

# ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

## ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΑΝΑΛΥΤΕΣ

### Εισαγωγή

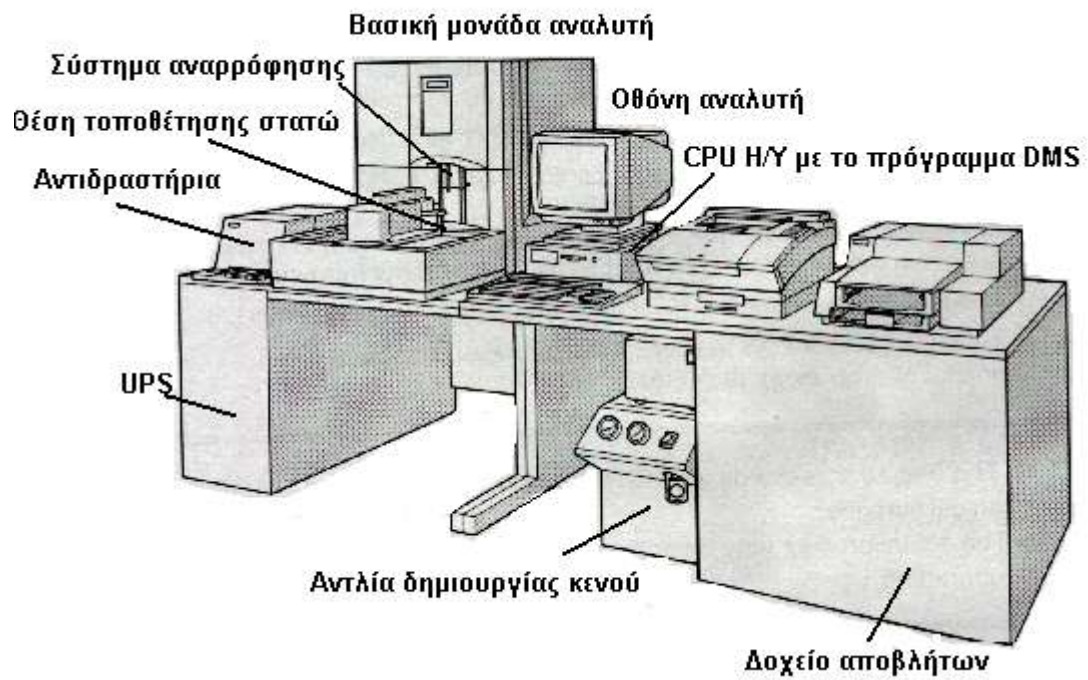
Το σύγχρονο αιματολογικό εργαστήριο διαθέτει πλήθος μηχανημάτων που αυτοματοποιούν όλες τις αναλύσεις που διενεργεί. Μεταξύ αυτών οι αιματολογικοί αναλυτές είναι η σημαντικότερη και η πλέον αναντικατάστατη συσκευή. Οι αιματολογικοί αναλυτές προσδιορίζουν όλες τις παραμέτρους της «γενικής αίματος» και κυκλοφορούν σε διάφορους τύπους ανάλογα με τις παραμέτρους που μπορούν να προσδιορίσουν.

Οι απλούστεροι αιματολογικοί αναλυτές προσδιορίζουν τον αριθμό των ερυθροκυττάρων (**RBC**), τον αριθμό των λευκοκυττάρων (**WBC**), τον αριθμό των αιμοπεταλίων (**PLT**), την τιμή του αιματοκρίτη (**Hct**), της αιμοσφαιρίνης (**Hgb**) και τους ερυθροκυτταρικούς δείκτες **MCH**, **MCHC**, **MCV**.

Οι μεγαλύτεροι αιματολογικοί αναλυτές προσδιορίζουν επιπλέον τον **Λευκοκυτταρικό τύπο** μπορούν δηλαδή να ξεχωρίσουν τις βασικές μορφές κυττάρων (**ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα, βασεόφιλα, λεμφοκύτταρα, μονοπύρηννα**) καθώς επίσης και **άωρες μορφές ή μορφολογικές αλλοιώσεις των κυττάρων**. Υπολογίζουν περισσότερους ερυθροκυτταρικούς δείκτες (**RDW**, **RDW-SD**, **RDW-CV**) καθώς επίσης και τους αιμοπεταλιακούς δείκτες **P-LCR**, **MPV**, **PDW**.

Οι ακόμα τελειότεροι και πιο πλήρεις αιματολογικοί αναλυτές προσδιορίζουν όλα τα παραπάνω, καθώς επίσης πλήθος άλλων δεικτών ενώ έχουν ακόμα την δυνατότητα να κάνουν επίστρωση σε αντικειμενοφόρο πλάκα, να βάψουν επίχρισμα αίματος και να μετρήσουν δικτυοερυθροκύτταρα (**ΔΕΚ**). Οι περισσότεροι αναλυτές έχουν την δυνατότητα της αυτόματης ανάδευσης των γενικών αίματος πριν την ανάλυση, την ομαδική εισαγωγή δειγμάτων μέσω ειδικών στατώ καθώς επίσης και την αποστολή των αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονικό αρχείο.

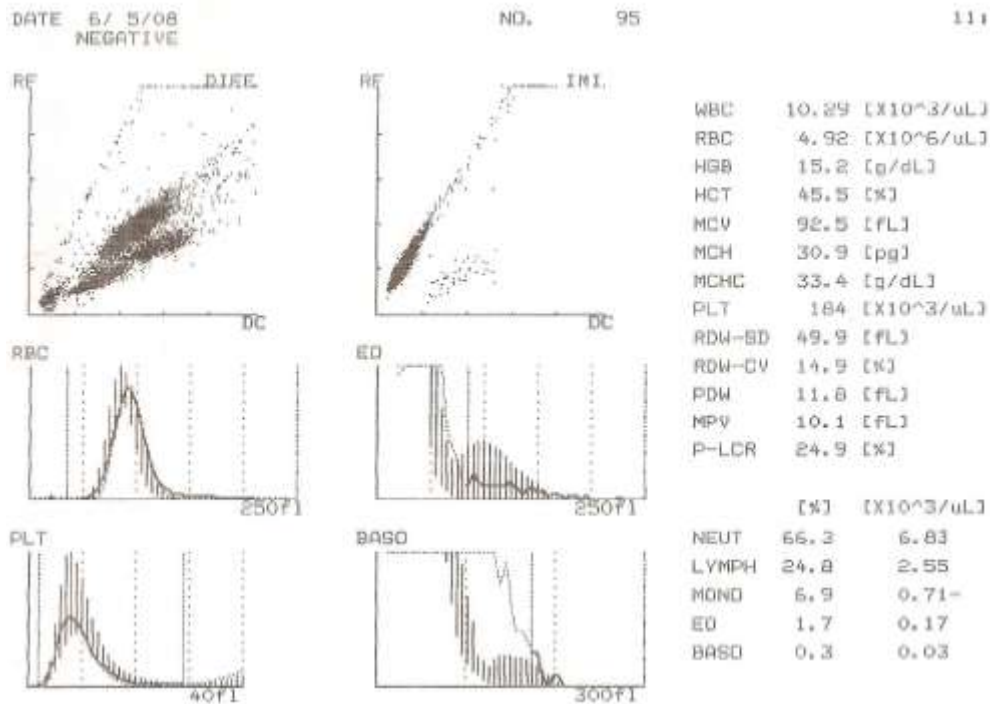
Όλα τα παραπάνω γίνονται με πλήρως αυτοματοποιημένες διαδικασίες. Πριν την ανάλυση τα σωληνάρια αίματος τοποθετούνται σε ειδικά στατώ με προεπιλεγμένη σειρά και αρίθμηση. Ο αναλυτής προσδιορίζει αυτόματα κάθε γενική αίματος μέσα σε 2-3 min. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην οθόνη του αναλυτή, τυπώνονται σε χαρτί ενώ μπορούν επίσης να σταλούν στο ηλεκτρονικό αρχείο του εργαστηρίου. Ο έλεγχος της καλής λειτουργίας του αναλυτή γίνεται με την διαδικασία του ελέγχου ποιότητας. Τα επίπεδα των τιμών ρυθμίζονται σε κατάλληλο επίπεδο με την διαδικασία της βαθμονόμησης του αναλυτή.



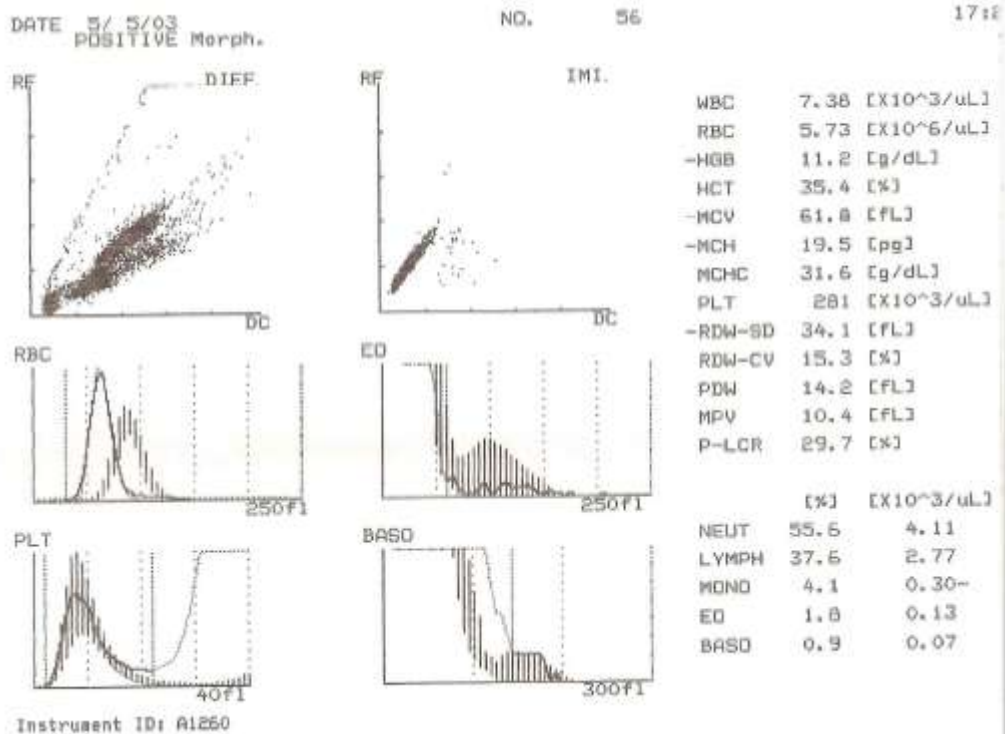
Τα τμήματα ενός αιματολογικού αναλυτή



Σύγχρονοι αιματολογικοί αναλυτές



Φυσιολογική γενική αίματος



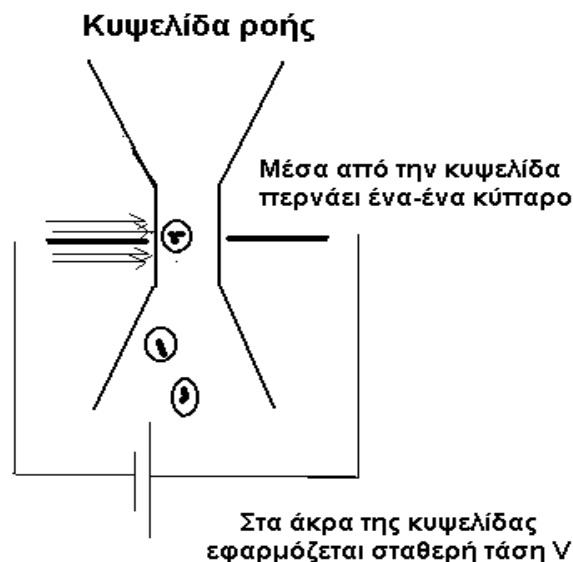
Γενική αίματος ατόμου με στίγμα μεσογειακής αναιμίας

## **Μέθοδοι διάκρισης των κυττάρων του αίματος - Κυτταρομετρία ροής**

Η **κυτταρομετρία ροής** είναι η τεχνολογία η οποία όπως υποδηλώνει και το όνομα της χρησιμεύει για την μέτρηση κυττάρων. Χρησιμοποιείται σε ειδικούς αναλυτές που ονομάζονται **κυτταρομετρητές ροής**, κυρίως για τον προσδιορισμό κυττάρων ανοσολογικού ενδιαφέροντος όπως β-λεμφοκύτταρα, T<sub>4</sub>-λεμφοκύτταρα κ.α. Χρησιμοποιείται όμως και στους αιματολογικούς αναλυτές και αναλυτές ούρων για την μέτρηση κυττάρων και γενικότερα έμμορφων στοιχείων.

### **Τρόποι μέτρησης κυττάρων στους αιματολογικούς αναλυτές**

Η διάκριση του είδους των κυττάρων και η μέτρηση του αριθμού τους γίνονται κυρίως με την μέθοδο της μέτρησης της διαφοράς δυναμικού και της σκέδασης του φωτός. Και στις δύο περιπτώσεις τα κύτταρα περνάνε μέσα από μια στενή οπή που ονομάζεται **κυψελίδα ροής**. Η κίνηση των κυττάρων μέσα από την κυψελίδα είναι τέτοια ώστε κάθε φορά να περνά μέσω αυτής μόνο ένα κύτταρο.



Η λειτουργία της κυψελίδας ροής

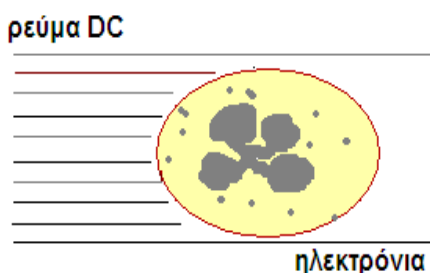
### **Μέτρηση κυττάρων με την επίδραση ηλεκτρικού ρεύματος**

Μετά την εισαγωγή του δείγματος στον αιματολογικό αναλυτή ο αναλυτής αναρροφά συγκεκριμένο όγκο αίματος ο οποίος αραιώνεται σε κατάλληλο **διαλύτη** που αποτελεί **καλό αγωγό του ηλεκτρισμού**. Ο διαλύτης επιλέγεται έτσι ώστε μεταξύ κυττάρων και διαλύτη να υπάρχει μεγάλη διαφορά σε ότι αφορά την αντίσταση του διερχόμενου ρεύματος και την αγωγιμότητα του διαλύματος. Στα άκρα της κυψελίδας ροής αναπτύσσεται σταθερή τάση V. Μόλις τα κύτταρα περάσουν από την κυψελίδα τότε η τάση στα άκρα της μεταβάλλεται και έτσι αναγνωρίζει ο αναλυτής ότι πέρασε διαμέσου αυτής ένα κύτταρο. Έτσι προσδιορίζεται ο **αριθμός** των κυττάρων.

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τα αδέρφια Coulter το 1956 και έκτοτε ονομάζεται **αρχή Coulter**.

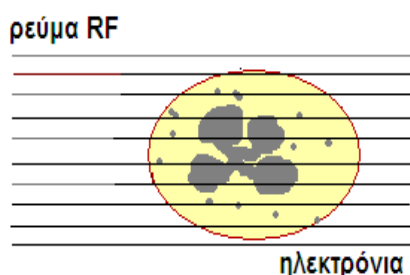
Στα άκρα της κυψελίδας ροής αναπτύσσονται δύο ειδών τάσεις, η τάση σταθερού ρεύματος και η τάση εναλλασσόμενου ρεύματος.

Η **τάση σταθερού ρεύματος** (ονομάζεται διεθνώς ρεύμα **DC**) στέλνει ηλεκτρόνια πάνω στα αιμοσφαίρια τα οποία δεν μπορούν να τα διαπεράσουν αφού προσκρούουν πάνω στο πρωτόπλασμα των κυττάρων. Η έλλειψη διαπερατότητας του κυττάρου από τα ηλεκτρόνια DC εξαρτάται από την **αντίσταση** του κυττάρου η οποία με την σειρά της εξαρτάται από το **μέγεθός** του. Κατά συνέπεια η τάση DC προσδιορίζει τον **όγκο** των αιμοσφαιρίων του αίματος. Ο όγκος των κυττάρων μετράται σε μονάδες **fl** (femtoliters).



Η πρόσκρουση των ηλεκτρονίων DC πάνω στα αιμοσφαίρια

Η τάση **εναλλασσόμενου ρεύματος** (ονομάζεται διεθνώς ρεύμα **RF**) εξαρτάται από την αγωγιμότητα του κυττάρου. Συγκεκριμένα το ρεύμα υψηλής συχνότητας RF διαπερνά το πρωτόπλασμα του κυττάρου και μας δίνει πληροφορίες για την αγωγιμότητα του η οποία είναι ανάλογη με το μέγεθος του πυρήνα (σχήμα και αριθμός λοβίων) καθώς και από την ύπαρξη ή όχι κοκκίων μέσα στο κυτταρόπλασμα.



Η διέλευση των κυττάρων RF μέσα από τα αιμοσφαίρια

Ο αιματολογικός αναλυτής συνοδεύεται από ηλεκτρονικό υπολογιστή ο οποίος διαθέτει στην μνήμη του επαρκείς πληροφορίες έτσι ώστε η μεταβολή της τάσης (DC και RF) στα άκρα της κυψελίδας να συσχετιστεί με το είδος του κυττάρου.

Για κάθε είδος κυττάρου ο αναλυτής έχει αποθηκευμένες στην μνήμη του δύο τιμές τάσης: το **κατώτερο** και **ανώτερο όριο διάκρισης**. Το κατώτερο όριο διάκρισης είναι μια τιμή τάσης που αντιστοιχεί στο ελάχιστο μέγεθος που μπορεί να έχει ένα κύτταρο του αίματος. Το ανώτερο όριο διάκρισης είναι αντίστοιχα μια τιμή τάσης που αντιστοιχεί στο μέγιστο μέγεθος που μπορεί να έχει το ίδιο κύτταρο αίματος. Τα ανώτερα και τα κατώτερα όρια διάκρισης είναι κατάλληλα επιλεγμένα ώστε να διακρίνουν όσο το δυνατόν

σαφέστερα τα διάφορα είδη κυττάρων. Για τον σκοπό αυτό τα όρια διάκρισης των κυττάρων του αίματος δεν θα πρέπει να αλληλοεπικαλύπτονται.

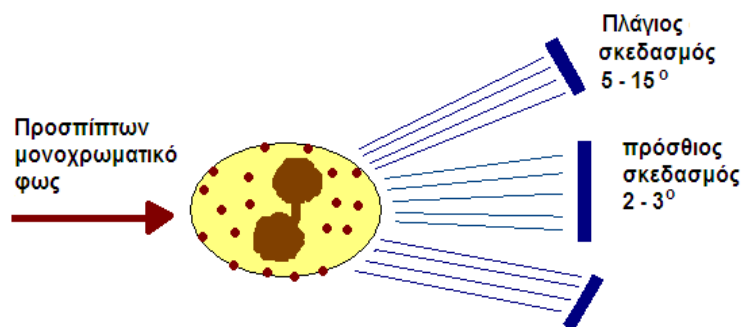
Στην πράξη όμως παρατηρείται ότι σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις τα όρια διάκρισης των κυττάρων δεν βοηθούν τον αναλυτή να ξεχωρίσει τις παθολογικές μορφές κυττάρων από άλλα φυσιολογικά κύτταρα «γειτονικού» μεγέθους και μορφής. Π.χ. ο αναλυτής δεν μπορεί να διακρίνει τις διαφορές μεταξύ μικρών λεμφοκυττάρων και μεγάλου μεγέθους ερυθροκυττάρων (μακροκυττάρωση). Για να αντιπαρέλθει ο αναλυτής το πρόβλημα αυτό οι σύγχρονοι αιματολογικοί αναλυτές μπορούν να προσδιορίσουν τα αιμοσφαίρια όχι μόνο με ηλεκτρικό ρεύμα αλλά και με άλλες μεθόδους (π.χ. σκέδαση, φωτομέτρηση).

Στην περίπτωση όπου ο αιματολογικός αναλυτής παρά τις τεχνολογίες που εφαρμόζει δεν μπορεί να διακρίνει τα αιμοσφαίρια τότε θα πρέπει το εργαστήριο να προχωρήσει στην χρώση παρασκευάσματος και στην ανάγνωση του λευκοκυτταρικού τύπου στο μικροσκόπιο (πλακάκι).

### Μέτρηση κυττάρων με την σκέδαση του φωτός

Ως σκέδαση ονομάζεται το φαινόμενο της διάχυσης του φωτός όταν αυτό πέσει πάνω σε ένα αντικείμενο από το οποίο δεν μπορεί να απορροφηθεί. Συγκεκριμένα η σκέδαση εμφανίζεται όταν μία δέσμη μονοχρωματικού φωτός (ακτίνα laser) πέσει πάνω σε ένα κύτταρο το οποίο έχει διάμετρο μεγαλύτερη από το μήκος κύματος του μονοχρωματικού φωτός.

Η σκέδαση του φωτός γίνεται και αυτή μέσα στην κυψελίδα ροής. Μόλις το κύτταρο φτάσει στην κυψελίδα μια μονοχρωματική δέσμη φωτός σαρώνει την επιφάνεια του. Το φως που προσκρούει πάνω στην κυτταρική του μεμβράνη διαχέεται στον γύρω χώρο. Η μέτρηση του φωτός που διαχέεται γίνεται με δύο ανιχνευτές.



Οι τρόποι μέτρησης της σκέδασης του φωτός στους αιματολογικούς αναλυτές

Ο ένας **ανιχνευτής βρίσκεται πίσω από το κύτταρο και την γραμμή laser**. Αυτός ο ανιχνευτής μετράει το σκεδαζόμενο φως που προέρχεται από ολόκληρο τον όγκο του κυττάρου και κατά συνέπεια **προσδιορίζει το μέγεθος του κυττάρου**. Αυτή η σκέδαση ονομάζεται πρόσθια σκέδαση (FSC). Ο άλλος ανιχνευτής **βρίσκεται πλάγια ως προς την ακτίνα laser (SCC)** και το σκεδαζόμενο φως που φτάνει σε αυτόν οφείλεται στο

φως που απομακρύνθηκε από το αιμοσφαίριο λόγω των ανωμαλιών της κυτταρικής μεμβράνης. **Προσδιορίζει** δηλαδή το **περιεχόμενο του πρωτοπλάσματος του αιμοσφαιρίου**. Π.χ. εάν η κυτταρική μεμβράνη είναι αρκετά ανώμαλη λόγω της ύπαρξης στο πρωτόπλασμα πολλών κοκκίων όπως στο εωσινόφιλο, τότε η σκέδαση θα είναι εξαιρετικά μεγάλη προς την πλάγια διεύθυνση.

### Απορρόφηση φωτός

Μερικοί αιματολογικοί αναλυτές για την μέτρηση του λευκοκυτταρικού τύπου συνδυάζουν τις μετρήσεις της τάσης (RF και DC) όχι με την σκέδαση (FSC και SSC) αλλά με την μέτρηση της απορροφήσεως του φωτός από τα διάφορα συστατικά των κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει διάκριση ουδετερόφιλων και ηωσινόφιλων λευκοκυττάρων προσδιορίζοντας π.χ. με χρωματική αντίδραση τα κοκκία υπεροξειδάσης στο κυτταρόπλασμα τους.

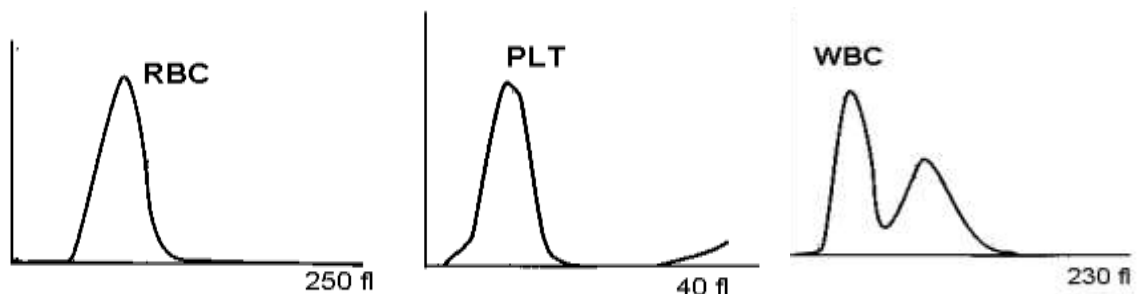
### Μέθοδοι απεικόνισης των αποτελεσμάτων στον αιματολογικό αναλυτή

#### Τα ιστογράμματα

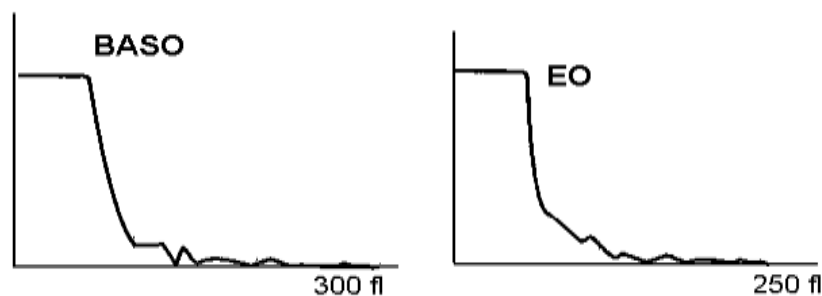
Από τα εκατοντάδες κύτταρα που μετρώνται ο αναλυτής κατασκευάζει διαγράμματα κατανομών συχνοτήτων τα οποία έχουν την μορφή ιστογράμματος. Στα διαγράμματα αυτά στον οριζόντιο άξονα βρίσκονται οι όγκοι των μετρηθέντων κυττάρων σε μονάδες fl. Στον κάθετο άξονα βρίσκεται η συχνότητα εμφάνισης των συγκεκριμένων όγκων δηλαδή πόσα κύτταρα είχαν κάποια μονάδα όγκου.

Αυτές οι κατανομές συχνοτήτων ή **ιστογράμματα** συνήθως έχουν το χαρακτηριστικό σχήμα μιας κωδωνοειδούς καμπύλης. Η κορυφή της καμπύλης αντιστοιχεί στο όγκο που διαθέτει η πλειοψηφία των αιμοσφαιρίων. Αν η κορυφή βρίσκεται στο κέντρο υπάρχει φυσιολογικός αριθμός και μορφολογία κυττάρων. Αν μετατοπίζεται προς τα αριστερά τότε τα κύτταρα είναι στην πλειοψηφία τους μικρότερα από τα φυσιολογικά (π.χ. μικροκυττάρωση). Αντίθετα αν η κορυφή βρίσκεται μετατοπισμένη προς τα δεξιά τότε τα κύτταρα είναι μεγαλύτερα του φυσιολογικού (π.χ. μακροκυττάρωση).

Σε κάθε ιστογράμμα υπάρχει επίσης το ανώτερο (UD) και το κατώτερο όριο διάκρισης (LD) δηλαδή ο μέγιστος και ο ελάχιστος όγκος που οριοθετούν ένα συγκεκριμένο είδος κυττάρου π.χ. ερυθρό, αιμοπετάλιο.



Τα συνηθέστερα ιστογράμματα των γενικών αίματος (ερυθρών, αιμοπεταλίων και λευκών).



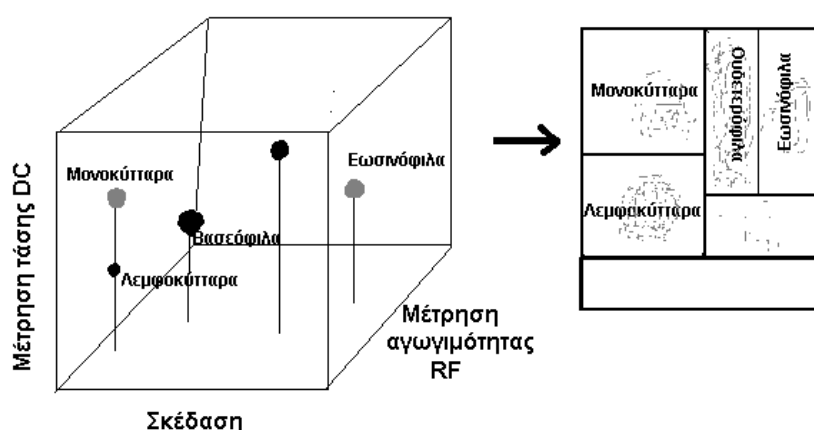
Ιστογράμματα βασεοφίλων και εωσινοφίλων.

Προσέξτε την διαφορά από τα προηγούμενα ιστογράμματα.

### Νεφελογράμματα

Μία σημαντική υπηρεσία που προσφέρουν οι αιματολογικοί αναλυτές στο προσωπικό του αιματολογικού εργαστηρίου είναι τα λεγόμενα νεφελογράμματα. Τα νεφελογράμματα είναι διαγράμματα όπου απεικονίζονται οι πληθυσμοί των κυττάρων που πέρασαν μέσα από την κυψελίδα ροής. Οι πληθυσμοί αυτοί παριστάνονται με την μορφή νεφελωμάτων αποτελούμενοι από χιλιάδες σημεία. Κάθε σημείο είναι ένα κύτταρο. Τα νεφελογράμματα μπορεί να είναι διαγράμματα δυσδιάστατα ή τρισδιάστατα. Στους δύο ή τρεις άξονες του διαγράμματος του νεφελογράμματος τοποθετούνται οι τιμές δύο ή τριών διαφορετικών φυσικών μεθόδων.

Τα νεφελογράμματα μας δίνουν χρήσιμες πληροφορίες για την παρουσία μη τυπικών μορφών κυττάρων π.χ. βλάστες. Αν υπάρχουν άτυπες μορφές τα νέφη των κυττάρων αλλάζουν θέση και μορφή και έτσι γίνεται αντιληπτή από τον χειριστή του αναλυτή και τον ιατρό η παρουσία τους.



Η παραγωγή νεφελογραμμάτων από την μέτρηση αιμοσφαιρίων με τρεις φυσικές μεθόδους ρεύμα DC, ρεύμα RF και σκέδαση



## Τρόποι προσδιορισμών των διαφόρων παραμέτρων του αίματος

### Μέτρηση αιματοκρίτη

Ο αιματοκρίτης (Hct) είναι το ποσοστό των ερυθροκυττάρων μέσα στο αίμα. Στους αιματολογικούς αναλυτές συναντάμε δύο τρόπους μέτρησης του.

#### 1<sup>ος</sup> τρόπος

Ο αναλυτής αναρροφά ορισμένο όγκο αίματος ( $V_t$ ) της τάξεως μl. Αυτό το δείγμα αίματος περνά μέσα από την κυψελίδα ροής όπου υπολογίζεται ο αριθμός των ερυθροκυττάρων (RBC) με το ρεύμα DC και στην συνέχεια αθροιστικά ο συνολικός όγκος αυτών ( $V$ ).

Η τιμή του αιματοκρίτη υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Hct} = \frac{V}{V_t} \times 100$$

Όπου  $V$ : συνολικός όγκος των ερυθροκυττάρων στο δείγμα αίματος

$V_t$ : όγκος του δείγματος αίματος

#### 2<sup>ος</sup> τρόπος

Υπολογίζεται από το ιστόγραμμα των ερυθρών ο μέσος όγκος ερυθρού (MCV). Στη συνέχεια ο αναλυτής υπολογίζει τον αιματοκρίτη από την ακόλουθη εξίσωση.

$$\text{MCV} = \frac{\text{Hct}}{\text{RBC}} \times 10 \Leftrightarrow \text{Hct} = \text{MCV} \times \text{RBC} \times 10$$

Η τιμή του αιματοκρίτη που υπολογίζεται στον αιματολογικό αναλυτή είναι ακριβέστερη από την τιμή του μικροαιματοκρίτη. Ο λόγος είναι ότι το τριχοειδές του μικροαιματοκρίτη περιέχει μέσα στη στιβάδα των ερυθρών και παγιδευμένο πλάσμα. Συνέπεια αυτού είναι **ο μικροαιματοκρίτης είναι αυξημένος περίπου κατά μία μονάδα από την πραγματική τιμή του αιματοκρίτη.**

### Μέτρηση αιμοσφαιρίνης

Παλαιότερα η αιμοσφαιρίνη (Hgb) μετρούνταν χειρονακτικά με το διάλυμα **Drapkin**. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζονταν και στους αυτόματους αναλυτές και ονομάζονταν **μέθοδος κυανομεθαιμοσφαιρίνης**. Σήμερα η χρήση της έχει εγκαταλειφθεί γιατί παράγει πολλά τοξικά απόβλητα και έχει μεγάλο χρόνο επώασης. Στην θέση της χρησιμοποιείται η μέθοδος **SLS** (Sodium Lauryl Sulfate).

Στην μέθοδο της SLS-Hb ειδικό απορρυπαντικό σπάει τις μεμβράνες των ερυθρών και απελευθερώνει την αιμοσφαιρίνη. Τα μόρια σφαιρίνης της αιμοσφαιρίνης που απελευθερώνονται αντιδρούν με τις υδρόφιλες αλκαλικές ομάδες του αντιδραστηρίου Sodium Lauryl Sulfate. Αυτό προκαλεί την μετατροπή του σιδήρου της αιμοσφαιρίνης από δισθενή σε τρισθενή και την παραγωγή μεθαιμοσφαιρίνης. Η μεθαιμοσφαιρίνη αντιδρά με το αντιδραστήριο Sodium Lauryl Sulfate και σχηματίζεται το μόριο **SLS-Hb**.

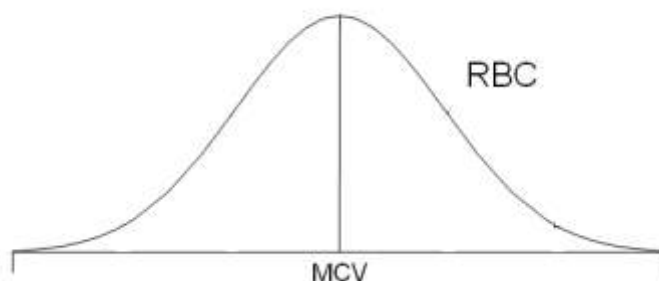
Το τελικό διάλυμα είναι το SLS-Hb και φωτομετρείται στα 540 nm. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης προσδιορίζεται με τον γνωστό νόμο του **Lamber-Beer**.

### Προσδιορισμός των γνωστών ερυθροκυτταρικών δεικτών

Εφόσον ο αιματολογικός αναλυτής μετράει αριθμό ερυθροκυττάρων (RBC), αιματοκρίτη (Hct), και αιμοσφαιρίνης HgB μπορούμε να υπολογίσουμε όλους τους γνωστούς ερυθροκυτταρικούς δείκτες: MCV (**μέσος όγκος ερυθρών**), MCH (**μέση περιεκτικότητα αιμοσφαιρίνης ανά ερυθροκύτταρο**), MCHC (**μέση συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης**).

Ο δείκτης MCV υπολογίζεται είτε:

A. Από το ιστόγραμμα των ερυθρών, όπου το MCV ισούνται με το κέντρο της κατανομής.



Υπολογισμός του MCV από το ιστόγραμμα κατανομής του RBC. Το MCV ισούνται με το κέντρο της κατανομής.

B. Από τον τύπο: 
$$MCV = \frac{Hct (\%)}{RBC (x10^6/ml)} \times 10$$

Σε αυτή την περίπτωση ο αιματοκρίτης έχει υπολογιστεί από την σχέση:  $Hct = V/Vt \times 100$ . Η τιμή του MCV υποδηλώνει αν υπάρχει μικροκυττάρωση ή μεγαλοκυττάρωση.

Οι δείκτες MCH και MCHC υπολογίζονται από τους ακόλουθους τύπους:

$$MCH = \frac{HgB (g/dl)}{RBC (x10^6/ml)} \times 10 \qquad MCHC = \frac{HgB (g/dl)}{Hct (\%)} \times 100$$

Τα MCH και MCHC δείχνουν αν υπάρχει υποχρωμία ή υπερχρωμία.

### Νέοι ερυθροκυτταρικοί και αιμοπεταλιακοί δείκτες

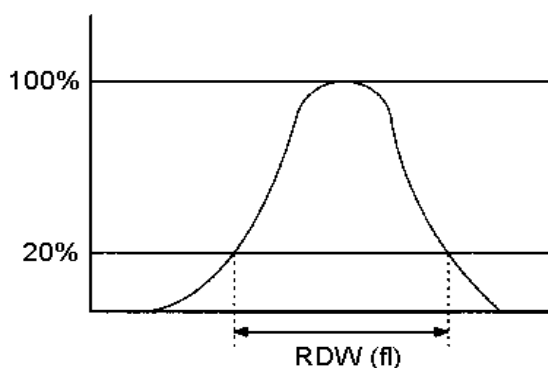
Εκτός από τους κλασικούς δείκτες της γενικής αίματος οι σύγχρονοι αιματολογικοί αναλυτές μπορούν να προσδιορίσουν και πλήθος νέων δεικτών που μπορούν να μας δώσουν μια πολύ καλύτερη εικόνα του μεγέθους, του σχήματος και των αλλοιώσεων των κυττάρων του αίματος. Τέτοιοι είναι οι RDW (μέση κατανομή ερυθροκυττάρων), MPV (μέσος όγκος αιμοπεταλίων) κ.α. Όλοι οι καινούργιοι δείκτες υπολογίζονται με μαθηματικούς υπολογισμούς από τα ιστογράμματα κατανομής.

### Δείκτες της κατανομής του μεγέθους των ερυθροκυττάρων

Κατά τη μέτρηση των ερυθροκυττάρων ο αναλυτής χρησιμοποιεί στις μετρήσεις του όλα τα σωματίδια των οποίων το μέγεθος είναι μεταξύ του κατώτερου και ανώτερου ορίου διάκρισης των ερυθροκυττάρων. Τα κύτταρα αυτά θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του δείκτη RDW. Ο δείκτης RDW προσδιορίζει την **ποικιλότητα του μεγέθους των ερυθροκυττάρων** δηλαδή την **ανισοκυττάρωση και την ποικιλοκυττάρωση**. Το RDW είτε μόνο του, είτε σε συνδυασμό με το MCV παρέχει σημαντικές κλινικές πληροφορίες για την ταξινόμηση των αναιμιών ή την ανταπόκριση του οργανισμού σε θεραπεία από σιδηροπενική ή μεγαλοβλαστική αναιμία.

Υπάρχουν δύο δείκτες RDW: οι RDW-SD και RDW-CV. Και οι δύο προσδιορίζονται από την κατανομή στο ιστόγραμμα των ερυθρών. Αν το ιστόγραμμα ξεφεύγει από την κανονική κατανομή τότε οι δύο δείκτες RDW-SD και RDW-CV παίρνουν παθολογικές τιμές.

Για τον προσδιορισμό του δείκτη **RDW-SD (εύρος κατανομής ερυθροκυττάρων)** υπολογίζεται το εμβαδό του 20% της κατανομής των ερυθρών. Η προϋπόθεση είναι ότι η κορυφή της κατανομής περιέχει το 100% του συνόλου τους. Οι μονάδες του δείκτη RDW-SD είναι τα fl.

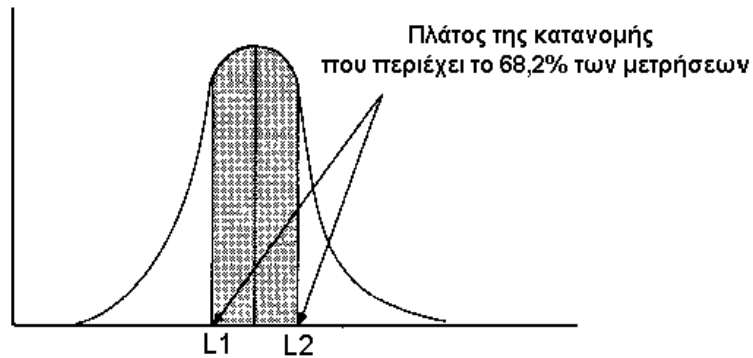


Προσδιορισμός του δείκτη RDW-SD

Ο δείκτης **RDW-CV (συντελεστής διακύμανσης του δείκτη RDW)** χρησιμοποιεί για τον υπολογισμό του το εύρος της κατανομής του RBC το οποίο περιέχει το 68,2% των μετρήσεων. Για τον υπολογισμό του χρησιμοποιείται ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{RDW - CV(\%)} = \frac{\text{SD}}{\text{MCV}} \times 100 = \frac{\text{L2} - \text{L1}}{\text{L2} + \text{L1}} \times 100$$

Μονάδες μέτρησης είναι η αναλογία επί τοις εκατό %.



Προσδιορισμός του δείκτη RDW-CV (από το γραμμοσκιασμένο εμβαδό)

### Δείκτες κατανομής του μεγέθους των αιμοπεταλίων

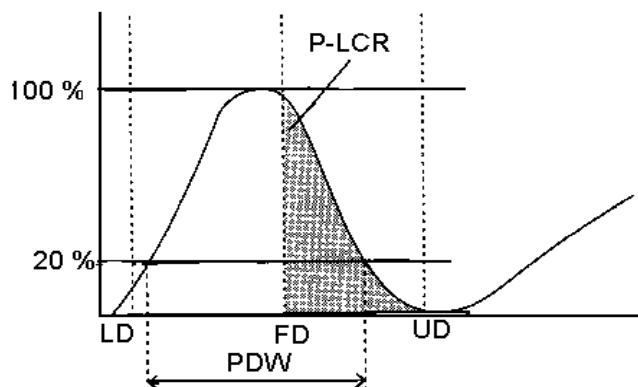
Παρόμοια με τα ερυθροκύτταρα ο αιματολογικός αναλυτής υπολογίζει για τα αιμοπετάλια τρεις ειδικούς δείκτες που ονομάζονται **αιμοπεταλιακοί δείκτες**. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιεί τρία διακριτικά όρια: το ανώτερο (UD), το κατώτερο (LD) και το σταθερό όριο (FD). Οι τρεις αιμοπεταλιακοί δείκτες μας πληροφορούν για το μέγεθος και την ποικιλότητα των αιμοπεταλίων.

- A. δείκτης **PCT (αιμοπεταλιακός δείκτης)** είναι το αντίστοιχο του αιματοκρίτη. Είναι δηλαδή το ποσοστό των αιμοπεταλίων μέσα στο αίμα. Υπολογίζεται από το ιστόγραμμα των αιμοπεταλίων σύμφωνα με τον τύπο  $Hct = V/Vt * 100$ . Το V είναι ο συνολικός όγκος των αιμοπεταλίων και Vt ο όγκος του δείγματος που απορροφήθηκε από τον αναλυτή.
- B. Ο δείκτης **PDW (εύρος κατανομής αιμοπεταλίων)** προσδιορίζεται με παρόμοιο τρόπο με τον δείκτη RDW-SD. Αποτελεί το εμβαδόν της κατανομής που περικλείει το 20% αυτής (όταν η κορυφή περιέχει το 100%). Μετριέται σε μονάδες fl.
- C. Ο δείκτης **MPV (μέσος όγκος αιμοπεταλίων)** υπολογίζεται από τον παρακάτω τύπο:

$$MPV = \frac{PCT (\%)}{PLT (x10^3 / \mu ml)} \times 1000$$

Οι μονάδες μέτρησης του δείκτη MPV είναι τα fl.

- D. δείκτης **P-LCR (αναλογία μεγάλων αιμοπεταλίων)** είναι η αναλογία των μεγάλων αιμοπεταλίων που βρίσκονται μεταξύ των ορίων FD και UD. Υπολογίζεται διαιρώντας τον αριθμό των κυττάρων που κατανέμονται μεταξύ των ορίων FD και UD με τον αριθμό των κυττάρων που κατανέμονται ανάμεσα στα όρια LD και UD. Μονάδα μέτρησης είναι η επί τοις εκατό αναλογία (%).



Ο προσδιορισμός PDW και P-LCR

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι φυσιολογικές τιμές για όλους τους ερυθροκυτταρικούς και αιμοπεταλιακούς δείκτες που προαναφέρθηκαν.

Δείκτης	Εύρος τιμών	Μονάδες
<b>MCV</b>	86 - 110	fl
<b>MCH</b>	26 - 38	pg
<b>MCHC</b>	31 - 37	g/dl
<b>RDW-SD</b>	37 - 54	fl
<b>RDW-CV</b>	11 - 16	%
<b>PDW</b>	9 - 17	fl
<b>MPV</b>	9 - 13	fl
<b>P-LCR</b>	13 - 43	%

### Μέτρηση δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ)

Η μέτρηση των δικτυοερυθροκυττάρων (ΔΕΚ) στους σύγχρονους αιματολογικούς αναλυτές γίνεται με διάφορους τρόπους:

1. Με **φθοριόχρωμα** (πολυμεθίνη) που συνδέεται με το rRNA και μετριέται η ένταση του φθορισμού (εταιρεία Sysmex).
2. Με την χρωστική **κυανού του μεθυλενίου** το οποίο προκαλεί καθίζηση του δικτύου rRNA. Η χρωστική αυτή βάφει αποκλειστικά το πρωτοπλασματικό RNA των δικτυοερυθροκυττάρων. Κατόπιν προστίθεται ειδικό υποτονικό αντιδραστήριο το οποίο αφενός σπάει τα ερυθρά και αφετέρου απομακρύνει την απελευθερωθείσα αιμοσφαιρίνη και την περίσσεια της χρωστικής μπλε του μεθυλενίου. Ακολουθώς τα κύτταρα ΔΕΚ μετρώνται από τον αναλυτή με την μέθοδο της σκέδασης και της μεταβολής τάσης ρεύματος DC (εταιρεία Beckman-Coulter).

3. Με **κυτταροχημική χρώση του RNA** με οξαζίνη 750 και συνδυασμό απορρόφησης και σκεδαστικών δεδομένων σε δύο γωνίες (Sysmex, Bayer-Techicon H3, Advia).

Οι αιματολογικοί αναλυτές εκτός από τον απόλυτο αριθμό των δικτυοερυθροκυττάρων υπολογίζουν και μια σειρά δικτυοερυθροκυτταρικών δεικτών οι οποίοι ονομάζονται **δείκτες ωρίμανσης ΔΕΚ**. Οι δείκτες αυτοί είναι οι LFR, MFR, HFR και IFR. Παρέχουν πρόσθετη πληροφόρηση για την διαδικασία ερυθροποίησης και βοηθάει στην παρακολούθηση της χημειοθεραπείας και της πορείας μεταμόσχευσης μυελού των οστών καθώς και στην διάγνωση και θεραπεία αναιμιών και νεφρικών νόσων.

### Στρώσιμο επιχρίσματος

Στους σύγχρονους αιματολογικούς αναλυτές υπάρχει η δυνατότητα αυτόματης επίστρωσης επιχρίσματος αίματος. Το πάχος του επιχρίσματος ρυθμίζεται αυτόματα από τον αναλυτή με βάση την τιμή του αιματοκρίτη.

Τα επιχρίσματα βάζονται επίσης αυτόματα με χρώση May Grunwald/Giemsa ή οποιαδήποτε άλλη χρώση επιθυμεί ο χρήστης.

### Παράγοντες που επηρεάζουν την λειτουργία των αιματολογικών αναλυτών

**Θερμοκρασία.** Υψηλές θερμοκρασίες επηρεάζουν τις ηλεκτρικές ιδιότητες του διαλύτη μέσα στον οποίο αραιώνονται τα αιμοσφαίρια για να περάσουν μέσω της κυψελίδας ροής. Συγκεκριμένα η υψηλή θερμοκρασία (>30°C) αυξάνει την κινητική ενέργεια των ιόντων του διαλύτη με αποτέλεσμα η διαφορά τάσης μεταξύ διαλύτη και κυττάρου να μειώνεται και τα κύτταρα να προσδιορίζονται μικρότερα. Το αντίθετο συμβαίνει σε χαμηλή θερμοκρασία (< 16 °C). Για τον λόγο αυτό οι αιματολογικοί αναλυτές διαθέτουν θερμόμετρο για τον συνεχή έλεγχο της θερμοκρασίας. Αν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος ξεπεράσει τα όρια: 16 - 30 °C η λειτουργία του αναλυτή διακόπτεται αυτομάτως και εμφανίζεται σχετικό μήνυμα στην οθόνη του αναλυτή.

**Αντιπηκτικό.** Το αίμα που μετριέται στον αιματολογικό αναλυτή πρέπει να συντηρείται σε αντιπηκτικό EDTA. Τα αντιπηκτικά EDTA δεσμεύουν τα ιόντα  $Ca^{+2}$  του αίματος εμποδίζοντας την πήξη. Συστήνονται τα αντιπηκτικά  $K_3EDTA$ ,  $K_2EDTA$ ,  $Na_2EDTA$ .

**Ανάδευση.** Το αίμα δεν πρέπει να μετριέται αμέσως στον αναλυτή. Πρέπει να μεσολαβήσουν τουλάχιστον **20 λεπτά ήπιας ανάδευσης** του αίματος με το αντιπηκτικό μέσα στο φιαλίδιο αιμοληψίας. Η ανάδευση μπορεί να γίνει με το χέρι ή ακόμα χρησιμοποιώντας ειδικούς αναδευτές φιαλιδίων γενικής αίματος. Πολλοί αναλυτές έχουν την δυνατότητα αυτόματης ανάδευσης του αίματος πριν από την μέτρηση. Αν δεν γίνει καλή ανάδευση του αίματος ή αν δεν τηρηθεί η αναλογία αίματος-αντιπηκτικού δημιουργούνται μικρά ή μεγάλα πηγμάτα μέσα στο δείγμα. Δημιουργούνται έτσι συσσωματώματα αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα να δίνει ο αναλυτής ψευδώς χαμηλές τιμές αιμοπεταλίων. Από την άλλη μεριά τα συσσωματώματα αιμοπεταλίων μπορεί να «περάσουν» ως λευκά ή ερυθρά δίνοντας αντίστοιχα ψευδώς υψηλές τιμές RBC, WBC.

**Λιπαιμικό αίμα.** Το λιπαιμικό αίμα μπορεί να επηρεάσει την μέτρηση της αιμοσφαιρίνης η οποία υπολογίζεται με φωτομετρική μέθοδο (βλ. προαναλυτικά σφάλματα).

**Τεμαχίδια κυττάρων, άωρες μορφές.** Ο Η/Υ του αναλυτή προσδιορίζει το είδος του κυττάρου που περνά μέσα από την κυψελίδα ροής αξιολογώντας τα δεδομένα της μεταβολής της τάσης, αγωγιμότητας, σκέδασης και πιθανόν και άλλων παραμέτρων. Είναι δυνατόν όμως να περάσουν μέσα από την κυψελίδα ροής μη τυπικές μορφές κυττάρων οδηγώντας τον Η/Υ σε εσφαλμένα συμπεράσματα για το είδος του κυττάρου.

Παρακάτω δίνονται περιληπτικά τα προβλήματα μπορεί να συναντήσει ο αναλυτής στον προσδιορισμό διαφόρων πληθυσμών κυττάρων.

**Μέτρηση λευκών.** Πριν την μέτρηση των λευκών προηγείται η λύση των ερυθρών με κατάλληλο λυτικό διάλυμα. Αν το λυτικό διάλυμα έχει αλλοιωθεί, η θραύση των ερυθρών δεν θα είναι τέλεια με αποτέλεσμα ο αναλυτής να μετρήσει κάποια ερυθρά ως λευκά.

**Μέτρηση ερυθρών.** Εσφαλμένη μέτρηση ερυθρών μπορεί να προκληθεί από μεγάλο αριθμό λευκών, υψηλή συγκέντρωση μεγάλων αιμοπεταλίων, συγκολλημένων ερυθρών και γενικά κυττάρων μικρότερων των 36 fl.

**Μέτρηση αιμοπεταλίων.** Εσφαλμένη αυξημένη μέτρηση αιμοπεταλίων μπορεί να προκληθεί από την παρουσία στο αίμα πολύ μικρών ερυθρών. Ψευδώς μειωμένες τιμές αιμοπεταλίων υπολογίζονται μετά από προβληματική αιμοληψία όπου λόγω της μερικής πήξης του αίματος τα αιμοπετάλια συκολλούνται και ο τελικός τους αριθμός υπολογίζεται στον αναλυτή μικρότερος.

## Η βαθμονόμηση των αιματολογικών αναλυτών

Οι αιματολογικοί αναλυτές βαθμονομούνται με διαφορετικό τρόπο από τους βιοχημικούς ή ανοσοχημικούς αναλυτές. Υπάρχουν τρεις τρόποι βαθμονόμησης.

Η βαθμονόμηση του αναλυτή για τον προσδιορισμό των κυττάρων γίνεται κυρίως με ειδικό **γαλάκτωμα** το οποίο περιέχει σφαιρίδια ίδιου όγκου με τα κύτταρα του αίματος. Τα σφαιρίδια αυτά όταν περάσουν μέσα από την κυψελίδα ροής προκαλούν μεταβολή τάσης. Ο αναλυτής αντιστοιχεί κάθε σφαιρίδιο του γαλακτώματος με συγκεκριμένη αιμοσφαίριο.

Δεύτερος τρόπος είναι η χρήση των **controls του αναλυτή**. Ο χρήστης τρέχει τα control του αναλυτή 3-4 φορές και αφήνει τον αναλυτή να υπολογίσει την μέση τιμή των παραμέτρων του. Δεδομένου ότι τα controls έχουν συγκεκριμένες τιμές, ο αναλυτής υπολογίζει τις αποκλίσεις των μέσων τιμών από τις τιμές των controls. Με βάση την απόκλιση αυτή αυξάνει ή μειώνει την τιμή ενός **φάκτορα** ο οποίος με την σειρά του θα πολλαπλασιαστεί με τις τιμές των ασθενών και θα τις αυξήσει ή θα τις μειώσει.

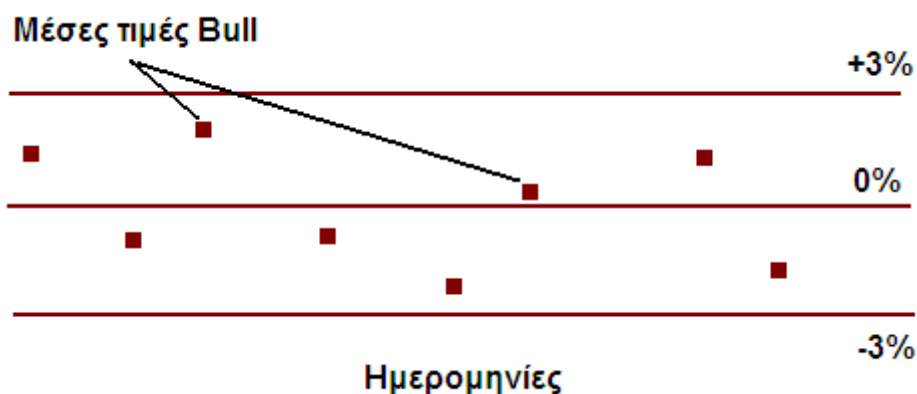
Τέλος μπορεί ο **χρήστης να ανεβάσει ή να κατεβάσει** απλά την τιμή του φάκτορα ανάλογα από την απόκλιση των τιμών των control του από την τιμή στόχο τους.

## Ο έλεγχος ποιότητας των αιματολογικών αναλυτών

Ο έλεγχος ποιότητας των αιματολογικών αναλυτών γίνεται είτε με controls είτε με δείγματα ασθενών.

Τα controls που χρησιμοποιούνται στους αιματολογικούς αναλυτές είναι **μονιμοποιημένο αίμα** δηλαδή αιμοσφαίρια που έχουν υποστεί ειδική κατεργασία με συντηρητικά ώστε να διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα (περίπου 20 μέρες) σε συνθήκες ψύξης. Τρία επίπεδα controls χρησιμοποιούνται: χαμηλό, μεσαίο και υψηλό. Οι τιμές τους μελετώνται σε διαγράμματα ελέγχου για την ανίχνευση τυχαίων και συστηματικών σφαλμάτων.

Ο δεύτερος τρόπος ελέγχου ποιότητας στους αιματολογικούς αναλυτές αξιοποιεί τις τιμές των ασθενών. Σημαντικότερη τέτοια μέθοδος είναι ο **αλγόριθμος του Bull**. Σύμφωνα με αυτόν επειδή οι τρεις ερυθροκυτταρικοί δείκτες (MCV, MCH, MCHC) έχουν πολύ μικρή μεταβλητότητα στους ανθρώπινους πληθυσμούς μπορούν οι μέσες τιμές να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση συστηματικών σφαλμάτων στην αιμοσφαιρίνη, στον αιματοκρίτη και στον αριθμό των ερυθρών. Ο αλγόριθμος του Bull προτείνει να συγκρίνονται κάθε φορά οι μέσες τιμές MCV, MCH, MCHC είκοσι ασθενών μόνο που μεταξύ αυτών θα βρίσκεται και η μέση τιμή της προηγούμενης εικοσάδας. Η διαδικασία αυτή όπου μέσα στην εικοσάδα συμπεριλαμβάνεται και η μέση τιμή της προηγούμενης εικοσάδας ονομάζεται **κινητός μέσος** και χρησιμοποιείται ευρέως στους αιματολογικούς αναλυτές για την ανίχνευση **συστηματικών σφαλμάτων**.



Η μορφή του διαγράμματος Bull



**Αγγλοελληνικό λεξιλόγιο αιματολογικών αναλυτών**

Main unit	Κεντρική μονάδα
Bar code	Γραμμωτός κώδικας
Bar Code reader	Αναγνώστης γραμμωτού κώδικα
Calibrators	Βαθμονομητές
Conductivity	Αγωγιμότητα
Controls	Δείγματα ελέγχου
Data Management System ή DMS	Σύστημα διαχείρισης ασθενών
Diluter	Αραιωτής
Direct current – DC	Ρεύμα σταθερής τάσης
Discrimination level	Επίπεδο διάκρισης
Dyes	Χρωστικές
Electronic power supply	Τροφοδοσία ρεύματος
Factor	Φάκτορας
Fixed Discriminator – FD	Σταθερό διακριτικό όριο
Forward scatter – FSC	Πρόσθια σκέδαση
Hematocrit – Hct	Αιματοκρίτης
Hemoglobin – Hgb	Αιμοσφαιρίνη
Immature Reticulate Fraction – IFR	Κλάσμα ανώριμων ερυθροκυττάρων
Lower Discriminator Limit – LD	Κατώτερο όριο διάκρισης
Lyser reagents	Λυτικά αντιδραστήρια
Mean Platelet Volume – MPV	Μέσος όγκος αιμοπεταλίων
Platelet Distribution Width – PDW	Εύρος κατανομής αιμοπεταλίων
Platelocrit – PCT	Αιμαπεταλιοκρίτης
Pneumatic Power Supply	Σύστημα δημιουργίας κενού
Radio Frequency – RF	Εναλλασσόμενο ρεύμα
Red Distribution Width – RDW	Μέση κατανομή ερυθρών
Reticulate cells – RET	Δικτυοερυθροκύτταρα
Sample Handler	Σύστημα αναρρόφησης δειγμάτων
Scatter diagrams	Νεφελογράμματα
Side scatter – SSC	Πλάγια σκέδαση
Upper Discriminator Limit – UD	Ανώτερο όριο διάκρισης

