



СПРАВОЧНИК ЗАВЕДУЮЩЕГО КДЛ



Внесен в Российский индекс
научного цитирования (РИНЦ)

№ 10 • октябрь
2016

Организация и управление работой КДЛ

Оснащение современной лаборатории

Новые методики исследований

Санэпидрежим в лаборатории

Нормативные документы

Охрана труда в КДЛ



Ретикулоциты в дифференциальной диагностике анемии и мониторинге эффективности терапии

К.Е. Широких

аспирант кафедры молекулярной фармакологии и радиобиологии
им. академика П.В. Сергеева,

М.О. Егорова

д-р мед. наук, проф. кафедры клинической лабораторной диагностики

ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский
университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России,

М.Е. Почтарь

канд. мед. наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики

ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного
образования» Минздрава России, г. Москва

В обзоре представлена история становления автоматизированного подсчета клеток крови и оценки количества и морфологии ретикулоцитов, приведены основные характеристики исследования ретикулоцитов в автоматическом режиме, представлены результаты развернутой гемограммы с анализом количественных и морфологических характеристик ретикулоцитов при различных патологических состояниях.

Лабораторная диагностика в клинической практике имеет неоспоримое значение для верификации диагноза и оценки эффективности проводимой терапии. При этом между руководством лечебно-профилактической организации и лаборатории всегда существует спор по поводу необходимости внедрения новых методов и целесообразности приобретения

современного оборудования. Ограниченный бюджет часто не позволяет руководству медицинской организации осуществить расширение возможностей клинической лабораторной диагностики.

Главным аргументом в пользу совершенствования лабораторной диагностики в любой клинике является расширение терапевтического окна, т. е. возможности выявления патологии до появления клинических признаков заболевания и, соответственно, своевременного начала терапии.

В 1990-х гг. автоматизированный гематологический анализатор был редкостью в России. Гематологическое исследование, как и биохимическое, выполнялось на полуавтоматических анализаторах, предполагающих автоматизацию только на последнем этапе, при оценке оптической плотности раствора.

В настоящее время гематологические анализаторы имеются почти в каждой лаборатории. Однако только в редких лабораториях они активно применяются в ежедневной работе для получения полноценной развернутой гемограммы.

Современные автоматические гематологические анализаторы позволяют из объема той же капли крови, что и при исследовании в ручном режиме, получить развернутую гемограмму, с оценкой количества эритроцитов, лейкоцитов (и популяций лейкоцитов), тромбоцитов, ретикулоцитов, морфологических особенностей каждой клетки, степени зрелости клеток и др. Важным наглядным представлением результата развернутой гемограммы являются гистограммы и скатерограммы, отражающие распределение клеток по размеру или иным характеристикам.

Одним из компонентов развернутого гематологического анализа крови является подсчет ретикулоцитов. Предшественники эритроцитов – ретикулоциты составляют в норме небольшой процент в гемограмме, но являются важным компонентом дифференциальной диагностики анемий, миелодиспластического синдрома, критерием эффективности терапии.

Исследование ретикулоцитов в ручном режиме требует взятия порции крови с последующей окраской, стабильность которой невысока. Кроме того, микроскопическое исследова-

ние не позволяет оценить степень зрелости и насыщенность ретикулоцитов гемоглобином, что важно для контроля эффективности терапии.

Автоматизированный подсчет с анализом более 40 тыс. клеток образца крови обеспечивает достоверность результата и одновременно повышает информативность оценки абсолютного и относительного содержания ретикулоцитов в пробе крови.

Ретикулоциты. Описание и способы оценки

Функциональные характеристики

Каждую секунду в организме человека образуется около 2 млн новых эритроцитов, что обеспечивает их обновление до 1% ежедневно [22].

Современная схема гемопоэза представлена в 1973 г. А.И. Воробьевым и И.Л. Чертовым [10]. Согласно унитарной теории кроветворения все клетки крови происходят из полипотентной гемопоэтической стволовой клетки костного мозга плоских костей, у детей дополнительно – костного мозга эпифизов длинных трубчатых костей. В костном мозге полипотентная стволовая клетка крови дифференцируется в клетку-предшественницу миелопоэза, которая дифференцируется в бурстобразующую единицу эритропоэза (БОЕ-Э). БОЕ-Э, в свою очередь, дифференцируется в унипотентную клетку, чувствительную к эритропоэтину, – колониеобразующую единицу эритроцитов (КОЕ-Э). КОЕ-Э проходит несколько последовательных стадий деления и превращается в нормобласт, который теряет ядро и становится ретикулоцитом, готовым к выходу в кровоток [3]. Продукция ретикулоцитов в костном мозге составляет 3×10^3 клеток в сутки. Далее в течение одного-двух дней пребывания в системном кровотоке ретикулоциты созревают до эритроцитов, способных полноценно выполнять свои функции, важнейшая из которых – осуществление газообмена.

Ретикулоциты – клетки диаметром 7,7–8,5 мкм со средним объемом 101–128 фл. Название «ретикулоцит» (от лат. *reticulum* – сеточка и греч. *kύτος* – вместилище, клетка) обусловлено характерным зернисто-сетчатым узором в цито-

плазме данной клетки, образованным агрегированными рибосомами, митохондриями, остатками цитоплазматического ретикулула и других органелл [5]. Впервые ретикулоциты описал *Erb* в 1865 г. после обнаружения внутриклеточного ретикулула в клетках, похожих на эритроциты, при окраске мазка крови пикриновой кислотой. Чуть позже, в 1881 г., *Ehrlich* предложил метод суправитальной окраски для демонстрации внутриклеточной сети аналогичных клеток крови, которая была описана как «*substantia reticulo-filamentosa*». В 1891 г. *Smith* ввел понятие «ретикулоцит» – это незрелый эритроцит, содержащий в своей цитоплазме внутриклеточный ретикулум. Немецким терапевтом и ученым *Ludwig Heilmeyer* в 1932 г. была представлена классификация стадий созревания ретикулоцитов, а в 1953 г. *Seip* определил референтные интервалы содержания ретикулоцитов в зависимости от стадии зрелости (табл. 1). Развитие прикладных медицинских наук усовершенствовало подход к детекции ретикулоцитов, но не изменило его сути. В 1960 г. *Kosenov и Mai* предложили новый метод подсчета ретикулоцитов с использованием флуоресцентного красителя акридинового оранжевого, который связывается с нуклеиновыми кислотами. С 1983 г. активно используется методика автоматического подсчета ретикулоцитов с использованием метода проточной цитометрии и флуоресцентных зондов по способу, предложенному *Tanke* [6].

Дифференциация ретикулоцитов по стадиям зрелости

В 1986 г. Национальным комитетом по клиническим и лабораторным стандартам США (*National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS*) ретикулоцит был классифицирован как любая клетка красного кровяного ростка, лишенная ядра и содержащая минимум 2 частицы полирибосомальной РНК [18]. Европейский международный совет по стандартизации в гематологии (*International Council for Standardization in Haematology, ICSH*) также принял данное определение [24].

Зернисто-сетчатая субстанция в различных видах ретикулоцитов отличается полиморфизмом. В стандартно окрашенных эозином и метиленовым синим по Райту мазках периферической крови ретикулоциты визуализируются как

клетки серо-пурпурного цвета. Под действием более специфических красителей (новый метиленовый синий, бриллиантовый крезиловый синий) происходит преципитация РНК, и ретикулоциты приобретают вид полихроматофильных клеток серовато-розового цвета с характерным сетчатым (ретикулярным) узором, отсюда и название этих клеток [8]. Количество сетчатой субстанции в ретикулоцитах при созревании уменьшается [3]. В среднем объем ретикулоцита превышает объем эритроцита на 24–35%, а концентрация гемоглобина в ретикулоците ниже, что объясняет появление гипохромных макроцитов в периферической крови при состояниях, сопровождающихся ретикулоцитозом [6].

В 1932 г. *Heilmeyer* описал стадии созревания ретикулоцитов на основании микроскопического исследования мазка крови после суправитального окрашивания бриллиантовым голубым [3, 6, 9]. Ретикулоцит на стадии 0 описывается как клетка эритроидного ряда с очень густой ретикулофиламентозной сетью в центре клетки. У молодых ретикулоцитов на I стадии зрелости субстанция обильная и распространена по всей цитоплазме клетки. В более зрелых клетках (стадия II) ретикулум выявляется в виде разреженной сеточки, отдельных нитей и/или неплотно залегающих зерен. При дальнейшем созревании ретикулоцита (стадия III) в цитоплазме возможно отметить диффузно расположенный неоформленный ретикулум. На последней IV стадии созревания ретикулоцитов в цитоплазме клеток определяется лишь некоторое количество гранул [6].

Ввиду субъективности визуальной оценки гранул в ретикулоцитах данная классификация не нашла широкого практического применения, и для дифференциальной диагностики состояний зачастую используется лишь определение числа ретикулоцитов.

Стадии созревания ретикулоцитов зачастую определяются некорректно: ретикулоцит на I стадии созревания может быть описан как эритробласт, а на IV стадии принимается за зрелый эритроцит в связи с низким содержанием РНК в цитоплазме. Корректная детекция IV стадии созревания представляет особенный интерес, т. к. эти ретикулоциты по количественному содержанию в периферической крови являются доминирующими у условно здоровых лиц.

Содержание ретикулоцитов в периферической крови отражает скорость эритропоэза. Оптимально, когда более 90% присутствующих ретикулоцитов в периферическом кровотоке находятся на III–IV стадии созревания (табл. 1). При стимуляции эритропоэза будет наблюдаться появление более ранних форм ретикулоцитов (по аналогии с «левым сдвигом» в гранулопоэзе). Относительное содержание ретикулоцитов в периферической крови обуславливается клинической картиной, референтный интервал при ручном методе подсчета составляет от 0,5 до 1,5% у взрослых [2] и от 2 до 6% у новорожденных [2, 19]. Сравнение диапазонов референтных значений по сообщениям различных авторов представлено в статье Pivaetal [21].

Таблица 1

Стадии созревания и процентное соотношение ретикулоцитов у здоровых лиц [3, 6, 9, 26]

Стадии созревания ретикулоцитов по Heilmeyer	Морфологическое описание	Доля от общего числа ретикулоцитов по Seip, %
Стадия 0	Густая сеть в центре клетки	-
Стадия I	Обильная субстанция в цитоплазме	Менее 0,1
Стадия II	Неплотный ретикулум	7,0
Стадия III	Диффузный ретикулум	32,0
Стадия IV	Некоторое количество гранул	61,0

Количество ретикулоцитов в периферической крови является надежным показателем эритропоэтической активности костного мозга, данный показатель крайне необходим для оценки интенсивности кроветворения [6].

Показаниями к оценке содержания ретикулоцитов в периферической крови являются все типы анемии и мониторинг лекарственной терапии с использованием препаратов железа, витамина B12, фолиевой кислоты, рекомбинантного эритропоэтина и т. д. Также оценку количества и зрелости ретикулоцитов проводят у пациентов младенческого возраста, в качестве мониторинга после трансплантации костного мозга, для оценки восстановления эритропоэза после химио- и химиолучевой терапии. Таким образом, требуется надеж-

ный метод подсчета ретикулоцитов и определения стадии созревания клеток в периферической крови.

Оценка количества ретикулоцитов

Подсчет ретикулоцитов проводится в пробе периферической крови, взятой с помощью вакуумной системы в пробирку, содержащую в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Анализ необходимо провести не позднее 72 ч от момента взятия пробы. Не обнаружено достоверных различий при оценке содержания ретикулоцитов при различных температурных режимах хранения образца от 4 до 20°C [12]. Оценку качественного и количественного состава ретикулоцитов можно провести при микроскопии специально окрашенных мазков или с использованием автоматических гематологических анализаторов.

Методика ручного подсчета ретикулоцитов

Оценка количества и структуры цитоплазмы ретикулоцита, агрегированной РНК, становится возможной при суправитальной (без предварительной фиксации) окраске клеток бриллиантовым крезильным синим [9] с последующей микроскопией по алгоритму [1]:

1. Цельную кровь смешивают с суправитальным красителем в пробирке в соотношении 1 : 1, инкубируют 20–30 минут;
2. По окончании инкубации окрашенный образец крови наносится на предметное стекло и высушивается на воздухе;
3. Подсчет ретикулоцитов осуществляется при микроскопии окрашенного препарата в 1000-кратном увеличении с использованием иммерсионного масла.
4. Количество ретикулоцитов выражается в процентном отношении к общему числу эритроцитов.

Указанный метод довольно трудоемкий, недостаточно стандартизирован и отличается невысокой воспроизводимостью из-за невозможности адекватной оценки большого числа клеток. Причина сложности подсчета заключается в низком содержании ретикулоцитов относительно зрелых эритроцитов. Дополнительно стоит отметить, что для достижения статистической погрешности менее 5% (табл. 2)

в соответствии с рекомендациями ICSH 1998 г. необходима оценка по меньшей мере 40 тыс. клеток [17, 25], что является довольно трудоемкой процедурой при работе в ручном режиме и значительно уменьшает пропускную способность исследований врача клинической лабораторной диагностики, выполняющего микроскопию мазка.

Таблица 2

Уровень статистической погрешности определения числа ретикулоцитов при исследовании разного количества эритроцитов

Содержание ретикулоцитов в крови, %	Необходимое количество для достижения CV ≤ 5 %
1	39 600
2	19 600
5	7600
10	3600
20	1600
50	400

Коэффициент вариации при ручном методе подсчета ретикулоцитов, по данным разных авторов, составляет от 25 до 50% [16, 20, 23]. Помимо превышения допустимого коэффициента вариации, визуальная оценка морфологических параметров ретикулоцитов носит довольно субъективный характер из-за большого разнообразия клеточного пула ретикулоцитов и наличия промежуточных форм, а зачастую становится вовсе невозможным определение слабовыраженной зернисто-сетчатой структуры [15], что ведет к некорректному подсчету ретикулоцитов. Накопленные при ручном подсчете ошибки могут привести к неверному диагнозу и выбору некорректной терапии, т. к. оценка количества ретикулоцитов является ключевым параметром в динамическом мониторинге активности эритропоэза.

Учитывая недостатки ручного метода, в последнее время широкое распространение получили автоматизированные методы подсчета, открывающие новые перспективы в оценке состояния эритропоэза. Автоматизированный подсчет клеток экономит время персонала лаборатории на преаналитическом (окраска) и аналитическом (микроскопия) этапах,

снижает процент ошибок, уменьшает коэффициент вариации. Основными факторами, обеспечивающими валидность автоматического подсчета, являются анализ большого числа клеток (более 30 тыс.) и определение даже незначительного количества РНК-содержащих структур в клетках за счет чувствительной детекции. Наибольшей точностью автоматический подсчет обладает за счет комбинированного использования лазерных технологий и маркеров нуклеиновых кислот, таких как акридиновый оранжевый, полиметиновые или катионные красители. Также в автоматических гематологических счетчиках используются объективные пороговые значения для классификации клеток по степени зрелости, что обеспечивает высокую воспроизводимость результатов.

Современные гематологические анализаторы позволяют, помимо определения относительного (% RETIC) и абсолютного (# RETIC) содержания ретикулоцитов, получить характеристики клеток пула молодых форм эритроцитов, такие как: средний объем ретикулоцитов (MCVr), средняя концентрация гемоглобина в ретикулоцитах (CHCMr), среднее количество гемоглобина в ретикулоцитах (CHr), фракция незрелых ретикулоцитов (IRF).

Относительное содержание ретикулоцитов (% RETIC) может быть повышенным в двух ситуациях: либо при повышенном содержании ретикулоцитов, либо при сниженном содержании эритроцитов. Однако умеренное повышение относительного количества ретикулоцитов при тяжелой форме анемии не является показателем разрешения сложившейся анемии и не указывает на восстановление эритропоэтической функции костного мозга. Данное обстоятельство может свидетельствовать о сокращении продолжительности жизни зрелых эритроцитов в периферическом кровотоке. Также является необходимой оценка абсолютного содержания ретикулоцитов в периферической крови, т. к. данный показатель напрямую отражает эритропоэтическую способность костного мозга [6].

Например: содержание ретикулоцитов в количестве 20% в периферической крови считается повышенным. Тем не менее при тяжелой форме анемии с абсолютным содержанием эритроцитов порядка 2×10^6 кл/мкл абсолютное число ретикулоцитов составит 40×10^3 кл/мкл, что укладывается в пределы референтного диапазона.

Абсолютное количество ретикулоцитов (# RETIC) напрямую отражает скорость продукции эритроцитов в костном мозге, вследствие чего именно по этому параметру судят об активности эритропоэза. Ретикулоцитоз можно наблюдать при высокой активности эритропоэза при гемолитической анемии, постгеморрагической анемии, на фоне терапии препаратами витамина B12, B9 (фолиевая кислота) или эритропоэтина. После острого кровотечения ретикулопоэз в норме должен активироваться в течение 2–3 суток в ответ на потерю определенного количества эритроцитов и достичь пикового значения на 6–10-е сутки. Если активация эритропоэза не наблюдается, то можно сделать вывод о нарушении процесса эритропоэза в костном мозге. В случае же стимуляции эритропоэза и гиперпродукции предшественников эритроцитов в костном мозге в системном кровотоке будет наблюдаться появление более ранних форм ретикулоцитов, что приведет к резкому увеличению общего количества циркулирующих ретикулоцитов.

Сниженное абсолютное содержание ретикулоцитов возможно при неэффективном эритропоэзе, например, при апластической анемии, лейкозах, миелодиспластическом синдроме.

В зависимости от интенсивности включения красителя РНК в клетку ретикулоциты разделяются по степени зрелости на 3 популяции (рис. 1):

- ~ зрелые ретикулоциты с низкой абсорбцией L-RTC – кластер В;
- ~ незрелые ретикулоциты со средней абсорбцией М-RTC – кластер С;
- ~ незрелые ретикулоциты с высокой абсорбцией Н-RTC – кластер D.

Параметр IRF ($IRF = M-RTC + H-RTC$) некоторых гематологических анализаторов внедрен в практику в качестве ранней и чувствительной характеристики эритропоэза. Данный параметр нашел применение в дифференциальной диагностике анемий с высокой активностью эритропоэза (гемолитическая анемия, постгеморрагическая анемия), при которых будет наблюдаться увеличенная продукция ретикулоцитов, включая их незрелую фракцию и повышенное значение показателя IRF, и анемий с низкой активностью эритропоэза (апластическая анемия, миелодиспластический

синдром, анемия вследствие инфекционных заболеваний), при которых наблюдается сниженный показатель IRF. Увеличение фракции незрелых ретикулоцитов может свидетельствовать об ускоренном выбросе клеток из костного мозга как компенсаторной реакции в ответ на тканевую гипоксию. Низкие значения абсолютного количества ретикулоцитов и малое количество незрелых ретикулоцитов свидетельствуют о снижении скорости продукции эритроцитов в костном мозге (неэффективный эритропоэз), что наблюдается при апластической анемии, миелодиспластическом синдроме, дефиците витамина B12.

Другая область практического использования параметра IRF – мониторинг терапии анемий, ассоциированных с дефицитом железа, витамина B12 и витамина B9 (фолиевой кислоты). Повышение абсолютного количества незрелых ретикулоцитов (IRF) можно наблюдать за несколько дней до подъема общего числа ретикулоцитов (# RETIC) при выраженной анемии [11].

Референтные интервалы

Для преобразования относительного содержания ретикулоцитов в абсолютное необходимо воспользоваться простой формулой, где RET – ретикулоциты, RBC – эритроциты:

$$\frac{\text{RET} [\%] \times \text{RBC} [106 \text{ кл/мкл}]}{100} = \text{RET} [106 \text{ кл/мкл}].$$

Референтные интервалы относительного и абсолютного числа ретикулоцитов в периферической крови взрослых доноров в соответствии с *Cavill et al.* (1996 г.) [14] представлены в табл. 3.

Таблица 3

Референтные интервалы содержания ретикулоцитов при ручном методе подсчета

Относительное содержание	м/ж	0,43–1,36%
Абсолютное содержание	м	23,0–70,1 × 10 ³ кл/мкл
	ж	17,0–63,8 × 10 ³ кл/мкл

По данным других авторов, абсолютное содержание ретикулоцитов в периферической крови взрослых находится в пределах $30-70 \times 10^3$ кл/мкл [5, 7]. У детей же в норме относительное содержание ретикулоцитов – 20–60% [4].

Таблица 4

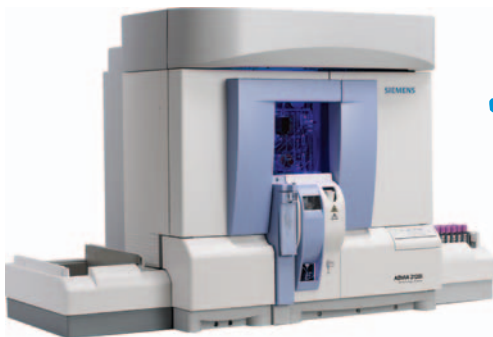
**Референтные интервалы содержания ретикулоцитов при
использовании гематологического анализатора Siemens ADVIA® 2120i
(по данным КДЛ ГКБ им. С.П. Боткина)**

Относительное содержание	м/ж	0,2–2,0%
Абсолютное содержание	м/ж	$22,0-139,0 \times 10^3$ кл/мкл

Необходимо помнить, что данные референтные интервалы можно использовать в качестве ориентировочных, но каждая лаборатория должна выработать собственные референтные интервалы с учетом обследуемой популяции пациентов.

Клиническая лабораторная диагностика сегодня претерпевает процесс централизации, направленный на сокращение затрат на оснащение многочисленных лечебных учреждений. Такой подход не должен ухудшить результат, предоставляемый врачу клинической практики для принятия решения о скорейшей помощи пациенту. Полнота картины лабораторного обследования зависит от многих факторов: сбора анамнеза, полноценной передачи информации с использованием медицинской и лабораторной систем, привлечения накопленных технических возможностей реализации лабораторного обследования. В том числе важно уделять внимание каждому компоненту результата развернутого гематологического анализа, получаемого из капли крови пациента в течение 3–5 минут. Представленные выше результаты развернутой гемограммы при различных заболеваниях демонстрируют актуальность оценки не только стандартной «тройки» гематологических тестов, но и информативности контроля количества и морфологии ретикулоцитов.

(Продолжение следует)



✓ **ДВОЙНОЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА –
исследование каждой пробы
двумя независимыми методами**

Автоматизация исследования:

- загрузка до 150 пробирок на борт;
- выбор необходимых профилей исследования CBC, 5DIFF, Ret;
- автоподсчет ретикулоцитов и их субпопуляций

Характеристики прибора:

- производительность 120 тестов/час;
- объём пробы в любом режиме – 175 мкл;
- скрининговая диагностика и анализ редких форм заболеваний крови (45 параметров исследования);
- 3 режима работы: ручная подача с открытой/закрытой пробиркой, автоподача;
- свыше 30 морфологических флагов для правильной постановки диагноза;
- широкий спектр используемых биоматериалов (венозная/капиллярная кровь; спинномозговая, плевральная, перитонеальная, суставная жидкости);
- автоматическая система окраски мазков при использовании станции Autoslide

