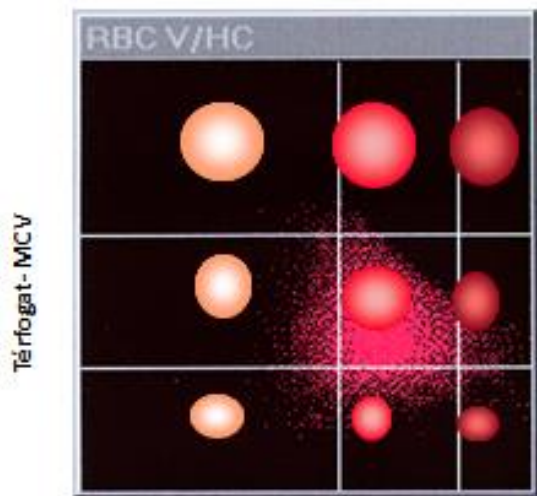
## A térfogat / hemoglobin eloszlás



## RBC citogram:

x tengelyen hemoglobin koncentráció  
y tengelyen vvt térfogat ábrázolva

1. 60 fL térfogat
2. 120 fL térfogat
3. 28 g/dL Hemoglobin koncentráció
4. 41 g/dL Hemoglobin koncentráció



## Méret szerint:

Mikrocitás  
Normocitás  
Makrocitás  
(MCV)

## Hgb tartalom szerint:

Hipokróm  
Normokróm  
Hiperkróm  
(MCH, MCHC)

## Származtatott paraméterek

**MCV** (mean corpuscular volume)

=  $1000 * Htc / RBC$

**Ref: 80-95 fl** (gyermekeknél életkor szerint jelentősen más!)

**MCH** (mean corpuscular hemoglobin)

=  $Hgb / RBC$

**Ref: 28-32 pg**

(1 vvt Hgb tartalma)

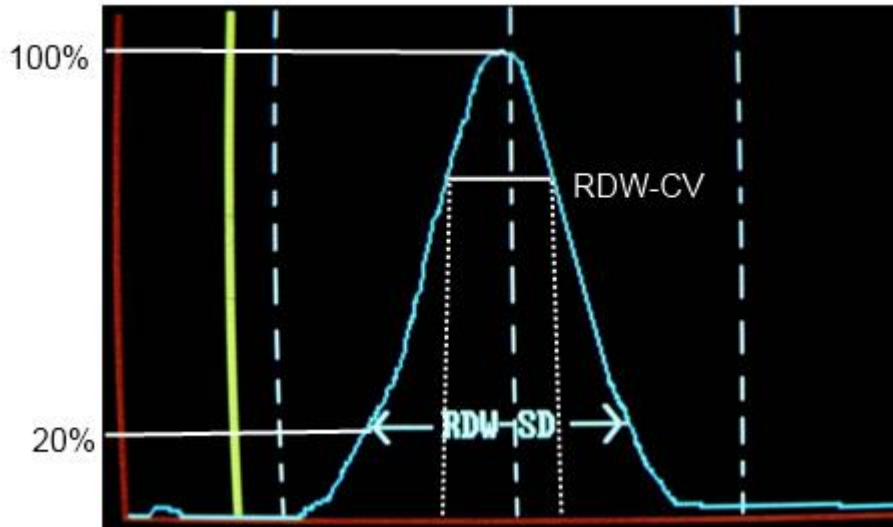
**MCHC** (mean corpuscular hemoglobin concentration)

=  $Hgb / Htc$  vagy  $1000 * Hgb / vvt \text{ szám} * MCV$

**Ref: 330-370 g/l**

(1 L vvt-re számított Hgb cc)

# Vörösvérsejt eloszlási szélesség – RDW (red cell distribution width)



RDW

=  $100 \cdot \text{MCV}$  eloszlás standard  
deviációja/MCV átlaga

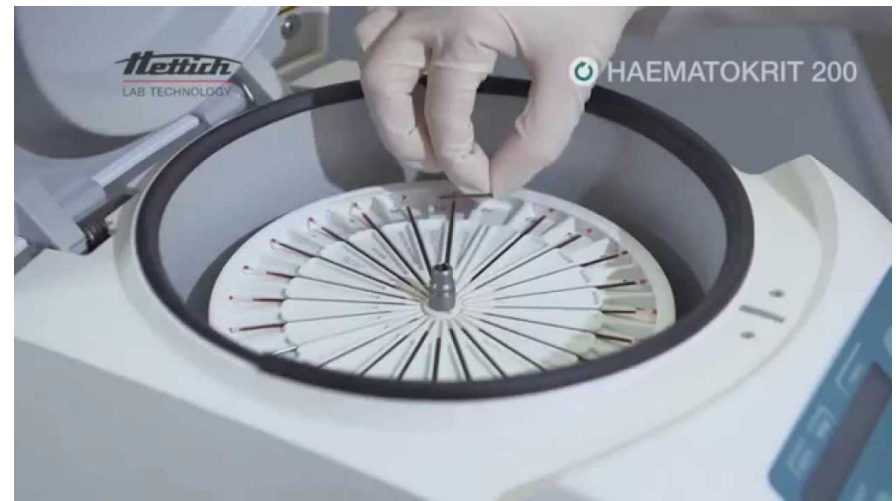
⇒ vvt-k méretbeli eloszlásának,  
**anizocitózis** mértéke

**Ref: 12-15 %**

MCV	RDW	Anémia feltételezhető oka
norm	norm	akut anémia, krónikus interkurrens betegség, átmeneti eritrocitopénia
norm	nőtt	vérvesztés, hemolitikus anémia
csökkent	nőtt	vashiány
csökkent	norm	talasszémia gyanúja
nőtt	nőtt	retikulocitózis, B12 vagy folsavhiány, májbetegség
nőtt	norm	preleukémia, leukémia, aplasztikus anémia, dohányzás

## Hematocrit (Htc) „mérése”

Legmegbízhatóbb módja  
a hematokrit centrifuga



**Automaták számított értéket adnak ki**  
**= (Vörösvérsejtszám \* MCV)/1000**

Feltétel: a vvt szám és térfogat mérése jó legyen

- Ha ezek bármelyike hibás, a hematokrit mérés eredménye is hibás
- A vér/EDTA arány kevésbé befolyásolja az automata által kiadott értéket, mint a centrifugával mértet

**Referenciatartomány:**

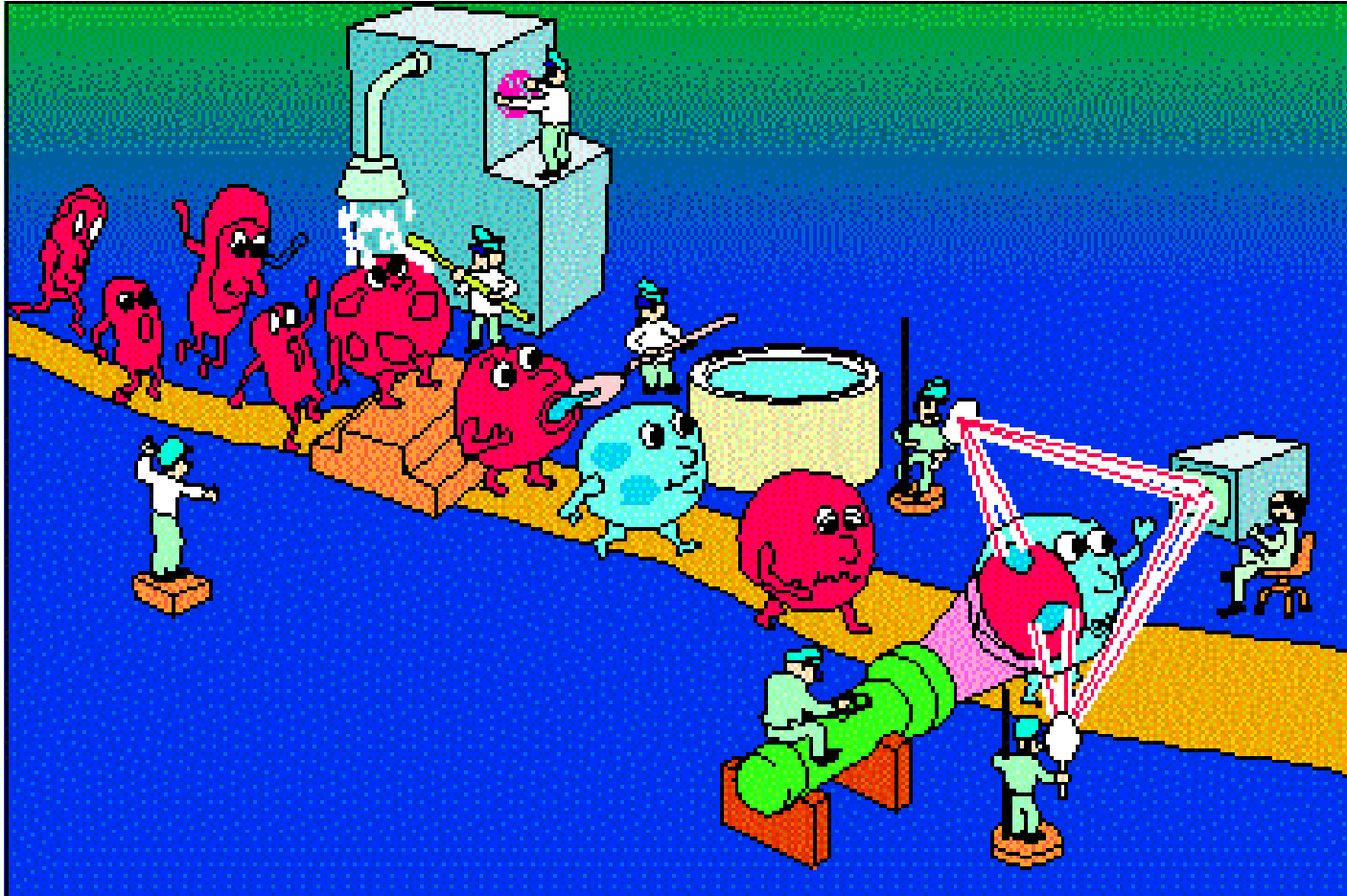
**Férfiak: 0,4-0,5**

**Nők: 0,35-0,45**

**Gyermekek: életkorfüggő!**

(Külföldi szakkönyvek: PCV (packed cell volume))

# Retikulocita mérés



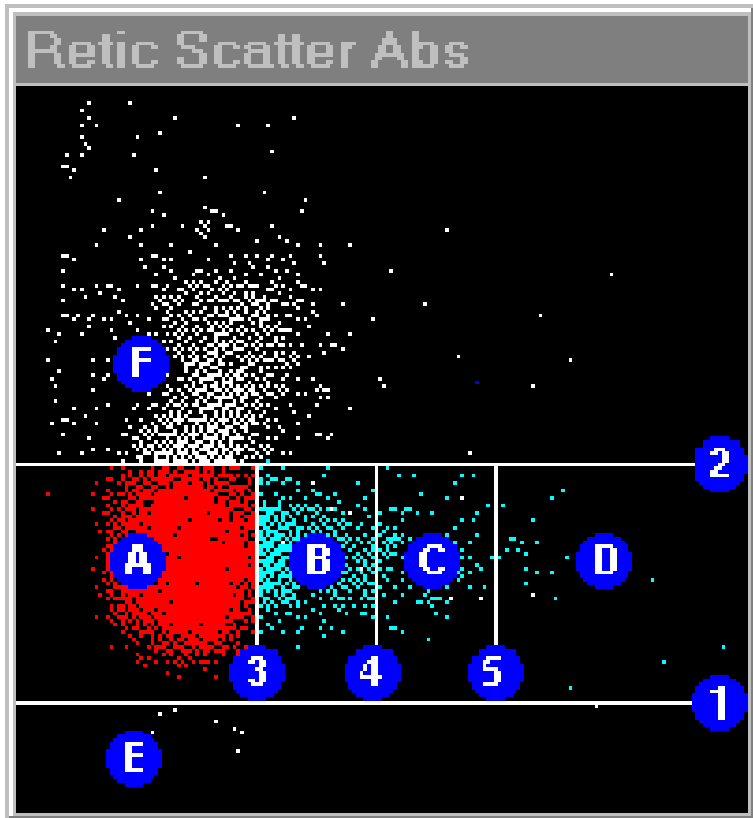
A mérés elve: izovolumetriás gömbbé alakítás után a retikulocita RNS tartalom festése fluoreszcens festékkel (Oxazine).

# Retikulocita mérés

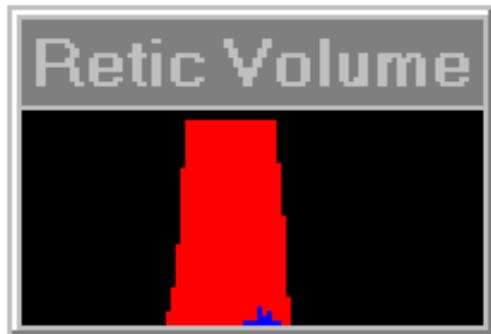
Retikulocita citogram:

- abszorpció (sejt érettség) az x tengelyen
- fényszórás (sejt nagyság) az y tengelyen.

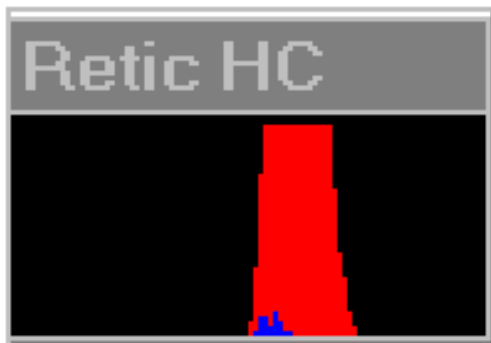
- 1 RTC trombocita küszöb
  - 2 RTC Coincidencia küszöb
  - 3 RTC küszöb
  - 4 Alacsony/közepes RTC küszöb
  - 5 Közepes/Magas RTC küszöb
- A Érett RBC  
B Alacsony abszorpciójú retikulociták  
C Közepes abszorpciójú retikulociták  
D Magas abszorpciójú retikulociták  
E Trombociták  
F Coincidencia



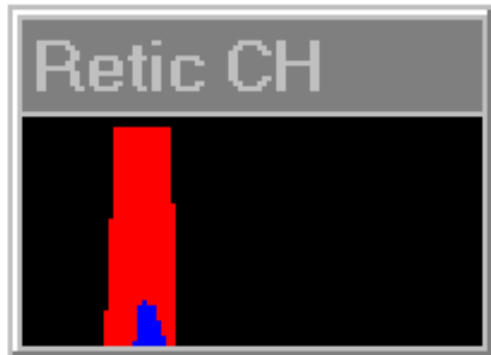
# Retikulocita mérés



Retikulocita térfogat eloszlási hisztogram  
(0-200 fL)



Retikulocita hemoglobin koncentráció (RETIC  
HC) eloszlási hisztogram a celluláris hemoglobin  
koncentráció alapján.  
(0 - 50 g/dL)



Retikulocita celluláris hemoglobin (RETIC  
CH) hisztogram a sejtek hemoglobin tartalma  
alapján

Érett RBC populáció (piros)  
Retikulocita populáció (kék)



# Újabb retikulocita paraméterek

## **Éretlen retikulocita frakció (IRF):**

A fluoreszcenciaintenzitás alapján elkülönített érési csoportok között a közepesen és erősen éretlen (H + M) csoport összege.

Az IRF az **eritropoetikus aktivitás változásának indikátora** (krónikus vesebetegek, csontvelő,- őssejt- és vesetranszplantáltak terápia monitorozása, anémiák differenciálása).

## **Átlagos retikulocita hemoglobin tartalom (CHr vagy RetHe):**

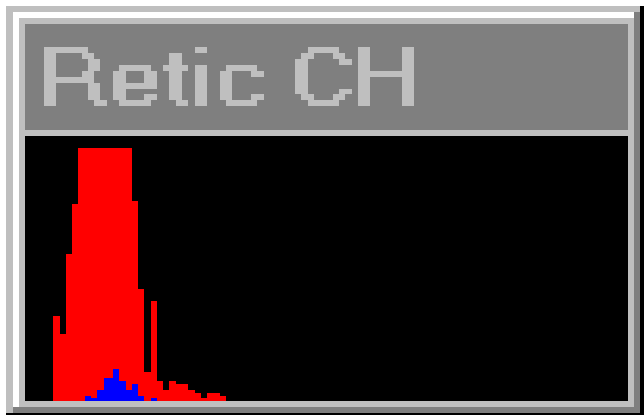
A felhasználható vas mennyiségének érzékeny indikátora.

Jelzi a megelőző 3-4 nap funkcionális vasszintjét.

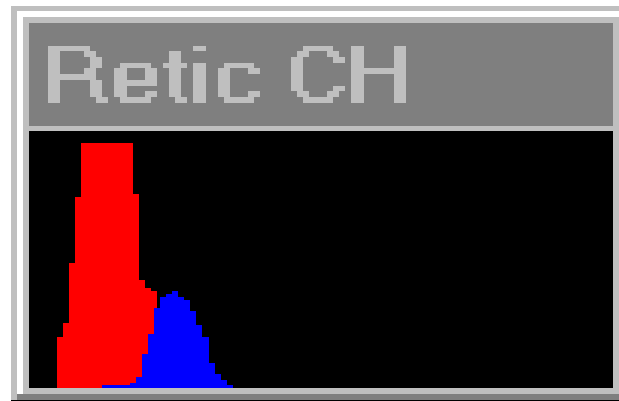
(Vashiány: CHr < 28 pg)

Diagnosztikus érték: vashiányos anémia, vasterápiára adott válasz megítélése, eritropoetin kezelés monitorozása

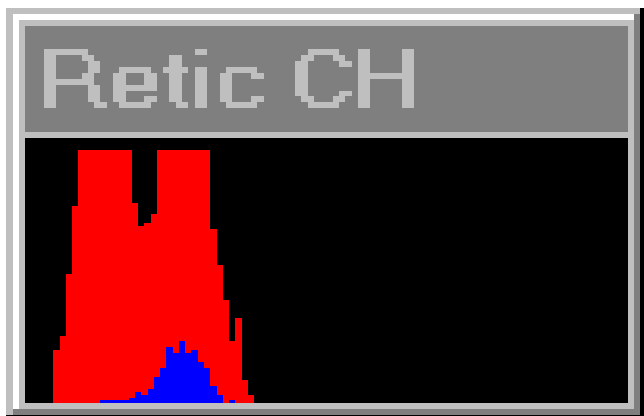
# Eritropoetin kezelés



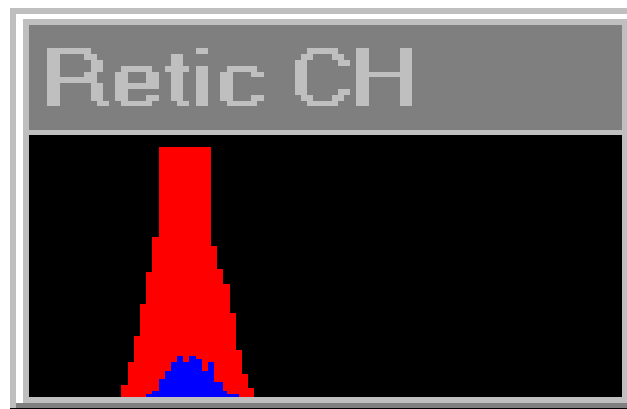
Kezdeti állapot



4 nap múlva



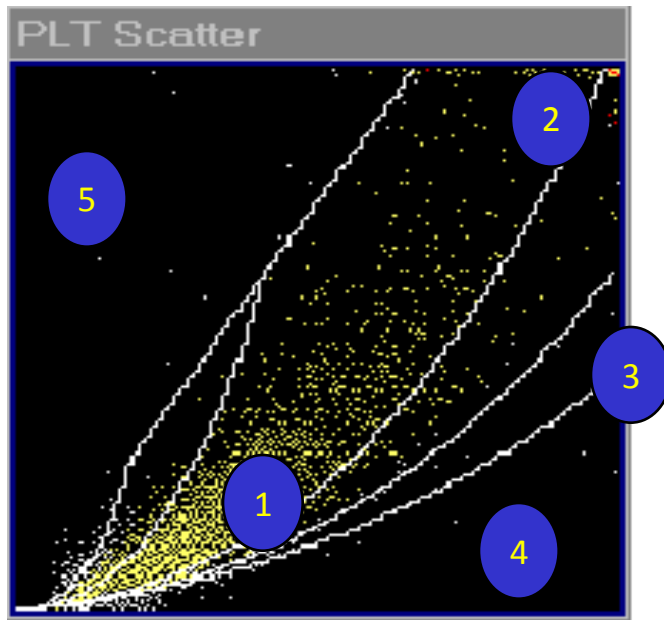
2 hét múlva



1 hónap múlva

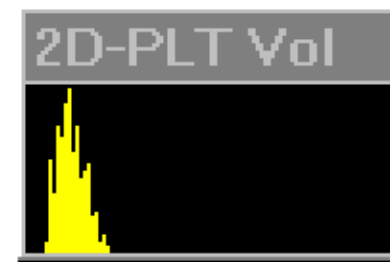
# Trombocita meghatározás

A meghatározás elve azonos a vörösvérsejt méréssel.



Trombocita citogram

- 1 Trombociták
- 2 Nagy trombociták
- 3 Vvt-k
- 4 Vvt fragmentumok
- 5 Vvt árnyékok

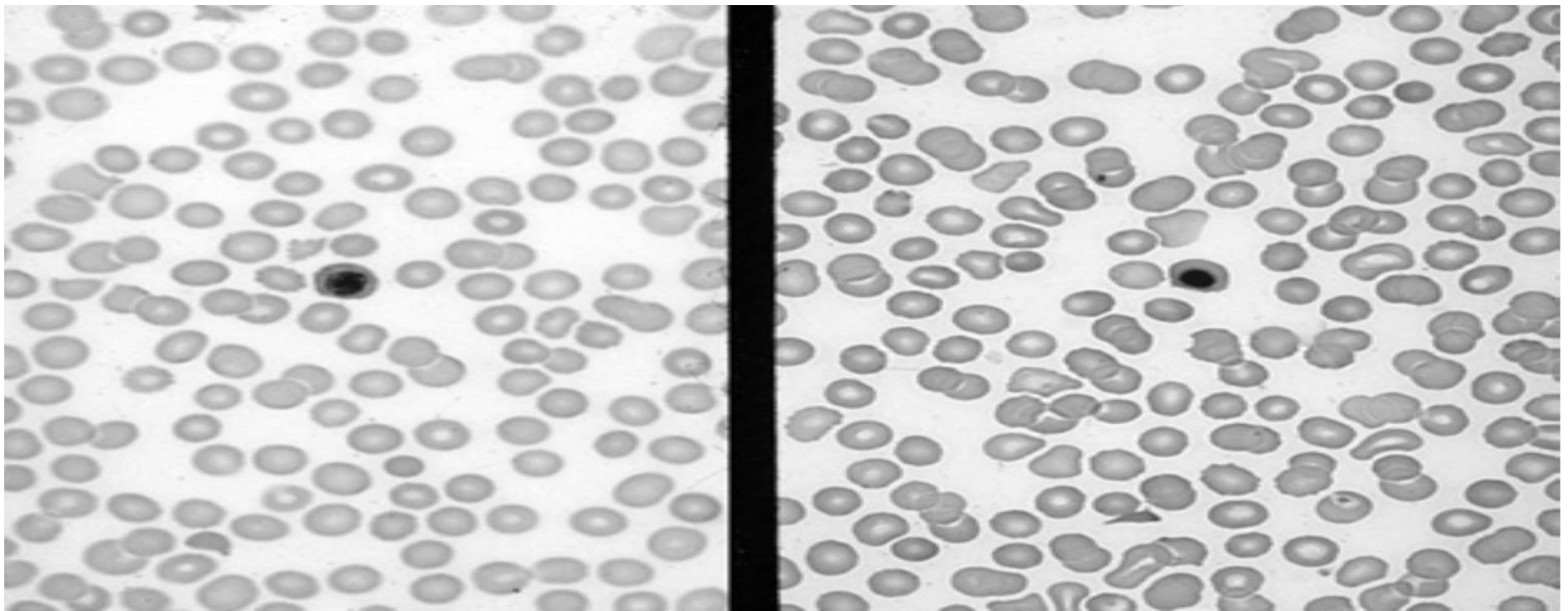


Plt térfogat:  
0-60 fl

Paraméterek: PLT, MPV, L-PLT

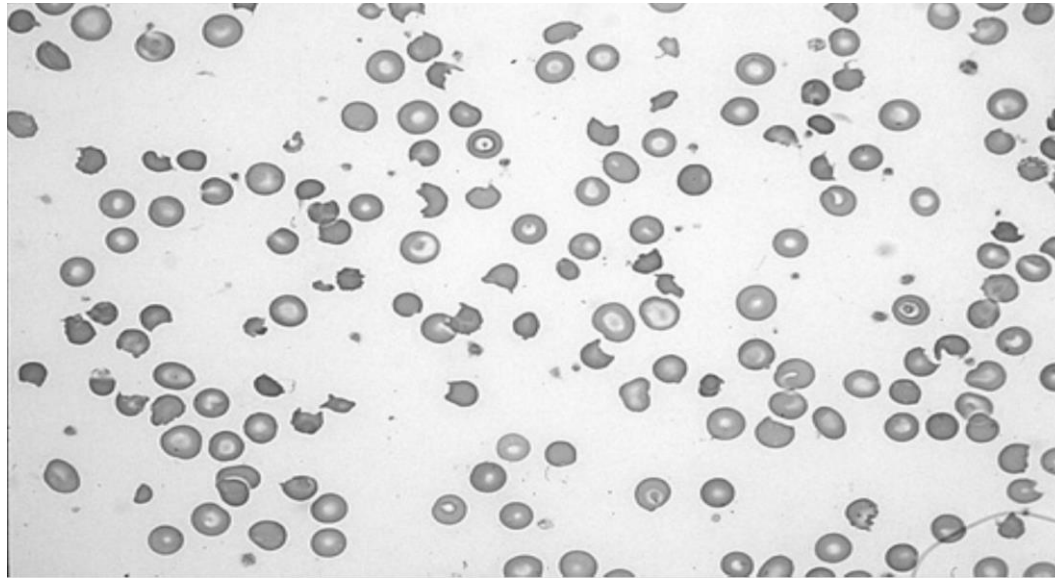
- **Magvas VVT-k:**

Méretük megegyezik a limfocitákéval, tévesen FVS-nek számolhatja a készülék



## Fragmentált vagy igen mikrociter VVT-k

- Előfordulhat, hogy ezeket a készülék nem tudja elkülöníteni a PLT-től
- Hisztogrammot meg kell nézni

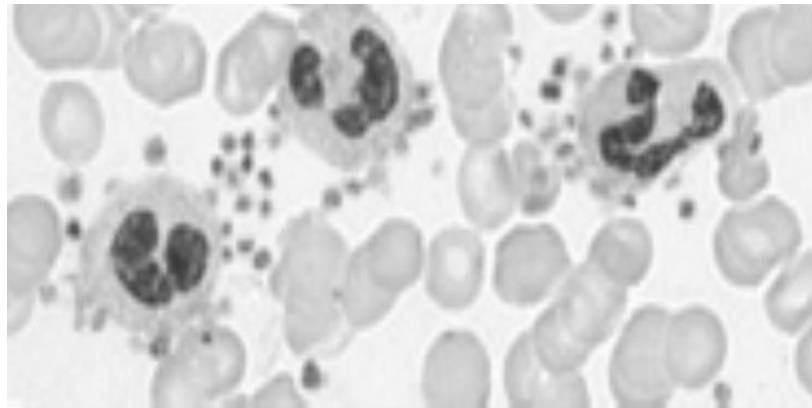


- **Összecsapzódott PLT-k:**

**Tévesen csökkent a PLT-szám.**

PLT-histogramm jobb oldalán emelkedés

Perifériás keneten a kenet szélén láthatók

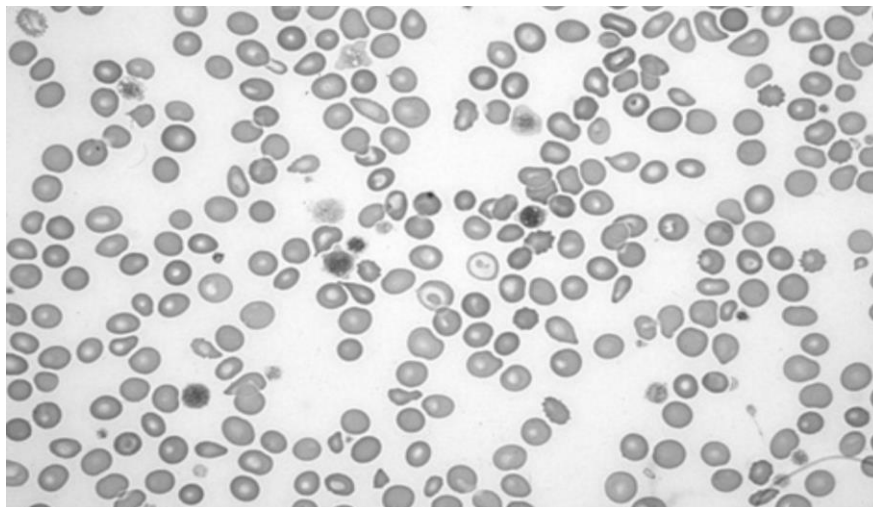


## Óriás PLT-k:

Tévesen VVT-ként értékeli a készülék

VVT-szám alig változik

PLT hisztogramm jobb oldalán, VVT hisztogramm bal oldalán kiemelkedés



# Interferáló tényezők

- Hemolízis: RBC ↓, Hct ↓
  - új mintából ismétlés
- Transzfúzió, vas és B12 terápia: RDW ↑, bimodális RBC hisztogram
- Lízisrezisztens vvt-k: WBC↑, lymphocyta ↑
  - Higítás, megnövelt lízisdő
- Fragmentocyták: RBC↓ PLT ↑
  - Kenetvizsgálat, fragmentocyta program
- Magvas vörösvérsejt NRBC :WBC↑,lymphocyta ↑
  - NRBC program, kenetkészítés



# Interferáló tényezők

- Magas WBC : RBC ↑, inkorrekt Hgb és származtatott értékek
  - mintahígítás
- Krioglobulinok: WBC ↑
  - 37<sup>0</sup>-os inkubáció, ismételt mérés
- Hidegagglutininek: RBC ↓, MCV ↑, MCHC ↑
  - 37<sup>0</sup>-os inkubáció, ismételt mérés
- Lipémia: Hgb ↑, MCHC ↑, MCH ↑
  - Ismétlés új mintából
- PLT aggregátumok: WBC ↑, PLT ↓
  - Kenetvizsgálat, ismétlés citrátos vérből
- Óriás trombociták: WBC ↑, MCV ↑, PLT ↓
  - kenetvizsgálat

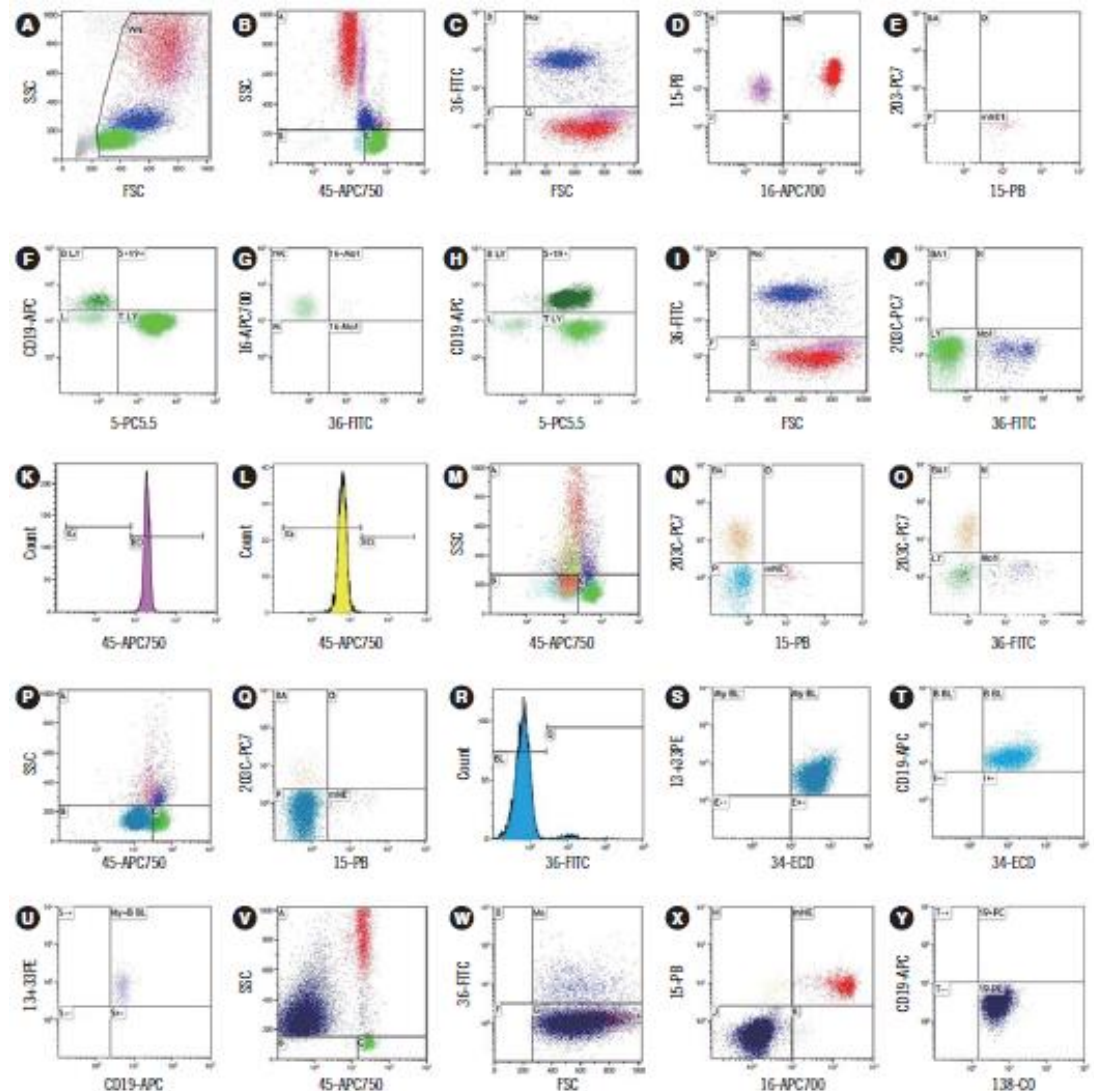
## Development of a Novel Flow Cytometry-Based System for White Blood Cell Differential Counts: 10-color LeukoDiff

Dongjin Park, M.D.<sup>1</sup>, Jiyoung Chang, M.D.<sup>1</sup>, Jimin Kahng, M.D.<sup>1</sup>, Hunhee Park, Ph.D.<sup>2</sup>, Irene Jo, M.D.<sup>1</sup>, Yonggoo Kim, M.D.<sup>1</sup>, and Kyungja Han, M.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea; <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Ansan University, Ansan, Korea

# Flow cytometry!

## Számtalan fejlesztés



**Fig. 1.** 10-color LeukoDiff plots of whole nucleated cell (WN) (A), orientating gate (B), neutrophils (C, D, and E), lymphocytes (T, B, NK, 5+19+) (F, G, and H), monocytes (I and J), eosinophils (K), immature granulocytes (L), chronic myelogenous leukemia (M), basophils (N and O), acute myeloid leukemia (P), blasts (Q and R), myeloblasts (S), B blasts (T), myeloid antigen-positive B blasts (U), and 19-plasma cells (V, W, X, and Y) in peripheral blood samples.  
Abbreviation: NK, natural killer cells.