

Общий клинический анализ крови: современная методология, факторы интерференции, оценка достоверности результатов

Продолжение. Начало в № 5.

Часть 2

Большинство анализаторов, производя дифференциальный подсчет клеток крови, имеет возможность визуализировать полученные результаты с помощью построения гистограмм (3-Diff) или скаттерграмм (5-Diff). В случае отклонения графиков от стандартного вида автоматически генерируются сигналы об ошибках («флаги»), чувствительность и количество которых зависят от типа анализатора и его производителя. Очевидно, что чем более современным является оборудование, тем больше в нем реализовано методов детекции (лазерное рассеяние, иммунофлуоресценция, окрашивание на миелопероксидазу), тем специфичнее подсчет и дифференцировка всех клеток. Тем не менее не существует ни одного прибора, позволяющего обеспечить 100% точность и специфичность измерения, поэтому изучение графических данных и сигналов тревоги дает врачу дополнительную ценную информацию о правильности подсчета и дифференцировки, возможных ошибках измерения и даже их причинах.

Лейкоциты (WBC)

Как сообщалось ранее (в части 1), большинство гематологических анализаторов считает лейкоцитом любую частицу, превышающую по размеру тромбоцит и не разрушающуюся под действием лизирующих растворов. Это является общей методологической предпосылкой для ложного завышения результатов. Другая особенность, приводящая к получению, напротив, ложно заниженных результатов, — это невозможность распознавания импульсов от нескольких клеток, одновременно оказавшихся в счетной камере, и регистрация их как одного

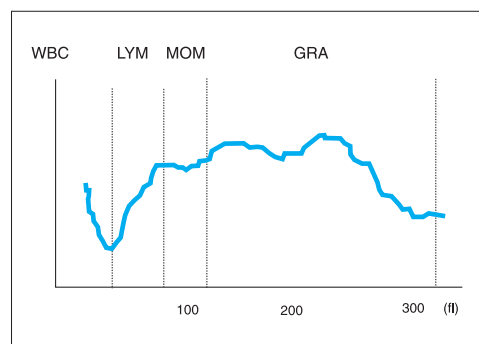


Рис. 1. Гистограмма распределения лейкоцитов. Отсутствуют четкие границы между различными популяциями клеток. В правой части отмечается повышенное количество очень крупных частиц (300 фл и более)

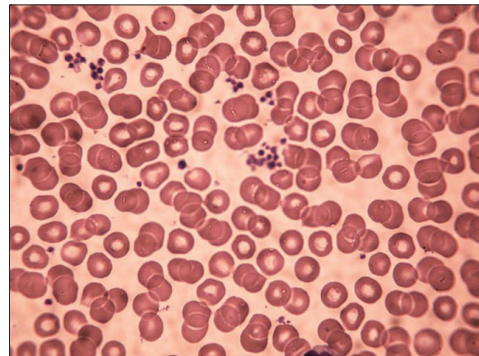


Рис. 2. ЭИ-ПТП. Окрашенный препарат крови. Агрегаты тромбоцитов (x1000)

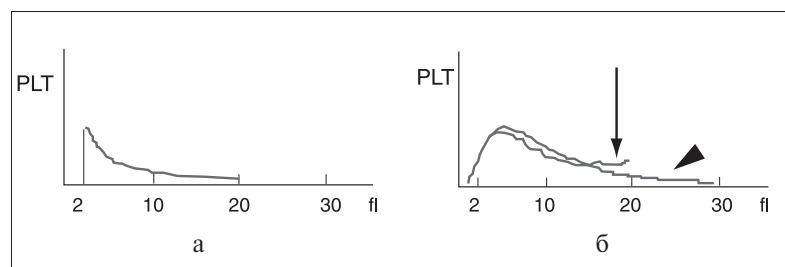


Рис. 3. Гистограммы распределения тромбоцитов по объему при наличии малых артефактов (а) и больших (б)

импульса. Еще одна причина занижения результата — запрограммированное игнорирование анализатором любых частиц, превышающих по размерам 200-300 фемтолитров (фл), поскольку ни при каких видах патологии клетки таких размеров в крови не встречаются. Таким образом, это основные технологические проблемы, приводящие к некорректному подсчету не только лейкоцитов, но и других клеток крови.

В многочисленных исследованиях, посвященных феномену псевдолейкопении, основными ее причинами считают образование агрегатов из нейтрофилов и других лейкоцитов *in vitro* под влиянием этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), а также тепловых и холодных антител. Занижение уровня лейкоцитов иногда бывает настолько значимым, что приводит к диагнозу агранулоцитоза, назначению ненужных дообследований (пункции или биопсии костного мозга) или лечению (антибиотикотерапии). Механизм ЭДТА-агломинации лейкоцитов пока не выяснен, предположительно, он опосредован аутоантителами природы IgM, а также связан с высокой экспрессией молекулы интегрина (CD11b-CD18) на мембране нейтрофилов. В некоторых сообщениях отмечена зависимость образования агрегатов от температуры, и в ряде случаев при прогревании пробирки с кровью до 37 °C скопления лейкоцитов частично или полностью распадаются. Немедленное измерение крови сразу после получения образца также является процедурой выбора при работе с кровью пациентов, демонстрирующих подобный феномен. Независимо от природы агглютининов лейкоциты образуют более или менее крупные агрегаты, которые можно обнаружить при просмотре мазков периферической крови: малые (до 5 клеток), средние (до 50 клеток) и большие (более 100 клеток) скопления.

Изучая скаттерграммы лейкоцитов, необходимо иметь в виду, что только небольшие скопления могут отображаться в виде аномального пула клеток в правой верхней зоне с появлением соответствующего «флага», тогда как очень крупные агрегаты анализатором не учитываются. На гистограммах следует обращать внимание на наличие дополнительных пиков в зоне гранулоцитов (GRA) или стертость границ между разными популяциями клеток (GRA, MID (MON), LYM) (рис. 1). При наличии любых сообщений анализатора об ошибке и необычном виде гистограмм необходимо тщательное микроскопическое исследование мазка крови.

Основными причинами, приводящими к ложному завышению количества лейкоцитов, являются следующие: наличие в крови тромбоагрегатов или гигантских тромбоцитов (например, при тромбастении Гланцмана, миелолипролиферативных заболеваниях), нормобластоз, присутствие эритроцитов, устойчивых к лизису (при аномальных гемоглобинах, уремии, химиотерапии), эритроцитов с внутриклеточными паразитами (малярийным плазмодием, бабезией), криоглобулинемия и криофибриногенемия, гиперлипидемия.

Гигантские тромбоциты, тромбоагрегаты, ядра нормоцитов после лизиса мембраны и нелизированные эритроциты воспринимаются анализатором как малые лимфоциты, что приводит к завышенным результатам подсчета лейкоцитов в целом и лимфоцитов в частности. Вид гистограммы и числовые значения соответствуют лимфоцитозу, на скаттерграммах

псевдолимфоциты располагаются немного левее и выше зоны лимфоцитов, частично перекрывая ее. Анализаторы 3-Diff лишены возможности выявлять указанные артефакты, поэтому единственным выходом при подозрении на любую из вышеописанных ситуаций является изучение мазка крови. В некоторых случаях количество нормоцитов и устойчивых к лизису эритроцитов значительно превышает таковое лейкоцитов, что может обусловить грубые ошибки и недопустимо завышенные результаты. Например, у лейкокемических пациентов после химиотерапии нормобластоз способен привести к получению нормальных и даже высоких значений, что может повлиять на лечебную тактику.

Влияние криоглобулинов (не являющихся агглютинином) и криофибриногена на подсчет лейкоцитов практически одинаково, степень искажения результата не зависит ни от их количества, ни от происхождения. В пробирке с кровью, хранящейся при комнатной температуре, криоглобулины образуют преципитаты, которые могут иметь форму плотных аморфных сгустков, хлопьевидных частиц, кристаллов в виде игл, глыбок. Криофибриноген образует нити и фибриллы различной толщины, которые хорошо видны в окрашенном мазке крови. На скаттерграммах в зависимости от размеров преципитатов обнаруживается аномальное скопление точек в зоне малых размеров или лимфоцитов, которые могут нарушать подсчет как лейкоцитов, так и тромбоцитов, приводя иногда к восьмикратному завышению результата. В некоторых ситуациях криоглобулины могут изменять текучесть плазмы, придавая ей свойства геля, это нарушает правильную аспирацию пробы прибором и приводит к появлению соответствующего «флага». Примечательно, что именно выявление артефактов в ОАК часто является первым шагом в диагностике криоглобулинемии. Прогревание крови до 37 °C часто, но не всегда, позволяет избежать от интерференции, вызванной криобелками.

Тромбоциты (PLT)

При оценке правильности подсчета тромбоцитов анализатором необходимо помнить о том, что он производится одновременно с определением количества эритроцитов (RBC) в присутствии лейкоцитов. Средний объем PLT составляет 6-10 фл, установленными для подсчета тромбоцитов границами являются клетки объемом от 2 до 36 фл. Частицы, размер которых меньше порогового, рассматриваются как фон (дербис, грязь); частицы, размер которых превышает пороговый, — как «не тромбоциты».

Наиболее частой причиной ложного занижения концентрации тромбоцитов является ЭДТА-индуцированная агрегация тромбоцитов. Анализатор не воспринимает агрегаты как тромбоциты, поскольку их размеры значительно превосходят верхний порог; и во многих случаях наблюдается существенное занижение результата ($\leq 50 \times 10^9 / \text{л}$), тогда как истинное содержание тромбоцитов нормально. Распознавание ЭДТА-индуцированной псевдотромбоцитопении (ЭИ-ПТП) имеет большое значение, так как обнаружение у пациента выраженной тромбоцитопении может привести к проведению ненужных медицинских вмешательств и процедур (пункции костного мозга, переливания тромбоконцентрата). Наиболее важным моментом в плане выявления псевдотромбоцитопении с клинической точки зрения является отсутствие у больного каких-либо геморрагических проявлений. Очевидно также, что при наличии истинного тромбоцитоза ЭИ-ПТП может маскировать это состояние, многократно занижая результат подсчета.

В многочисленных исследованиях, посвященных ЭИ-ПТП, обнаружено, что этот феномен наблюдается исключительно *in vitro*. Его связывают с циркулирующими в крови

аутоантителами, направленными против эпитопа рецептора тромбоцитов GPIIb/IIIa, в норме скрытого внутри молекулы и экспрессирующегося на поверхности рецепторного комплекса исключительно в присутствии ЭДТА. Агглютинация тромбоцитов начинается сразу после взятия крови и прогрессирует по мере хранения образца, поэтому чем раньше произведено измерение, тем меньшую погрешность ЭИ-ПТП вносит в подсчет тромбоцитов и других клеток.

Поскольку агрегаты тромбоцитов не разрушаются под действием лизирующих агентов, их подсчитывают в канале лейкоцитов и отображают на WBC-скаттерграммах в виде скопленных точек в зоне малого и среднего размера. Если анализатор не может идентифицировать эти частицы, он генерирует соответствующий сигнал тревоги. Гистограммы, полученные при измерении на анализаторах типа 3-Diff, более чем в 50% случаев имеют абсолютно нормальный вид. Необходимо обращать внимание на самые минимальные изменения кривой WBC (дополнительные пики, сглаженность рисунка), особенно если присутствует тромбоцитопения. При просмотре окрашенного мазка крови отмечается большое количество тромбоагрегатов разного размера (рис. 2).

Еще одной причиной ложного занижения количества тромбоцитов является тромбоцитарно-гранулоцитарный сателлитизм, механизм которого мало изучен. По неизвестным пока причинам тромбоциты «прилипают» к нейтрофилам и не регистрируются анализатором. Распознавание этого феномена возможно только при изучении мазка крови.

Присутствие в крови гигантских тромбоцитов, размер которых ≥ 40 фл, также приводит к неправильному подсчету их в анализаторе. В этом случае их пропускают при подсчете тромбоцитов и идентифицируют как RBC и WBC.

Причиной ложного завышения количества тромбоцитов является наличие в крови частиц любого происхождения, соответствующих по размеру тромбоцитам. Это могут быть микроэритроциты (микросфероциты) или аномальные эритроциты (шистоциты), цитоплазматические фрагменты лейкоцитов (часто обнаруживаются при лейкозах, лимфомах), преципитаты криоглобулинов и криофибриногена, бактерии, грибы, липопротеины. Необходимость распознавания псевдотромбоцитоза связана с тем, что он может маскировать клинически значимую тромбоцитопению. Анализаторы 5-Diff имеют больше возможностей дифференцировать вышеперечисленные артефакты, тогда как приборы типа 3-Diff чаще всего их пропускают. При анализе гистограммы PLT необходимо обращать внимание на эксцессы в левой и правой части кривой распределения. Присутствие очень малых частиц (преципитатов, липидов, скопленей флоры) отображается пиком кривой в крайнем левом положении с последующим переходом к средним размерам тромбоцитов под острым углом (рис. 3а).

Избыток частиц большего размера (фрагменты WBC и RBC) придает кривой незавершенный вид, так как линия резко обрывается, не достигая оси абсцисс (рис. 3б). Выявить причину некорректного подсчета тромбоцитов помогает тщательное исследование мазка крови.

Таким образом, знание типа и принципа работы конкретного гематологического анализатора, анализ графических данных (гистограмм или скаттерграмм), изучение окрашенного мазка крови в большинстве случаев позволяют выявить погрешности подсчета клеток и их причины, что повышает качество исполнения и интерпретации общего анализа крови и помогает избежать неправильных клинических решений.

Продолжение следует.

Подготовила **Александра Яковец**

