

## Автоматизированный подсчет ретикулоцитов в мазках периферической крови

### Аннотация

Представлены результаты использования модуля Vision Hema® Reticulocytes (Vision Hema® RET) для подсчета количества ретикулоцитов в сравнении с ручным способом. Проанализированы образцы крови с высоким ретикулоцитозом – основная группа ( $n = 15$ ) – и образцы с нормальным содержанием клеток – группа сравнения ( $n = 15$ ). Использование сканер-анализатора сократило время подсчета ретикулоцитов в образцах основной группы на 90,5 % [с  $(202,3 \pm 44,7)$  до  $(106,3 \pm 18,3)$  с], а для образцов группы сравнения – на 56 % [с  $(155,1 \pm 38,0)$  до  $(99,9 \pm 16,8)$  с]. Результаты подсчета ретикулоцитов с применением модуля Vision Hema® RET не отличались от данных световой микроскопии как в основной группе ( $p = 0,211$ ), так и в группе сравнения ( $p = 0,53$ ). Коэффициент корреляции Спирмена составил  $R = 0,977$ . Результаты оценки коэффициента вариации внутрисерийной воспроизводимости ( $CV_{bc}$ ) свидетельствовали о более высокой воспроизводимости подсчета ретикулоцитов на приборе в сравнении с ручным способом как при нормальном ретикулоцитозе ( $CV_{bc} = 9,45\%$  против  $CV_{bc} = 20,5\%$ ), так и при высоком содержании ретикулоцитов ( $CV_{bc} = 4,43\%$  против  $CV_{bc} = 8,63\%$ ). Применение модуля Vision Hema® RET рекомендуется для использования в практике клинико-диагностических лабораторий.

Ретикулоциты – молодые эритроциты, образующиеся в костном мозге из оксифильных нормобластов. После удаления ядра оксифильный нормобласт превращается в ретикулоцит, который за 4 дня дозревает до зрелого эритроцита. В костном мозге ретикулоциты находятся 1...1,5 дня, а в периферической крови – 2...3 дня [1], [2]. Оценку количества ретикулоцитов используют при самых различных заболеваниях, а также выполняют при проведении профилактических и периодических медицинских осмотров здоровых людей [1]-[4].

Для подсчета ретикулоцитов используют различные технологии. Традиционным методом оценки содержания ретикулоцитов в периферической крови является метод подсчета ретикулоцитов в мазках периферической крови, приготовленных из прижизненно (суправитально) окрашенных образцов крови. По этой технологии жидкую кровь смешивают с раствором красителя, инкубируют и из смеси крови и краски готовят мазок, который подвергают исследованию под световым микроскопом [4], [5]. Альтернативным подходом является определение ретикулоцитов путем подсчета на гематологическом анализаторе [1]. По этой технологии клетки крови вначале смешивают с флуоресцентным красителем, связывающимся с нуклеиновыми кислотами, а затем анализируют в измерительном канале прибора при освещении лучом лазера. Идентификация клеток осуществляется после компьютерной обработки показателей преломления лучей лазера и оценки флуоресцентного сигнала. Каждая из технологий имеет свои преимущества и недостатки [6].

В Российской Федерации большее распространение получил традиционный метод подсчета ретикулоцитов в окрашенном мазке крови. Современной тенденцией его развития стали автоматизация и компьютеризация исследования, в том числе с использованием технологии искусственного интеллекта, основанного на создании компьютерных нейронных сетей [6]-[9]. Подобные методики разработаны и эффективно функционируют в различных сферах деятельности человека, в том числе при выполнении общего анализа крови [9]-[11]. Следует учесть, что при оценке подобных приборов и технологий в качестве эталонного метода, с которым сравниваются результаты разрабатываемых приборов, в том числе гематологических анализаторов, приняты результаты световой микроскопии препаратов, выполненной опытным специалистом [12].

В литературе имеется ограниченное количество публикаций, представляющих результаты сравнительной оценки технологии подсчета ретикулоцитов в окрашенном мазке крови ручным методом и при использовании сканер-анализаторов мазков крови [8]. В связи с этим дальнейшее исследование различных технологий подсчета ретикулоцитов в мазках крови представляет определенный интерес.

**Цель исследования** – изучить сравнительную эффективность ручного и автоматического способов подсчета числа ретикулоцитов в мазке периферической крови.

### Материалы и методы

Подсчет числа ретикулоцитов выполняли в образцах периферической крови, окрашенных суправитально бриллиантовым крезиловым синим [4]. Использовали образцы ЭДТА стабилизированной крови, оставшиеся после выполнения общего анализа крови. Основную группу составили образцы крови ( $n = 15$ ) с высоким ретикулоцитозом ( $> 5\%$ ), которые включали в себя образцы крови новорожденных ( $n = 6$ ) и больных гемолитическими анемиями ( $n = 9$ ). Группу сравнения составили пациенты ( $n = 15$ ), проходившие периодический профессиональный осмотр, ОАК которых характеризовались нормальными результатами.

Из каждого образца крови после смешивания и инкубации с раствором красителя готовили два мазка [13], один из которых передавали сотрудникам лаборатории для анализа традиционным способом ручной микроскопии, а второй исследовали на сканер-анализаторе мазков крови Vision Hema® Pro с применением модуля Vision Hema® RET («West Medica», Россия-Австрия). Указанный модуль представляет собой специализированную компьютерную программу для сканер-анализаторов Vision Hema®, предназначенную для распознавания ретикулоцитов и эритроцитов и их автоматического подсчета. Также автоматически рассчитывается ряд показателей, характеризующих данные клетки крови.

Сравнивали время, затраченное на подсчет ретикулоцитов ручным и автоматическим способами, а также правильность и воспроизводимость подсчета ретикулоцитов. За эталонный метод правильного распознавания ретикулоцитов принимали результаты световой микроскопии, выполненной квалифицированным сотрудником лаборатории, что соответствует стандарту оценки подобных приборов [12]. Для оценки внутрисерийной воспроизводимости в мазках двух пациентов (одного из основной группы и одного из группы сравнения) ретикулоциты по 10 раз подсчитывали автоматическим и ручным методами [13].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ STATISTICA v. 7 («StatSoft Inc.», США). Для каждого массива данных рассчитывали параметры описательной статистики: среднюю арифметическую ( $M$ ), стандартное отклонение ( $SD$ ), медиану ( $Me$ ) и интерквартильный диапазон (25...75 % процентиля), а также минимальное ( $min$ ) и максимальное ( $max$ ) значения. Полученные результаты оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилкса. Для сравнения двух независимых выборок исполь-

зовали *U*-критерий Манна-Уитни, для сравнения зависимых выборок – критерий Вилкоксона. Количественную оценку линейной связи между двумя случайными величинами выполняли с использованием коэффициента ранговой корреляции (*R*) по Спирмену. За максимально приемлемую вероятность ошибки первого рода (*p*) принималась величина уровня статистической значимости, равная или меньшая 0,05.

## Результаты

Среднее время, затраченное квалифицированным сотрудником лаборатории для ручного подсчета ретикулоцитов, составило  $(178,2 \pm 51,6)$  с. Это соответствует затратам времени, рекомендованным на выполнение данной методики, приведенным в Приказе № 380 [14]. Использование сканер-анализатора

сократило время подсчета ретикулоцитов в образцах основной группы на 90,5% (*рис. 1*), а в образцах группы сравнения – на 56% (*рис. 2*), составив соответственно  $(106,3 \pm 18,3)$  и  $(99,9 \pm 16,8)$  с. Время, затраченное прибором на сканирование стеклопрепарата, составило 42...47 с.

Затраты времени при оценке количества ретикулоцитов в основной группе и в группе сравнения достоверно различались только при использовании ручного метода ( $p = 0,006592$ ). При использовании ручного метода увеличение числа ретикулоцитов вело к удлинению времени выполнения анализа (*табл. 1*). Увеличение времени анализа при ручном подсчете ретикулоцитов обусловлено необходимостью дополнительной концентрации внимания сотрудником КДЛ для идентификации ретикулоцита и механической фиксации результатов подсчета на

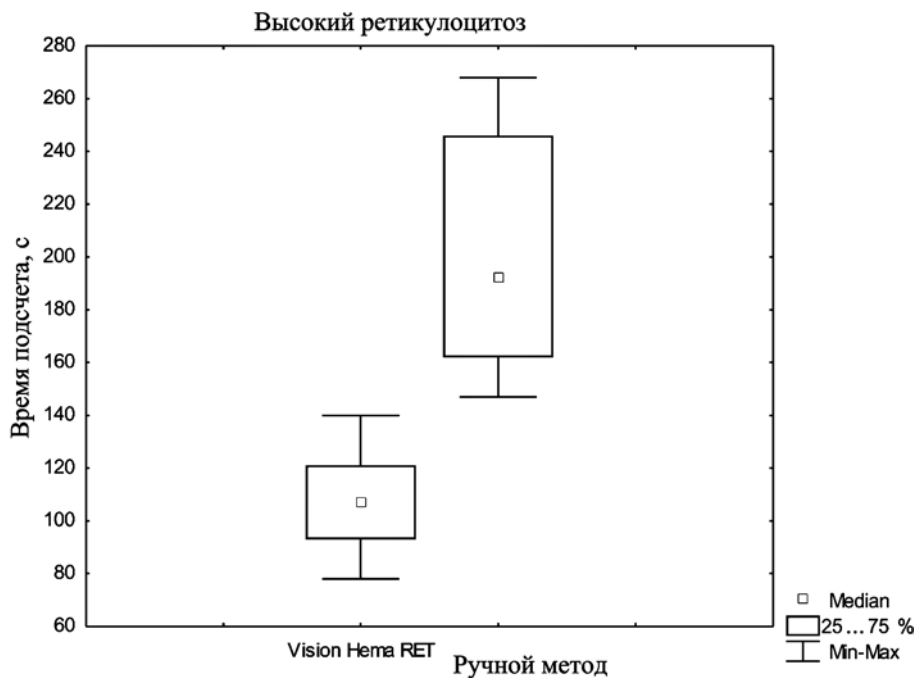


Рис. 1. Затраты времени (в секундах) на подсчет ретикулоцитов в основной группе автоматически, на Vision Hema®RET, и ручным методом

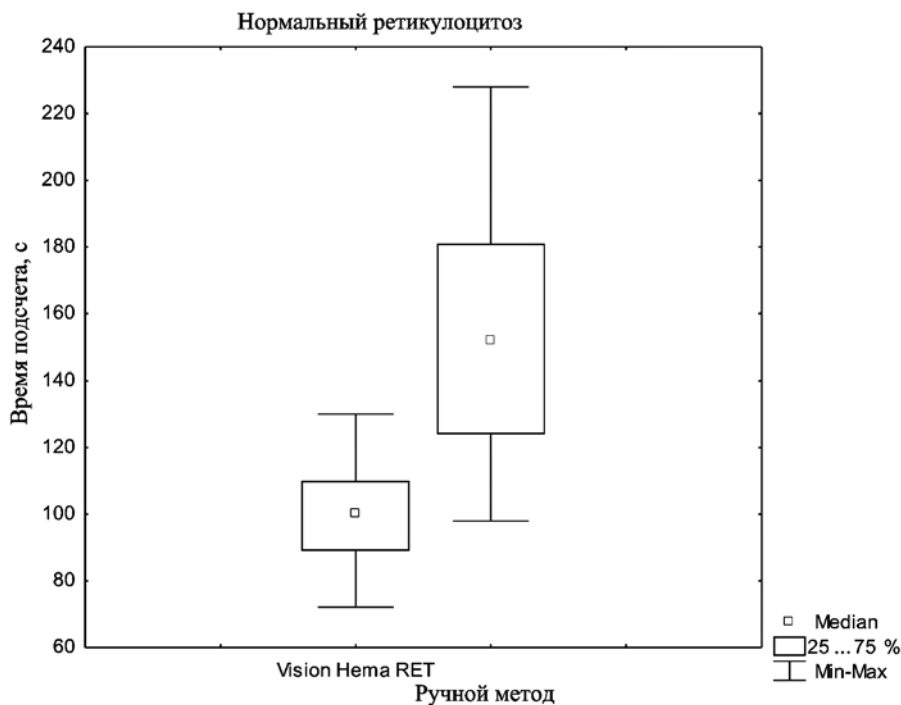


Рис. 2. Затраты времени (в секундах) на подсчет ретикулоцитов в группе сравнения автоматически, на Vision Hema®RET, и ручным методом

счетчике лейкоцитарной формулы. При использовании сканер-анализатора увеличение числа ретикулоцитов достоверно не влияет на продолжительность исследования ( $p = 0,340087$ ) (табл. 1). Это объясняется отсутствием необходимости концентрации внимания сотрудником КДЛ на обнаружении отдельных ретикулоцитов и механической фиксации результатов исследования. Данные операции осуществляются автоматически модулем Vision Hema<sup>®</sup>RET.

Оценка правильности подсчета ретикулоцитов не выявила достоверных различий между ручным и автоматизированным методами (рис. 3). Результаты подсчета количества ретикулоцитов на сканер-анализаторе мазков крови и ручным способом достоверно не различались как в основной группе ( $p = 0,211$ ), так и в группе сравнения ( $p = 0,53$ ). Коэффициент корреляции Спирмена ( $R = 0,977$ ) свидетельствовал о наличии тесной корреляционной связи результатов подсчета ретикулоцитов ручным способом и на сканер-анализаторе ( $p < 0,00001$ ). Высокая степень корреляции наблюдалась как для основной группы ( $R = 0,954$ ;  $p < 0,00001$ ), так и для группы сравнения ( $R = 0,862$ ;  $p = 0,000035$ ).

Оценка внутрисерийной воспроизводимости не выявила различий между результатами подсчета количества ретикулоцитов ручным способом и с применением сканер-анализатора как в основной группе ( $p = 0,969$ ), так и в группе сравнения ( $p = 0,29$ ). Значения при подсчете числа ретикулоцитов в препарате с нормальным содержанием ретикулоцитов составили для ручного способа ( $0,73 \pm 0,15$ ) %, а для приборного

( $0,74 \pm 0,07$ ) % ( $p = 0,969$ ). В образце с высоким ретикулоцитозом результаты составили соответственно для ручного способа ( $19,7 \pm 1,7$ ) %, а для приборного ( $20,3 \pm 0,9$ ) % ( $p = 0,29$ ).

При расчете коэффициентов внутрисерийной воспроизводимости ( $CV_{bc}$ ) сравниваемых способов подсчета была продемонстрирована лучшая воспроизводимость автоматизированного метода в сравнении с ручным. Значения  $CV_{bc}$  были меньше почти в два раза и составили для препарата с нормальным количеством ретикулоцитов  $CV_{bc} = 9,46$  % против  $CV_{bc} = 20,55$  %, а для препарата с высоким ретикулоцитозом соответственно  $CV_{bc} = 4,64$  % против  $CV_{bc} = 8,6$  %. Большая воспроизводимость результатов подсчета на приборе в сравнении с ручным методом обусловлена более правильным подсчетом именно 1000 эритроцитов.

Таким образом, использование модуля Vision Hema<sup>®</sup> RET, интегрированного в сканер-анализатор Vision Hema<sup>®</sup>, позволяет оптимизировать работу сотрудников КДЛ за счет сокращения времени подсчета ретикулоцитов, особенно в образцах с повышенным ретикулоцитозом. При этом данные автоматического подсчета ретикулоцитов не отличаются от результатов ручного подсчета сотрудниками КДЛ, но характеризуются большей воспроизводимостью результатов. Использование автоматических сканер-анализаторов для анализа мазков крови внедряет новый, более объективный стандарт микроскопических исследований, который, возможно, является более достоверным, чем традиционная ручная микроскопия мазков крови.

Таблица 1

**Затраты времени (в секундах) на подсчет ретикулоцитов ручным способом и на сканер-анализаторе Vision Hema<sup>®</sup>Pro с использованием модуля Vision Hema<sup>®</sup>RET**

	Основная группа (n = 15)		Группа сравнения (n = 15)	
	Vision Hema <sup>®</sup> RET	Ручной метод	Vision Hema <sup>®</sup> RET	Ручной метод
Средние затраты времени, с	$106,3 \pm 18,3$ 107; 93...121	$202,3 \pm 44,7$ 192; 162...246	$99,9 \pm 16,8$ 100; 89...110	$155,1 \pm 38,0$ 152; 124...181
Min...Max, с	78...140	77...149	72...130	98...228
Различие по критерию Вилкоксона	$p = 0,000655$		$p = 0,000805$	

П р и м е ч а н и е – В числителе: среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ); в знаменателе: медиана и интерквартильный диапазон ( $Me$ ; 25...75 % квартиль).

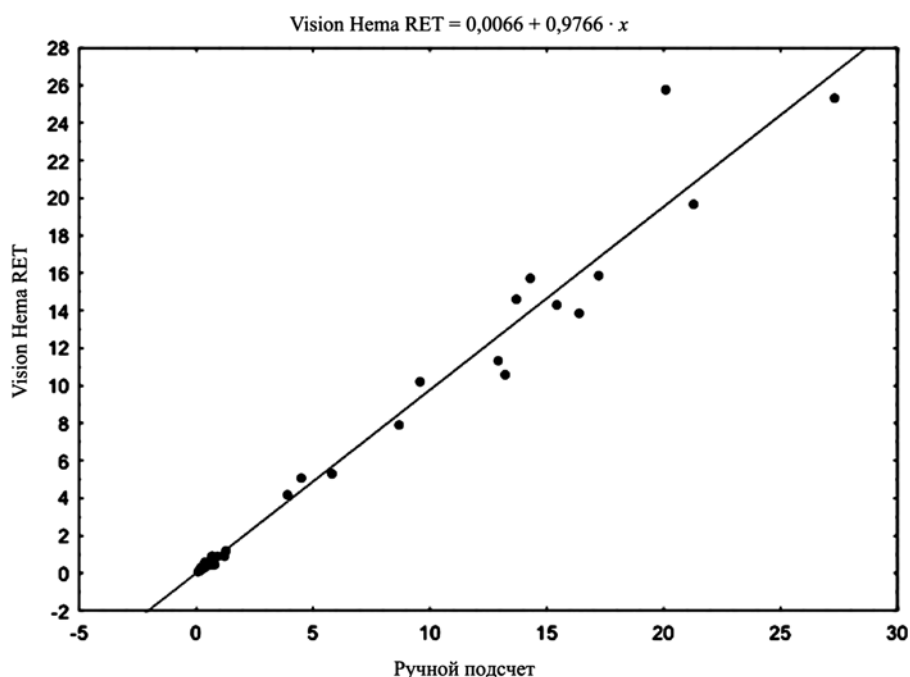


Рис. 3. Корреляционная зависимость между подсчетом ретикулоцитов (в процентах) ручным методом и на гематологическом сканер-анализаторе Vision Hema<sup>®</sup>Pro с использованием модуля Vision Hema<sup>®</sup>RET

### Список литературы:

1. Козинец Г.И., Сарычева Т.Г., Луговская С.А. Гематологический атлас / Настольное руководство врача-лаборанта. – Ярославль: Издательство «Практическая медицина», 2015. 192 с.
2. Стуклов Н.И., Альтидовский В.К., Огурцов П.П. Анемии. Клиника, диагностика и лечение / Уч. пособие для врачей. – М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2013. 264 с.
3. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Матвеева И.И. Алгоритм современной лабораторной диагностики анемического синдрома у онкологических больных // Клиническая лабораторная диагностика. 2012. № 7. С. 19-24.
4. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая З.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике / Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. 368 с.
5. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика / Справочник: Медицинские лабораторные технологии. Т. 1 / Под ред. проф. А.И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 2012. 472 с.
6. Пятницкий А.М., Медовый В.С., Парпара А.А. Анализ ретикулоцитов: ручная микроскопия, проточные анализаторы или анализаторы изображений? (Аналитический обзор) // Клиническая лабораторная диагностика. 2007. Т. 52. № 10. С. 10-14.
7. Стуклов Н.И. Компьютерная морфометрия ретикулоцитов в норме и при анемическом синдроме / Автореф. канд. мед. наук. 14.00.29. – М., 2004. 36 с.
8. Mahe E.R., Higa D., Naugler C., Adnan Mansoor, Meer-Taher Shabani-Rad Accuracy of the CellaVision DM96 platform for reticulocyte counting // Journal of Pathology Informatics. 2014. Vol. 5. № 1. P. 17 / [http://www.jpathinformatics.org/temp/JPatholInform5117-8324497\\_230724.pdf](http://www.jpathinformatics.org/temp/JPatholInform5117-8324497_230724.pdf) (ссылка активна на 26.01.2017 г.).
9. Соснин Д.Ю., Ненашева О.Ю., Фалков Б.Ф., Трушева Л.А. Влияние подготовки мазка крови на работу системы автоматического анализа мазков крови Vision Hema // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. Т. 58. № 4. С. 17-20.
10. Соснин Д.Ю., Фалков Б.Ф., Кубарев О.Г., Башикиров А.Ю., Поздин Н.В. Оценка распознавания клеток в мазках периферической крови системой автоматического анализа мазков крови Vision Hema® Ultimate // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60. № 9. С. 110.
11. Da Costa L. Digital image analysis of blood cells // Clinics in Laboratory Medicine. 2015. Vol. 35. № 1. PP. 105-122.
12. CLSI H20-A2 Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods // Approved Standard – Second Edition. January 2007. Vol. 27. № 4.
13. Приказ Минздрава РФ от 25.12.1997 г. № 380 «О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».
14. Приказ Минздрава РФ от 07.02.2000 г. № 45 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации».

*Дмитрий Юрьевич Соснин,  
д-р мед. наук, доцент,  
кафедра клинической лабораторной  
диагностики факультета дополнительного  
профессионального образования,  
ФГБОУ ВО «ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера» МЗ РФ,  
Лилия Станиславовна Онянова,  
руководитель лабораторного отдела,  
ООО «West Medica»,  
Борис Фимович Фалков,  
директор разработки программного обеспечения,  
ООО «Медика Продакт» («Вест-Медика»),  
Олег Георгиевич Кубарев,  
ординатор кафедры клинической  
лабораторной диагностики факультета  
дополнительного профессионального образования,  
Никита Владимирович Поздин,  
студент факультета прикладной математики и механики,  
ФГБОУ ВО «ПГМУ им. акад. Е.А. Вагнера» МЗ РФ,  
г. Пермь,  
e-mail: sosnin\_dm@mail.ru*

*Н.А. Ветрова, А.Г. Гудков, В.Д. Шашурин, О.С. Нарайкин,  
С.В. Агасиева, Е.Н. Горлачева, В.Н. Лемонджавя, В.М. Гукасов*

## Технологическая оптимизация устройства для безопасного хранения тромбоцитосодержащих трансфузионных сред

### Аннотация

Разработана математическая модель технологической оптимизации на основе адаптивных алгоритмов метода нечетких цепей Маркова. Показана эффективность модели при проведении технологической оптимизации устройства для безопасного хранения тромбоцитосодержащих трансфузионных сред. Приведены результаты решения задачи поддержания технологического процесса в группе состояний «вблизи экстремума» целевой функции с вероятностью в установившемся режиме около 90 %.

В ранее опубликованных статьях [1]-[3] были представлены результаты теплового проектирования, состав и конструкция устройства для безопасного хранения тромбоцитосодержащих трансфузионных сред. Для того чтобы снизить производственные затраты на изделие, необходимо выполнить комплексную технологическую оптимизацию и разработать соответствующие модели. Сложность решения поставленной задачи связана с тем, что технологический процесс характеризуется множеством взаимосвязанных факторов, влияющих как на ход процесса, так и на его результаты. Поэтому проведение технологической оптимизации и мониторинг технологическо-

го процесса являются важными технико-экономическими задачами производства устройства для безопасного хранения тромбоцитосодержащих трансфузионных сред. Значение этих задач особенно возрастает в связи с широкой автоматизацией производства, применением станков с числовым программным управлением, автоматических станочных линий и многооперационных станков, FDM-технологий, а также широким использованием новых материалов.

Согласно современным исследованиям в области технологической оптимизации сложных производственных процессов (к которым следует отнести технологический процесс произ-