Практические аспекты диагностики при проведении гематологических исследований

Иевлева Любовь Валерьевна

Врач клинической лабораторной диагностики

ГБУ АО «Архангельский клинический онкологический диспансер»

Этапы лабораторного исследования

- Преаналитический

- Внелабораторный

Назначение анализа, забор, хранение и транспортировка биоматериала

- Внутрилабораторный

Регистрация, отбраковка проб, пробоподготовка

- Аналитический

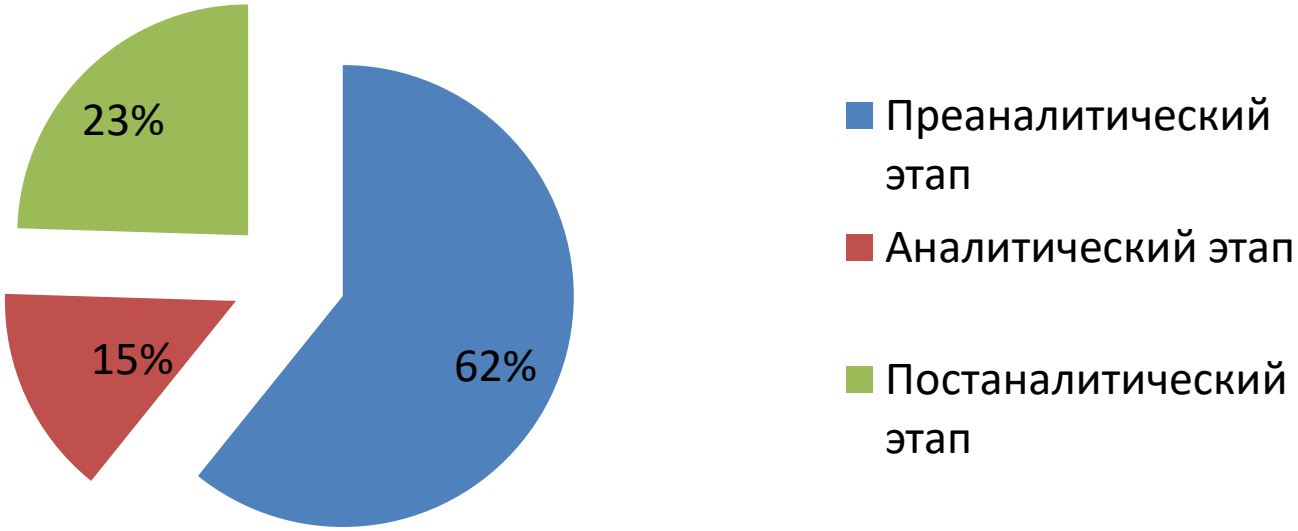
Непосредственное выполнение анализа

- Постаналитический

Выдача результатов и их интерпретация

Источники ошибок лабораторной диагностики

Ошибки составляют до 10 % от всех поступивших образцов



ГОСТ Р 53079.4-2008
НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Технологии лабораторные клинические
ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ
Часть 4

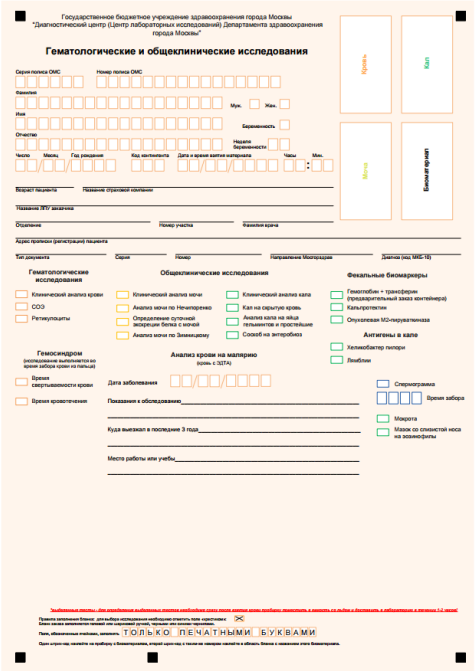
Правила ведения преаналитического этапа

Clinical laboratory technologies. Quality assurance of clinical laboratory tests. Part 4. Rules for conducting of preanalytical stage

п.3.5.5. Критерии для отказа в принятии биоматериала на исследования

Критерии для отказа в принятии биоматериала на исследования

- Отсутствует маркировка на пробирке
- Несоответствие маркировки бланка – направления и используемой пробирки
- Неправильно заполненный бланк – направление (отсутствие сведений в некоторых графах)



Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы
"Диагностический центр (Центр лабораторных исследований) Департамента здравоохранения города Москвы"

Гематологические и общеклинические исследования

Серия полиса ОМС | Номер полиса ОМС

Фамилия | Муж. | Жен.

Имя | Беременность

Отчество | Недели беременности

Число | Месяц | Год рождения | Код контрагента | Дата и время взятия материала | Часы | Мин.

Возраст пациента | Название страховой компании

Название ЛПУ заказчика

Отделение | Номер участка | Фамилия врача

Адрес прописки (регистрации) пациента

Тип документа | Серия | Номер | Направление Мосгорздрава | Диагноз (код МКБ-10)

Кровь | Кал | Моча | Биоматериал прилагает

Гематологические исследования

- Клинический анализ крови
- СОЭ
- Ретикулоциты

Гемосидроз (исследование выполняется во время забора крови из пальца)

- Время свертываемости крови
- Время кровотечения

Общеклинические исследования

- Клинический анализ мочи
- Анализ мочи по Нечипоренко
- Определение суточной экскреции белка с мочой
- Анализ мочи по Зимницкому
- Клинический анализ кала
- Кал на скрытую кровь
- Анализ кала на яйца гельминтов и простейшие
- Соскоб на энтеробиоз

Анализ крови на малярию (кровь с ЭДТА)

Дата заболевания

Показания к обследованию

Куда выезжал в последние 3 года

Место работы или учебы

Фекальные биомаркеры

- Гемоглобин + трансферин (предварительный заказ контейнера)
- Кальпротектин
- Опухолевая М2-пируваткиназа

Антигены в кале

- Хеликобактер пилори
- Лямблии

- Спермограмма
- Время забора
- Мокрота
- Мазок со слизистой носа на эозинофилы

Правила заполнения бланков: для выбора исследований необходимо отметить поле «крестиком» ☒
Бланк заказа заполняется лечащим или сдающим врачом, или медицинской сестрой.

Поля, обведенные красным, заполнять ТОЛЬКО ПЕЧАТНЫМИ БУКВАМИ

Один экземпляр направления на пробирку с биоматериалом, второй экземпляр с полным направлением остается в обязательствах с биоматериалом.

Критерии для отказа в принятии биоматериала на исследования

- Несвоевременная доставка материала для плановых исследований в лабораторию
- Несоблюдение сроков и условий хранения материала до момента доставки в лабораторию (замораживание, перегрев, утрата части материала при опрокидывании и т. д.)

Критерии для отказа в принятии биоматериала на исследования

- Взятый биоматериал находится в несоответствующей пробирке, т. е. материал взят не с тем антикоагулянтом, консервантом, нарушено соотношение крови и антикоагулянта
- Материал взят в вакуумные емкости с просроченным сроком годности
- Наличие сгустков в пробирках с антикоагулянтом

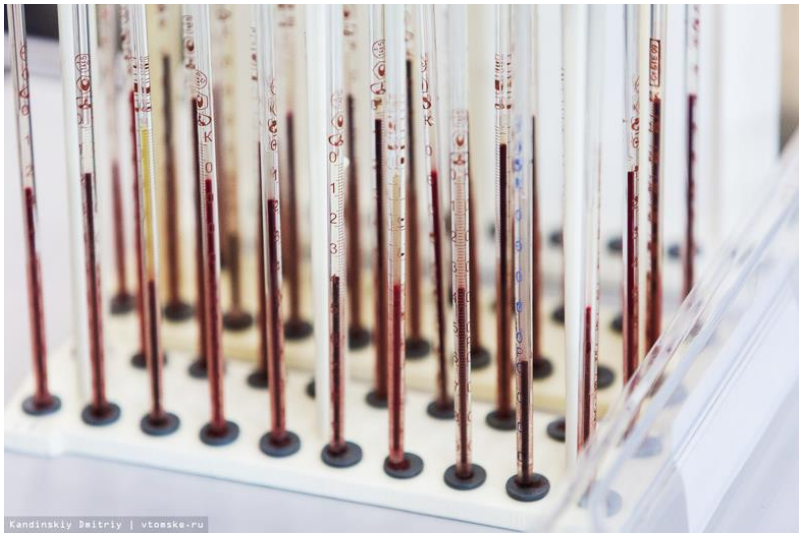
Появление даже незначительных ошибок на преаналитическом этапе неизбежно приводит к искажению качества окончательных результатов лабораторных исследований

Оценка качества выполнения определения СОЭ на преаналитическом этапе исследования

- Международным комитетом по стандартизации в гематологии было рекомендовано не использовать для определения СОЭ капилляры с диаметром менее 2,5 мм
- Разведение пробы крови цитратом натрия 1 : 4
- Не рекомендовано проводить исследование СОЭ при температуре выше 18 °С.
- СОЭ по Вестергрену одобрен в качестве эталонного Международным комитетом по стандартизации в гематологи (ICSH). Регулируется стандартом Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI).

Недостатки метода Панченкова

- Не отвечает международным рекомендациям по диаметру просвета более 2,5 мм
- Влияние ПАВ
- Отсутствие стандартизации качества цитрата натрия и возможностей для точного дозирования
- Шкала для измерения в 100 мм вместо 200 мм
- Оксигенация пробы и вероятность попадания пузырьков воздуха
- Опасность инфицирования персонала
- Отсутствие референсных методов и стандартизации процессов



Рекомендации ICSH-2017

- Классический метод Вестергрена, который является золотым стандартом
- Модифицированный метод Вестергрена
- Альтернативные методы для измерения СОЭ, совершенно другие способы измерения СОЭ, например, центрифугирование крови или оценка изменения реологических свойств крови

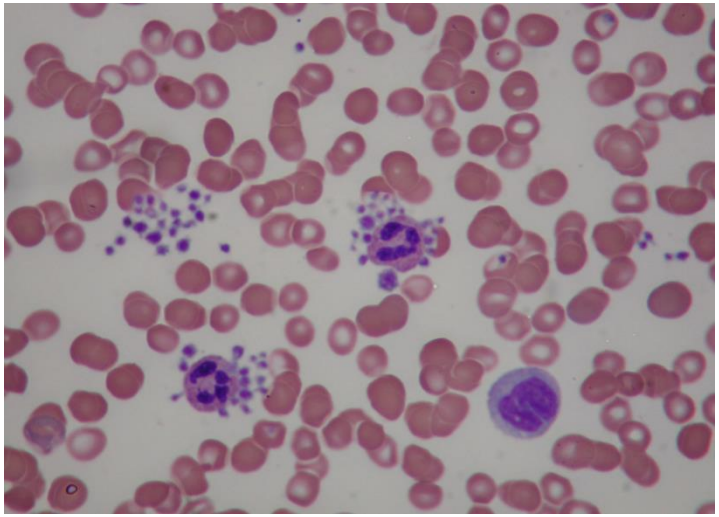
✓ Использование специальных закрытых вакуумных систем для взятия венозной крови

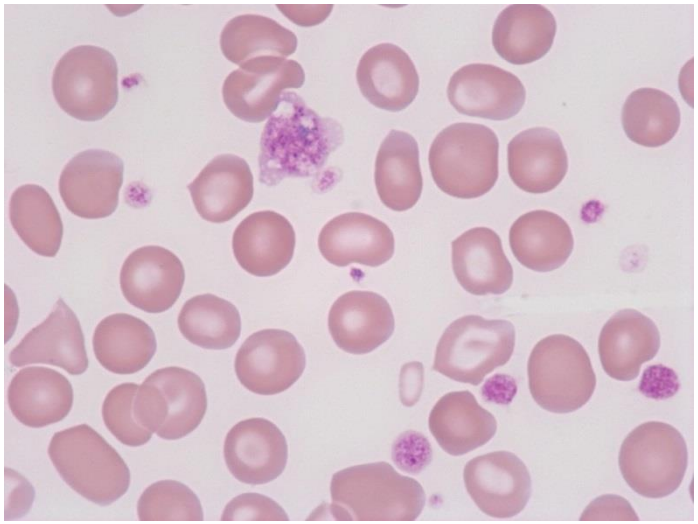
Забор капиллярной крови

- Стандартный прокол пальца должен проводится при условии хорошего периферического кровообращения
- Глубина прокола у взрослых 1,5 мм, у детей 1-1,5 мм
- Использование пробирок с содержащим антикоагулянт капилляром, из химически нейтральных материалов
- Антикоагулянт - ЭДТА К2
- Забор крови до метки и тщательное аккуратное смешивание крови с антикоагулянтом

Стабильность аналитов

- Образцы капиллярной крови, взятые для гематологических исследований, рекомендуется сохранять при +20 оС не более 4 ч.
- Международный комитет по стандартизации в гематологии (ICSH) рекомендует проводить гематологические исследования на автоматических анализаторах через 40–60 мин после взятия венозной крови.
- Мазок крови следует приготовить в течение 1 часа после взятия крови.



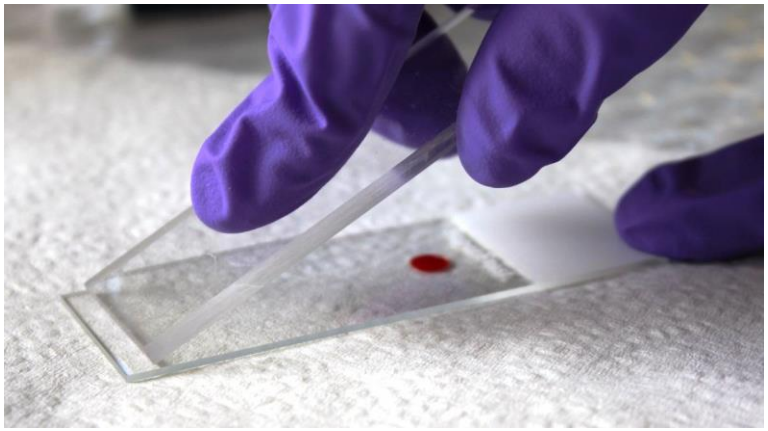


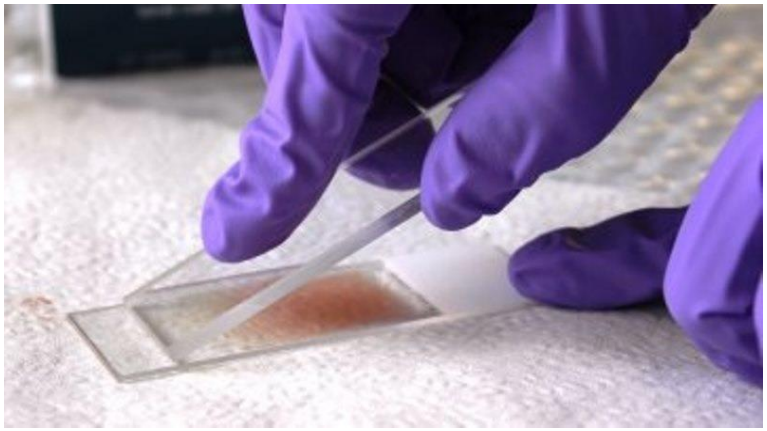
Исследование гематологического мазка

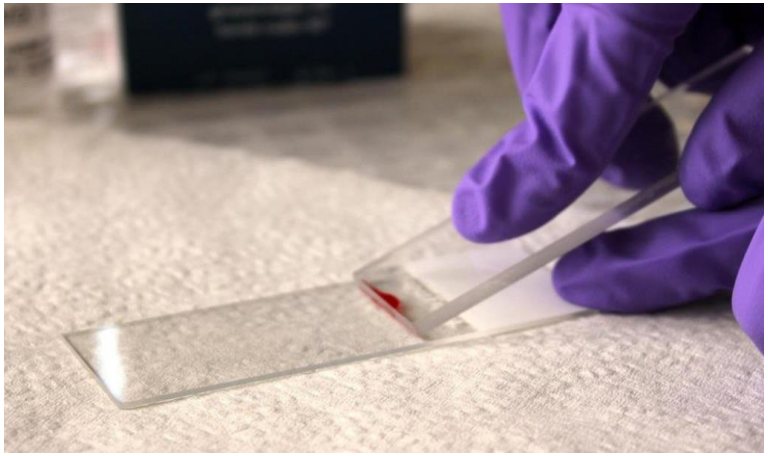
Факторы преаналитического этапа, влияющие на анализ мазка крови

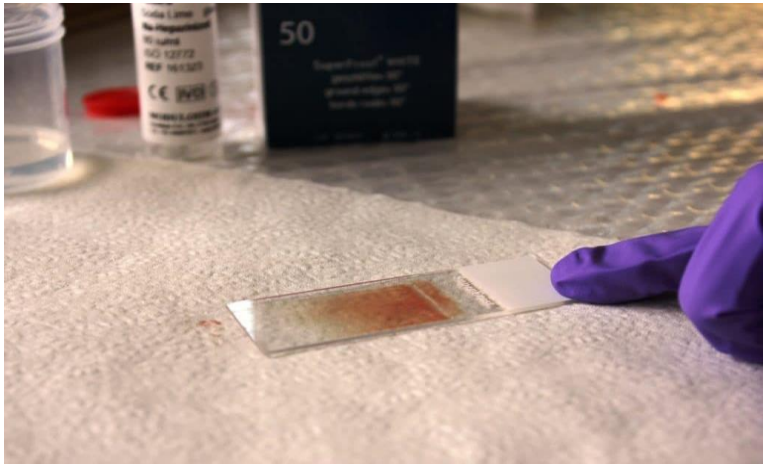
- Качество подготовки стекол для исследования
- Правильность приготовления препарата
- Подбор и использование антикоагулянта
- Условия хранения нефиксированных препаратов
- Подбор фиксаторов и красителей, режимов для фиксации и окраски.
- Использование «забуференной» воды для приготовления рабочих растворов

Техника приготовления мазка



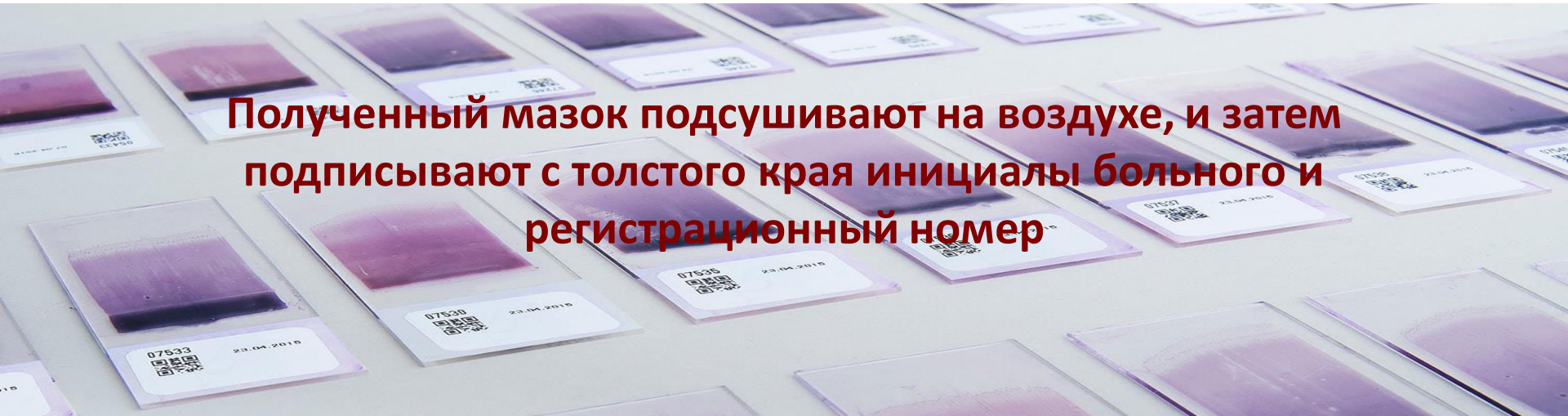






Требования к мазку крови

- Вся капля крови должна быть использована для мазка
- Мазок должен быть уже предметного стекла, с полями шириной около 1 см
- Мазок должен занимать 3/4 стекла
- Должен заканчиваться «метелочкой, щеточкой»
- Должен быть равномерной толщины, не иметь перерывов, пустот
- Должен быть желтоватого цвета, полупрозрачен
- Мазок должен иметь бархатистую поверхность



Полученный мазок подсушивают на воздухе, и затем подписывают с толстого края инициалы больного и регистрационный номер

Дефекты приотовления мазков крови

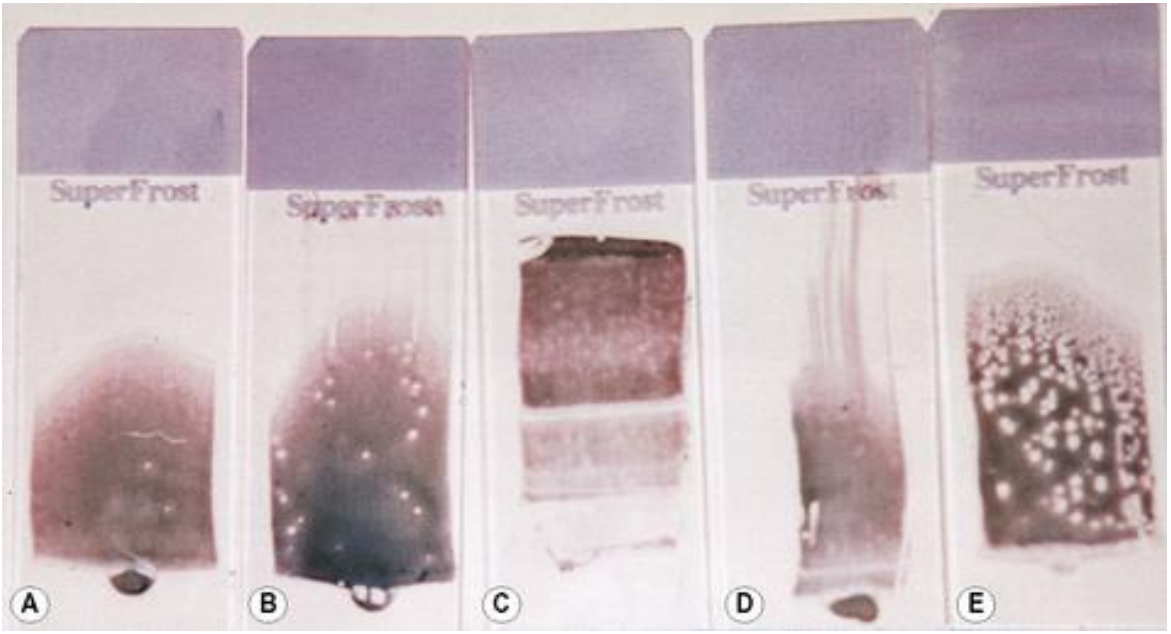
A. Правильно приготовленный мазок

B. Пыль на предметном стекле

C. Неравномерное давление

D. Сильное давление

E. Плохо обезжиренное предметное стекло

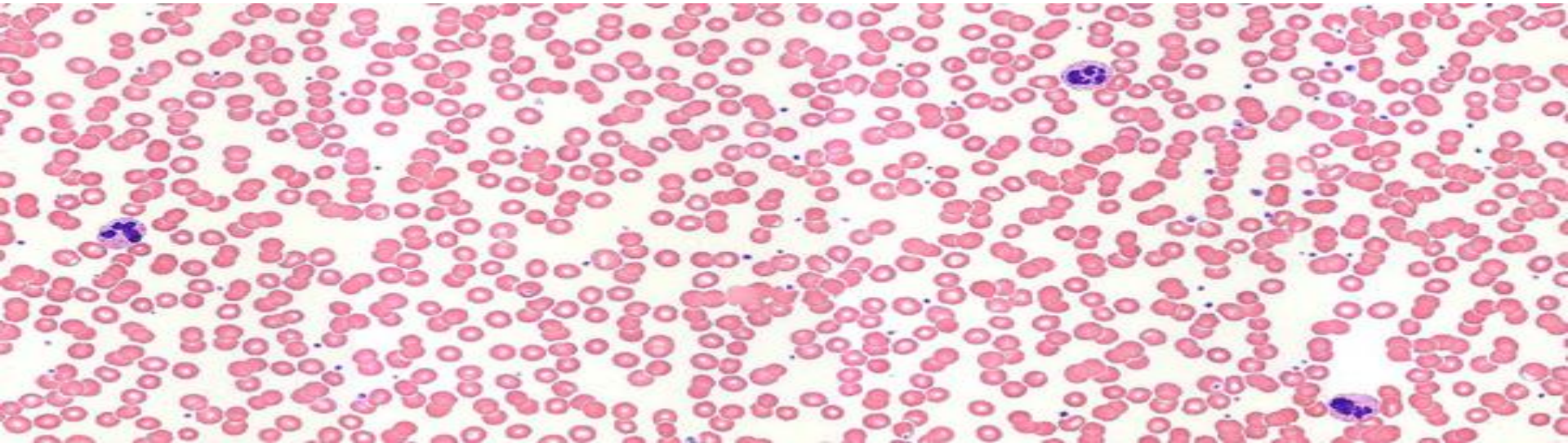


Критерии хорошей окраски мазка

- Розовая окраска гемоглобина
- Зернистость нейтрофилов хорошо прокрашена фиолетовым цветом на розовом фоне
- Зернистость эозинофилов окрашена оранжево-красным цветом
- Зернистость базофилов - фиолетового или темно-синего цвета
- Нежная азурофильная зернистость моноцитов
- Ядра лейкоцитов фиолетово-красного цвета с хорошо видимой структурой хроматина
- Хорошо выделяются ядрышки
- Цитоплазма нейтрофилов светло-розовая
- Цитоплазма лимфоцитов голубого, серо-голубого или сине-голубого цвета

Оценка эритроцитов, критерии диагностики

- Степень зрелости
- Размер: диаметр, MCV – средний объем эритроцита
- Форма
- Окраска: равномерная или с центральным просветлением, интенсивность просветления, полихроматофилия

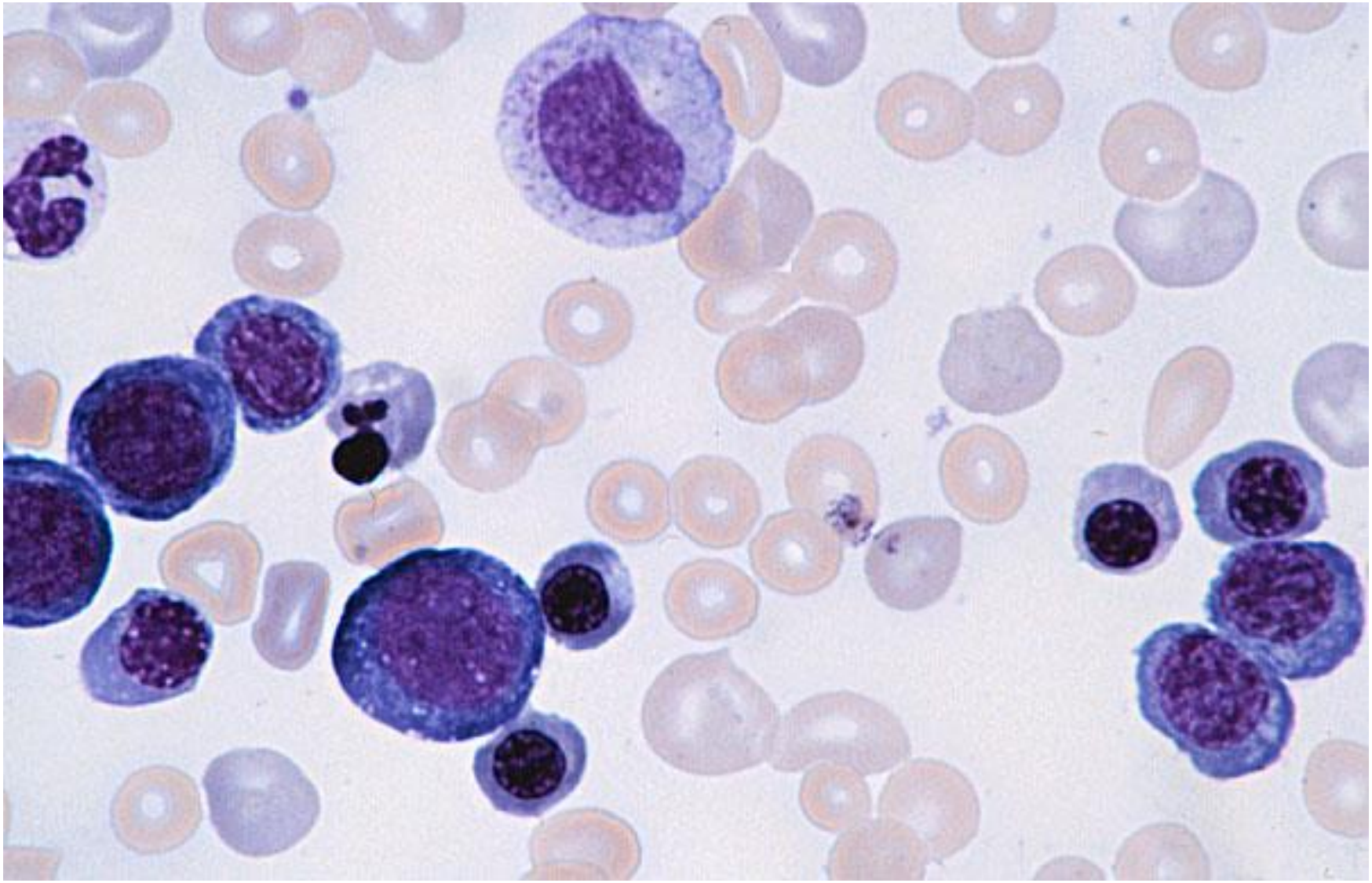


Степень зрелости эритроцитов

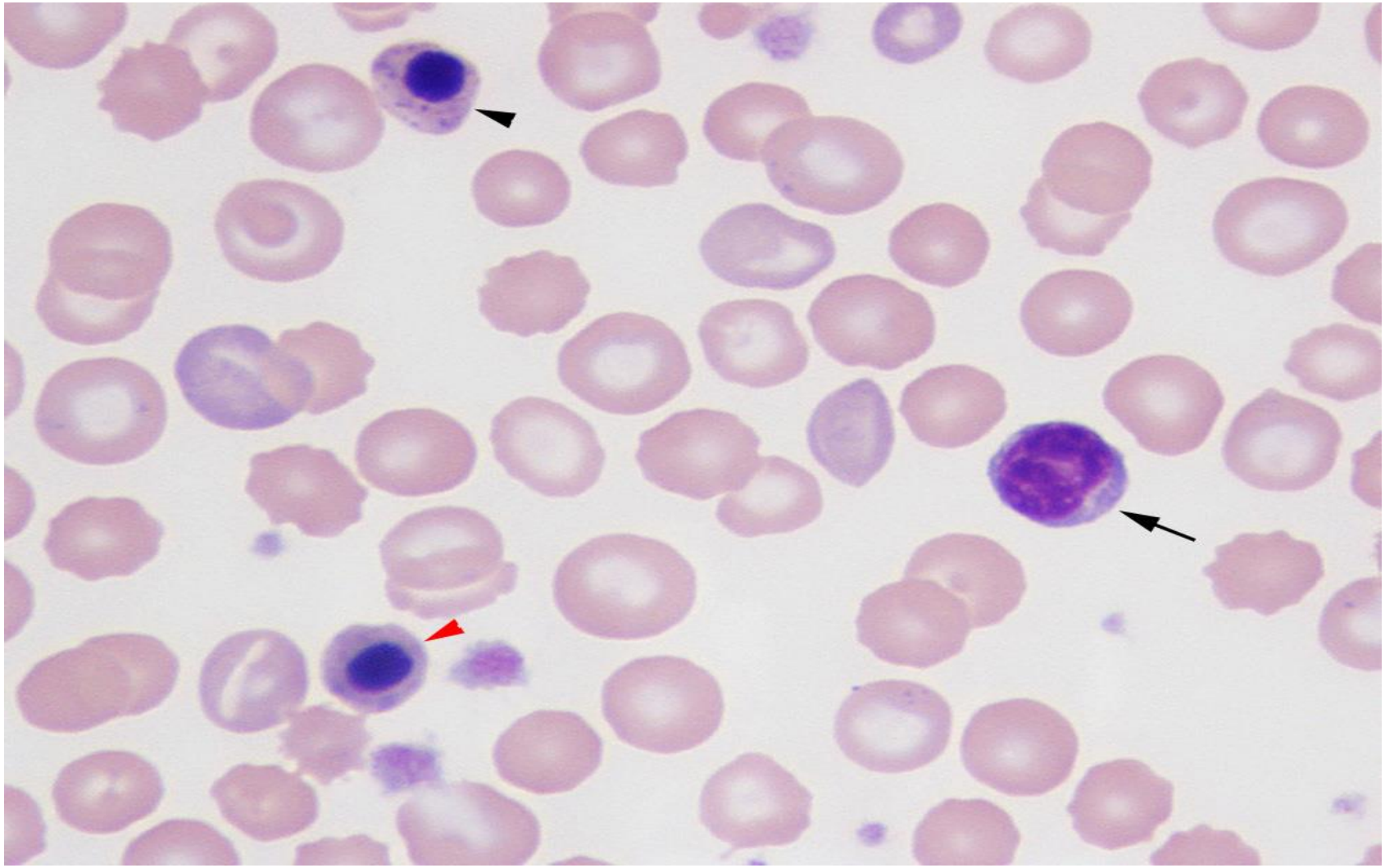
У здоровых взрослых и детей старшего возраста **нормобласты** обнаруживаются только в костном мозге. NRBC не появляются в крови здорового взрослого человека. Поэтому наличие NRBC является важным признаком, заслуживающим внимания при оценке патологических состояний.

В норме нормобласты есть у новорожденных (0-2%)

Незрелые эритроциты



Нормобласты



Эритроцитарные параметры гематологических анализаторов

- **RBC** *(red blood cells)* - Количество эритроцитов крови ($x10^{12}$/л)
- **HGB** *(hemoglobin)* - Концентрация гемоглобина (г/дл или г/л)
- **HCT** *(hematocrit)* – гематокрит, отражает долю объема цельной крови, занимаемую эритроцитами
- **MCV** *(mean corpuscular volume)* - Средний объем эритроцита, выражается в кубических микрометрах (мкм3) или в фемтолитрах (1фл = 1мкм3 или 1х10 -15/л)
- **MCH** *(mean corpuscular hemoglobin)* - Среднее содержание гемоглобина в эритроците (пг)
- **MCHC** *(mean corpuscular hemoglobin concentration)* - Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (г/дл)
- **RDW** *(red cell distribution width)* - Показатель гетерогенности эритроцитов по объему, характеризует степень анизоцитоза. вычисляется на основании гистограммы распределения эритроцитов, как коэффициент вариации объема эритроцитов
- **Ret-**ретикулоциты

Эритроцитарные индексы

- MCV – средний объем эритроцита. Референсный интервал 80-96 фл. В зависимости от размеров выделяют микроциты, менее 80 фл, нормоциты, и макроциты, более 96 фл

  Изменения в мембране эритроцитов возникают раньше, чем в лейкоцитах и тромбоцитах, поэтому **хранение крови более 8 часов вызывает увеличение MCV**

- MCH – показатель среднего содержания гемоглобина в эритроците. Изменения MCH положены в основу классификации анемий

  Референсный интервал - 27-32 пг

- MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, отражает насыщение гемоглобином эритроцитов.

  Референскный интервал - 300-380 г/л

Диагностика по MCV

MCV менее 80 пг/л

MCV более 95 пг/л

Нормобластический тип кроветворения

Мегалобластический тип кроветворения

Ложное завышение

Железодефицитная анемия

Хронические постгеморрагические анемии

Талассемия (гемоглобинопатии)

Кровопотеря

Хронические геморрагические анемии

Поражение печени

Гипотериоз

Метастазы в костный мозг

Нарушение процесса синтеза ДНК

Холодовая агглютинация

Выраженная гипергликемия более 25 ммоль/л

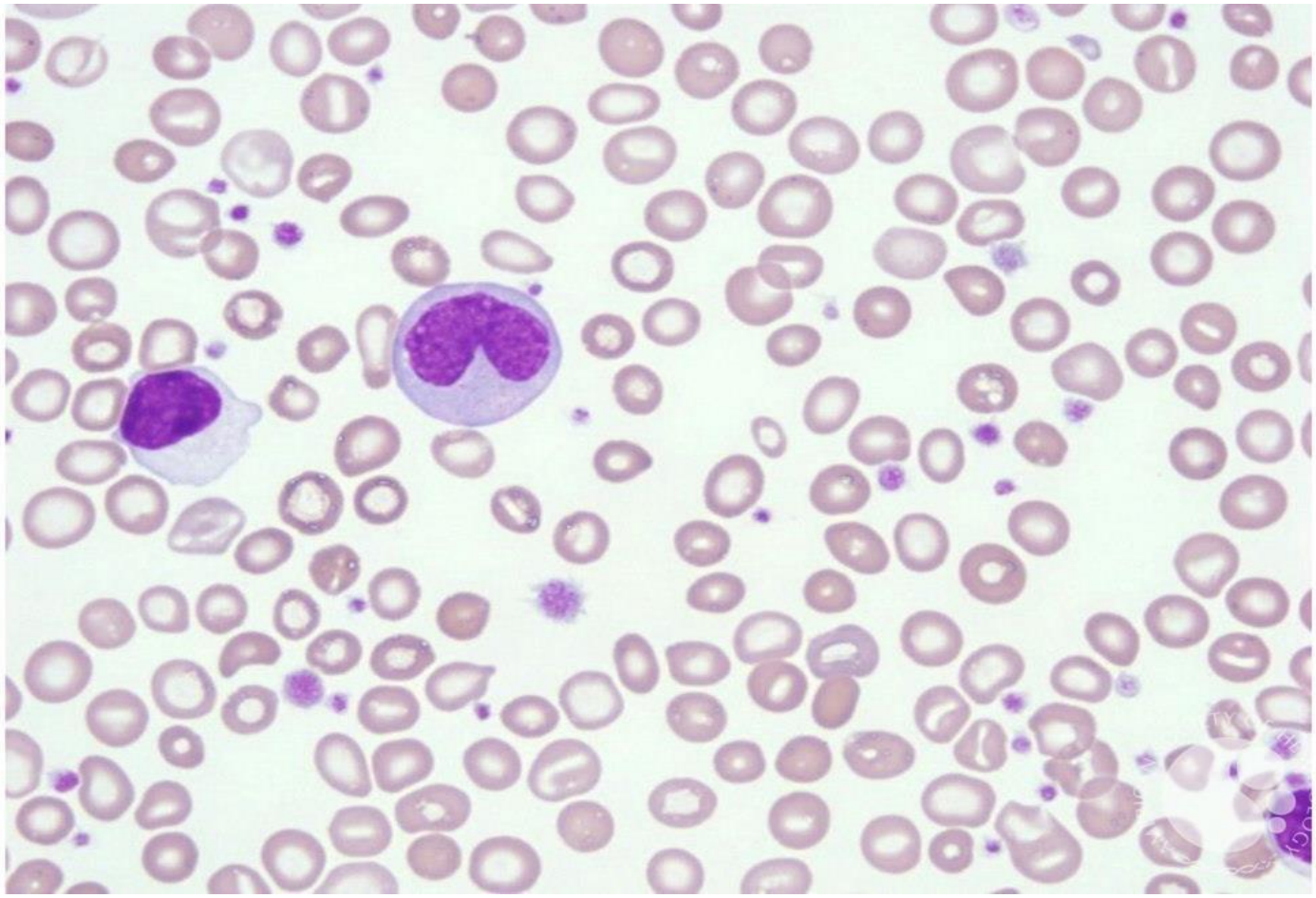
Классификация анемий

Показатели	ЖДА	Гемолитическая анемия	Гипопластическая анемия	В12-дефицитная анемия
Гемоглобин	↓	↓↓	↓↓	↓↓
Эритроциты	↓	↓	↓↓	↓↓
Диаметр эритроцитов	↓	↓	Норма	↑↑
MCV	Норма ↓	↑	Норма	↑↑↑
MCH	↓	↑	Норма	↑↑↑
MCHC	↓	Норма	Норма	↑

Микроцитоз

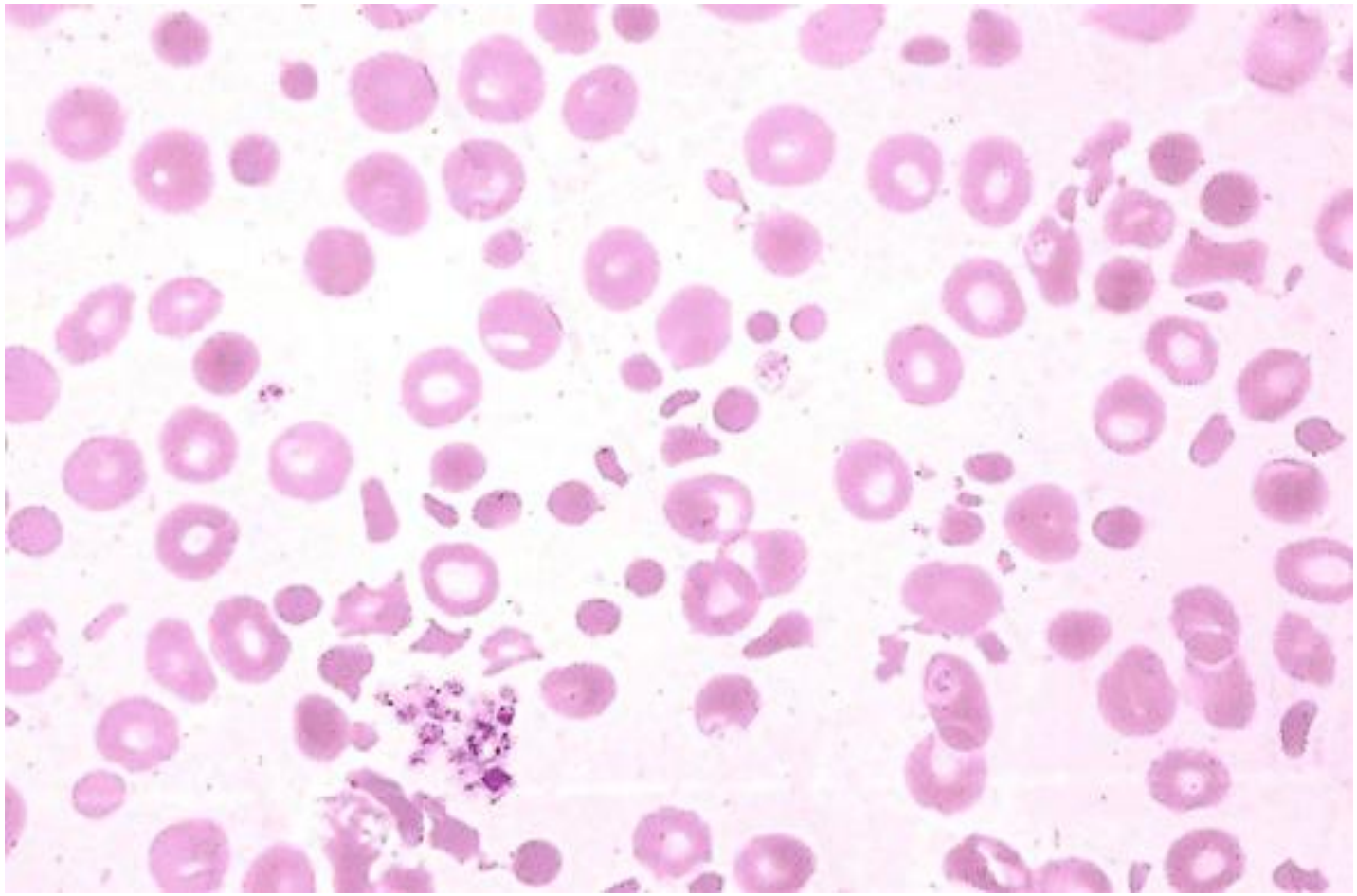
Диаметр эритроцитов менее 6 микрометров:

собственно микроциты



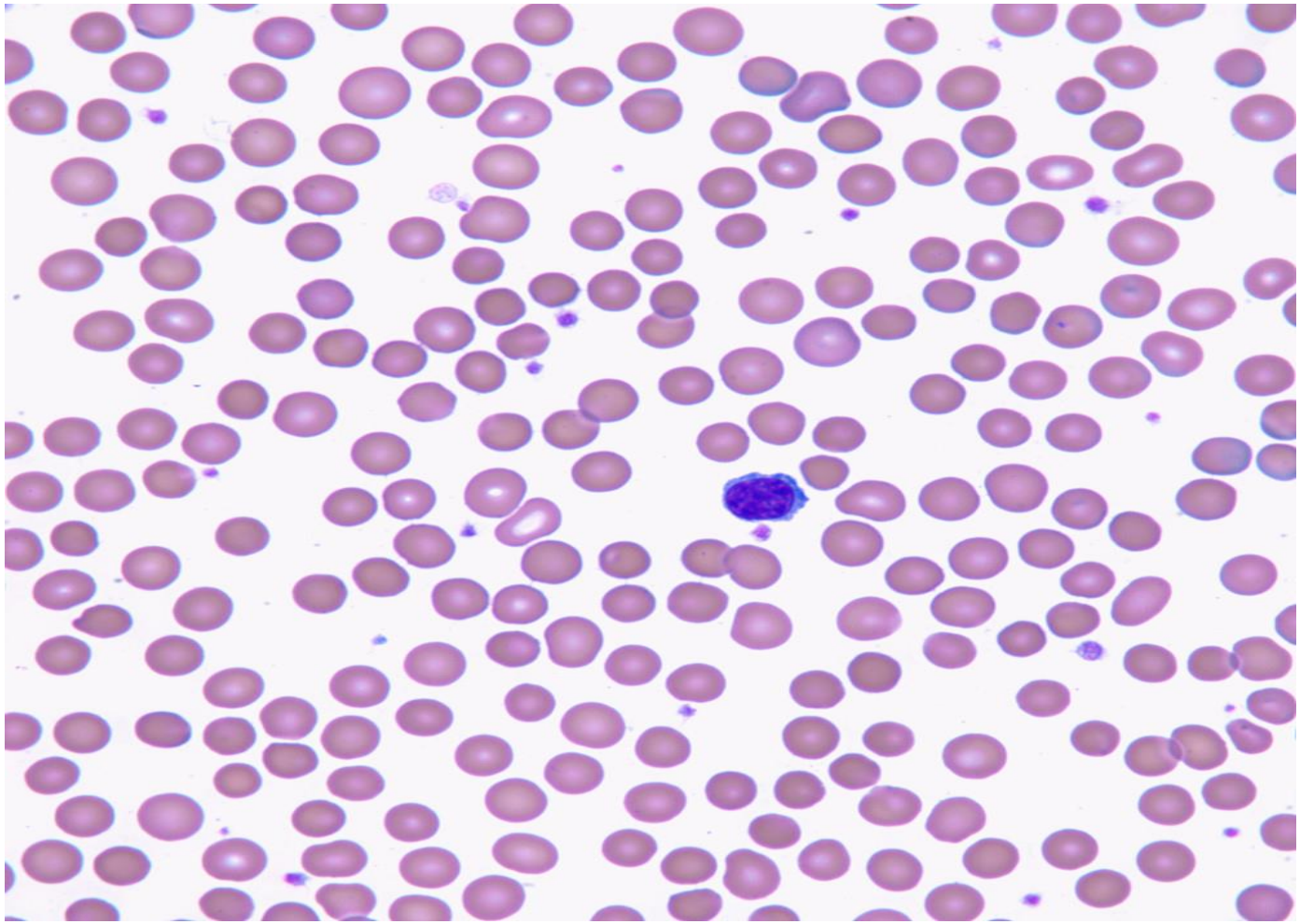
Микроцитоз

Шизоциты — фрагменты или обломки эритроцитов, имеют неправильную форму и размеры 2–3 микрона



Микроцитоз

Микросфероциты — красные кровяные тельца, которые не только уменьшены в размерах, но и имеют форму шара



Основные причины микроцитоза

- Железодефицитная анемия
- Кислородное голодание тканей организма
- Микросфероцитоз — в 75 случаев имеет наследственную природу - мутации генов, которые отвечают за формирование мембраны эритроцитов
- Гемоглобинопатии
- Хронические заболевания — цирроз печени, гепатит, язвенная болезнь ДПК или желудка, патология почек
- Онкологические заболевания с локализацией или метастазами в спинном мозге, щитовидной железе, легких, в предстательной или молочной железе
- Массивные кровопотери

Возникновение микроцитоза может быть связано с:

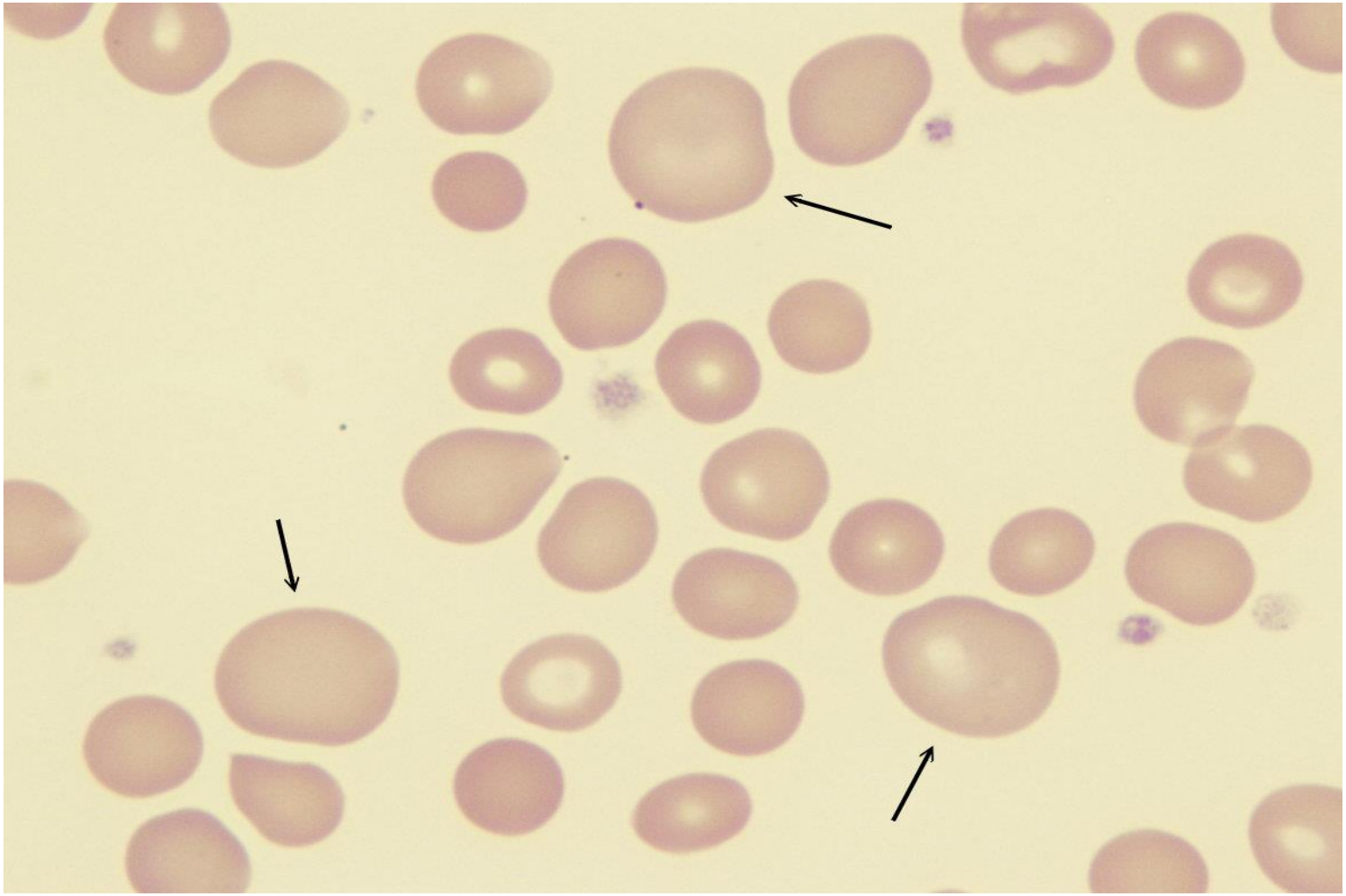
- Беременностью — если количество уменьшенных эритроцитов не превышает 40 %
- Грудным вскармливанием
- Нерациональным питанием
- Гормональным дисбалансом

Классификация микроцитоза

Степень тяжести протекания:

- умеренная — видоизменяется не более 40 % красных кровяных телец
- средняя — отмечается не более 70 % мелких эритроцитов
- выраженная — обнаруживается более 70 % клеток, которые изменили свои размеры

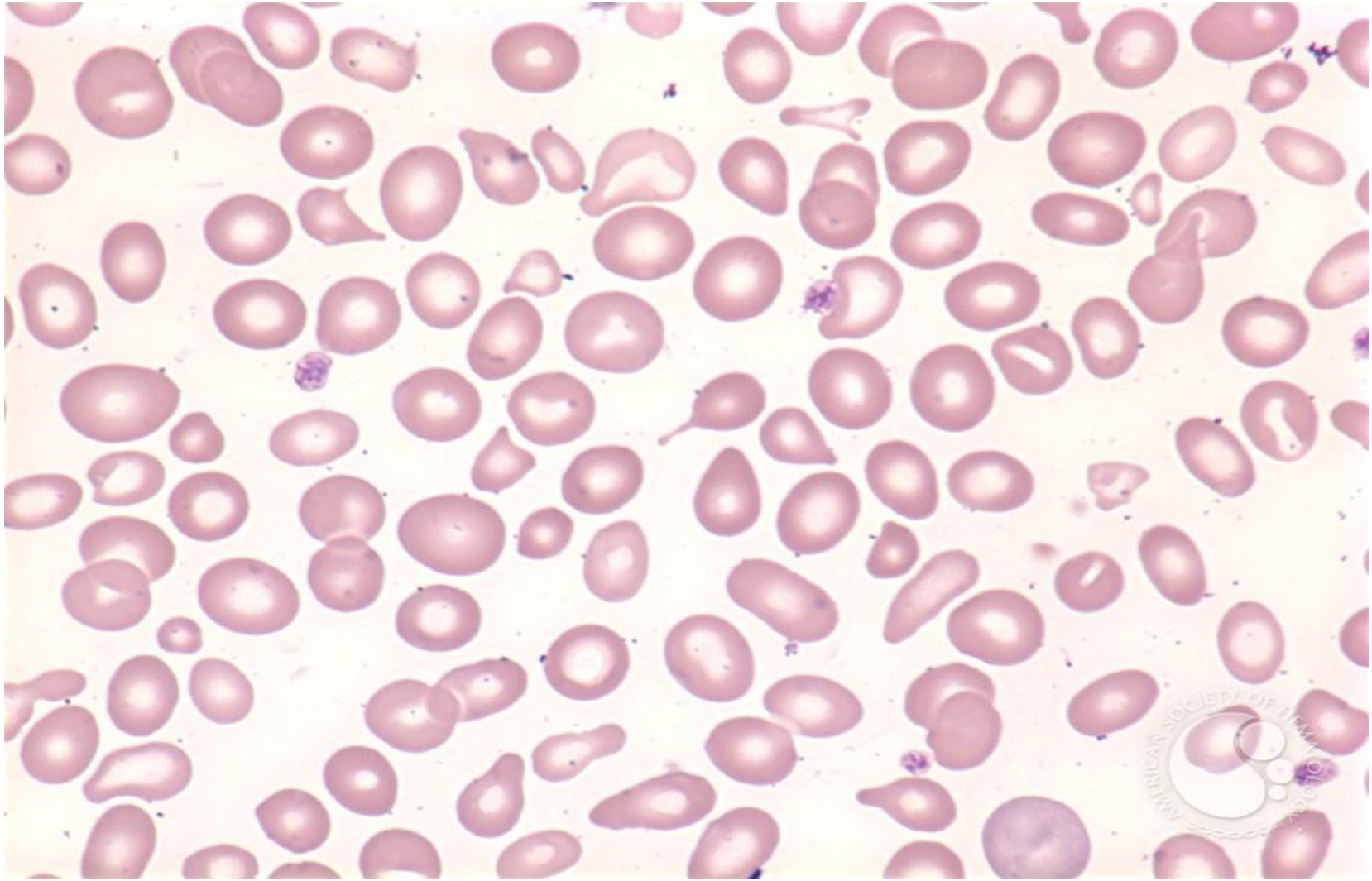
Макроцитоз



Основные причины макроцитоза

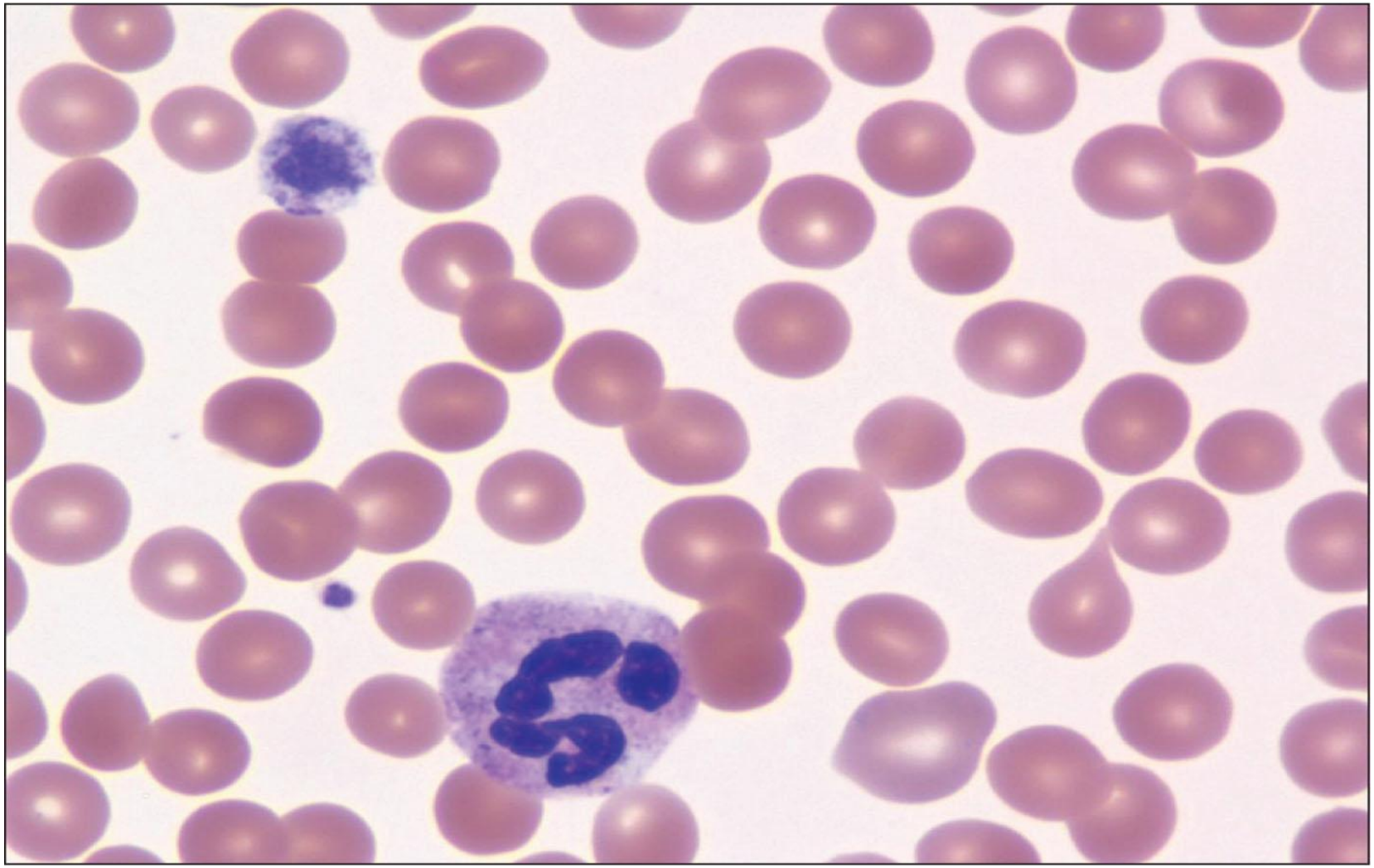
- Дефицит фолатов (витамина В9) или авитаминоз В12, который является причиной формирования гиперхромной мегалобластной анемии или комбинированный вариант
- Анемический синдром, обусловленный острой кровопотерей
- Отдельные виды гемолитических анемий – неэффективный эритропоэз в костном мозге
- Миелодиспластический синдром
- Некоторые формы лейкозов
- Предлейкозные состояния (идиопатическая сидеробластная анемия, синдром Ди Гульельмо – острый злокачественный эритромиелоз
- Гипотиреоз
- Хронический алкоголизм
- Поражение печеночной паренхимы
- Применение некоторых лекарственных препаратов, нарушить синтез ДНК
- Злокачественные новообразования
- Заболевания желудочно-кишечного тракта и оперативные вмешательства на органах пищеварения

Анизоцитоз эритроцитов

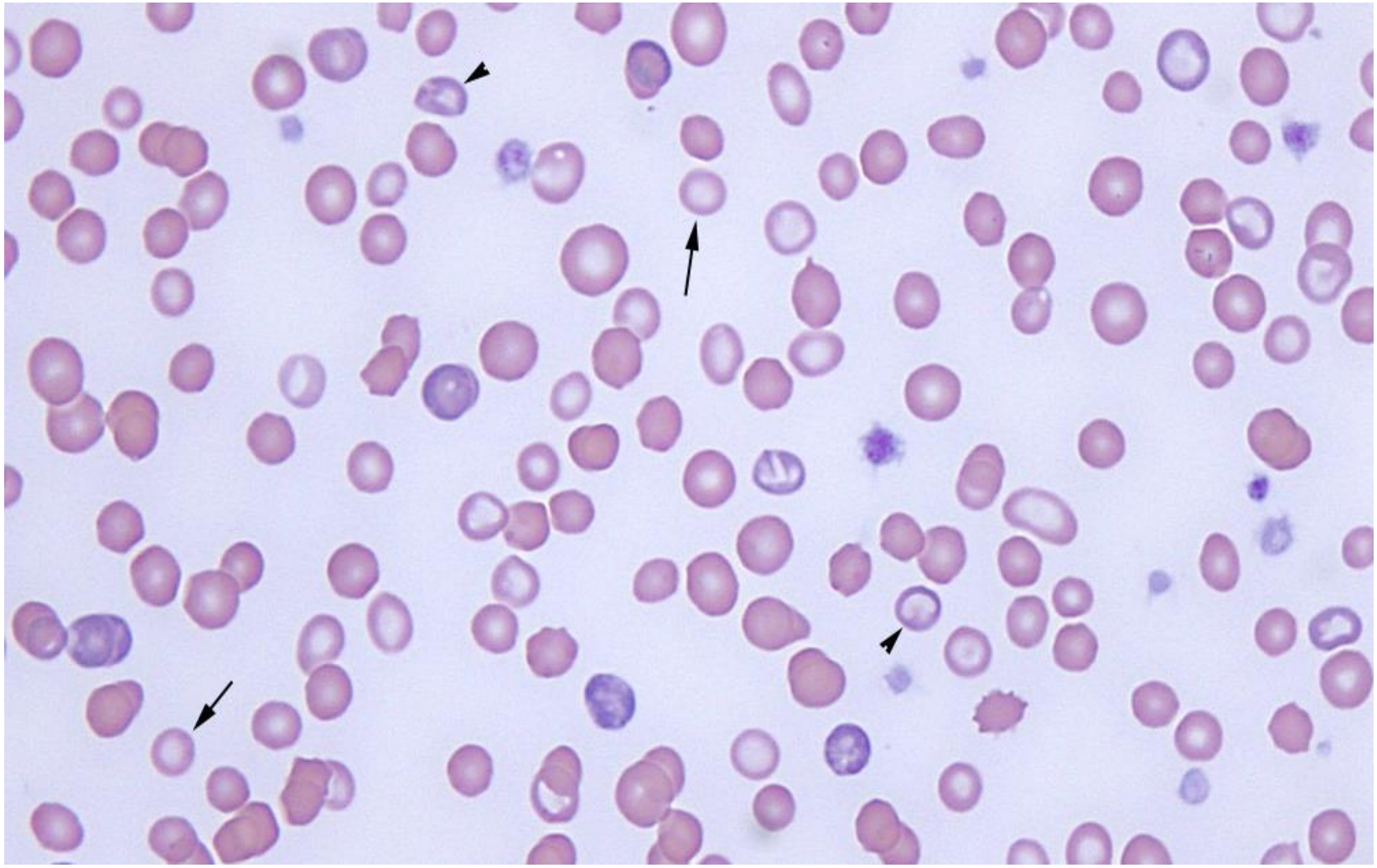


Гипохромия

Гиперхромия



Полихроматофилия



Форма эритроцитов

Пойкилоцитоз – изменение формы эритроцитов

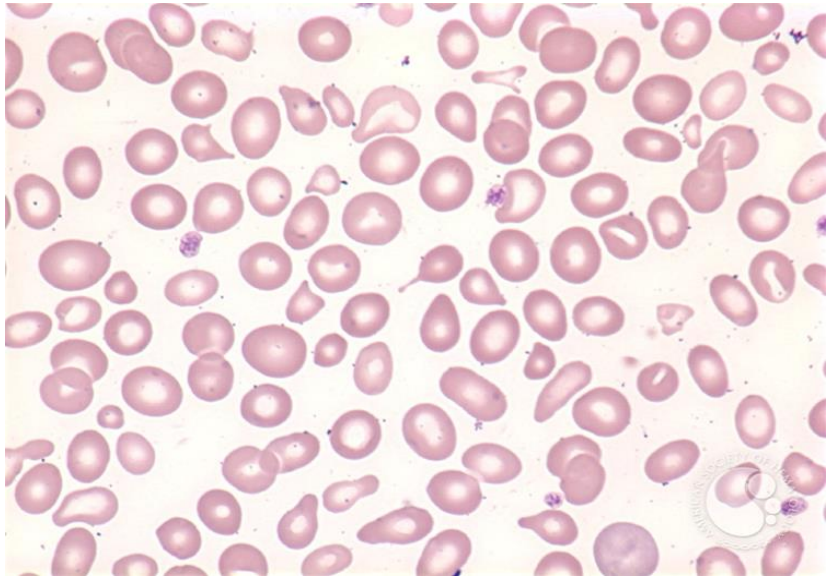
Классификация по степени тяжести.

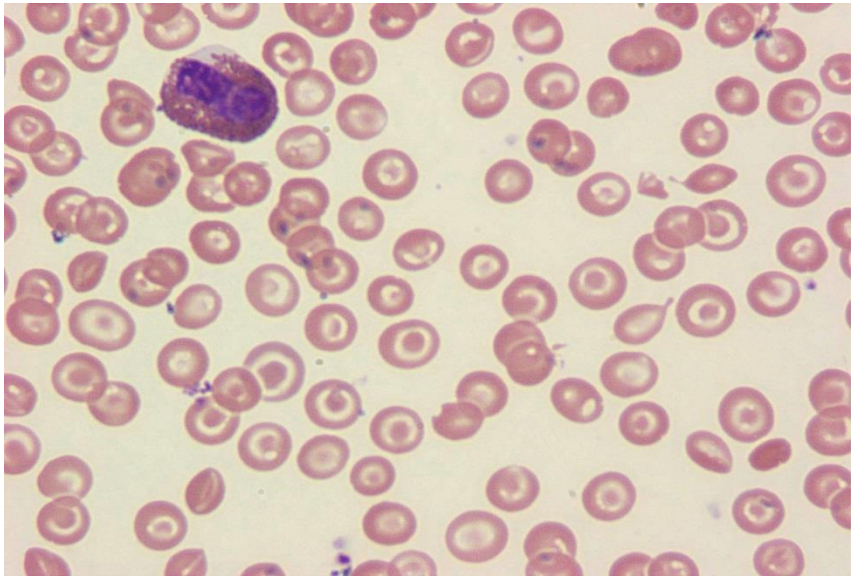
- Незначительный пойкилоцитоз (1, +) характеризуется деформацией 25 — 50 % эритроцитарных клеток, которые отличны от здоровых параметрами и формами
- Умеренный пойкилоцитоз (2, ++) обусловлен 50 — 70 % нездоровых видоизмененных телец
- При выраженном пойкилоцитозе (3, +++) повреждены 70 — 75 % эритроцитов
- Резко выраженный пойкилоцитоз (4, ++++) — патологической трансформации подвержены до 100 % эритроцитов

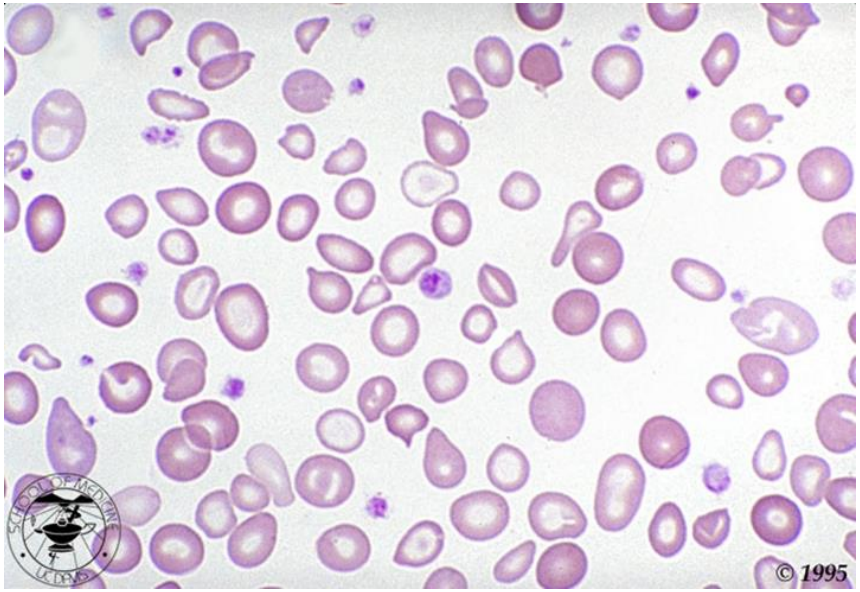
Варианты пойкилоцитоза

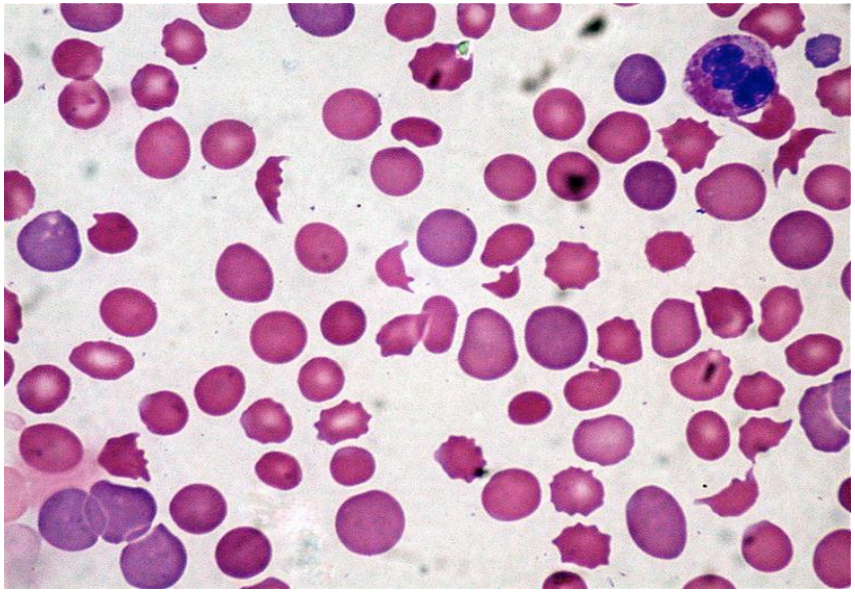
- Акантоцитоз — эритроциты шпорообразной формы с шиповидными выростами
- Анулоцитоз — красные кровяные клетки представлены пустыми колечками
- Дакриоцитоз — слезовидные клетки
- Дрепаноцитоз — серповидные клетки с преобладанием гемоглобина S — мутантной формы
- Кодоцитоз — внешне эритроциты похожи на мишень, с высокой концентрацией холестерина
- Микросфероцитоз — шаровидной формы с небольшой окружностью и толстыми стенками
- Гидроцитоз (стоматоцитоз) — представляют собой не круглые, а линейные клетки, напоминающие ротовое отверстие
- Эллиптоцитоз — овальные эритроциты, у здорового человека допустимо только 10 % подобных клеток
- Эхиноцитоз — сферические клетки с заостренными концами
- Сфероцитоз — клетки сферической формы, отсутствует светлый участок в центре.
- Планоцитоз — плоские или уплощенные клетки
- Шизоцитоз и кератоцитоз — фрагменты клеток, оставшихся после эритроцитов

Варианты пойкилоцитоза









Причины появления пойкилоцитоза

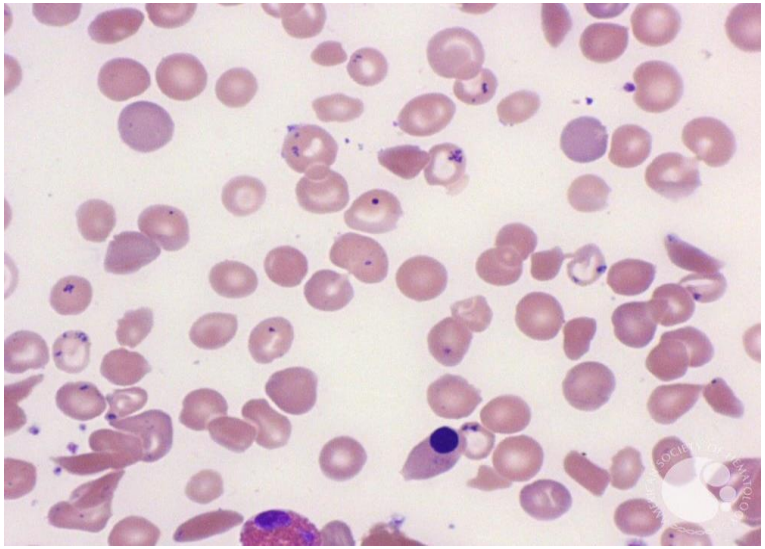
- В 80 % случаев развитие аномалии провоцирует хроническая или острая железодефицитная анемия
- Дефицит витаминов группы В и фолиевой кислоты
- Рак костного мозга, метастазирование в кости, миелодиспластический синдром
- Инфекции, протекающие с сильной интоксикацией организма
- Печеночные дисфункции: гепатиты, циррозы, доброкачественные и злокачественные новообразования
- Болезнь Гассера — проявляется острой почечной недостаточностью, а также разрушением эритроцитов и тромбоцитопенией
- Замена клапана сердца (протезирование)
- Гемоглобинопатии– талассемия, серповидноклеточная анемия

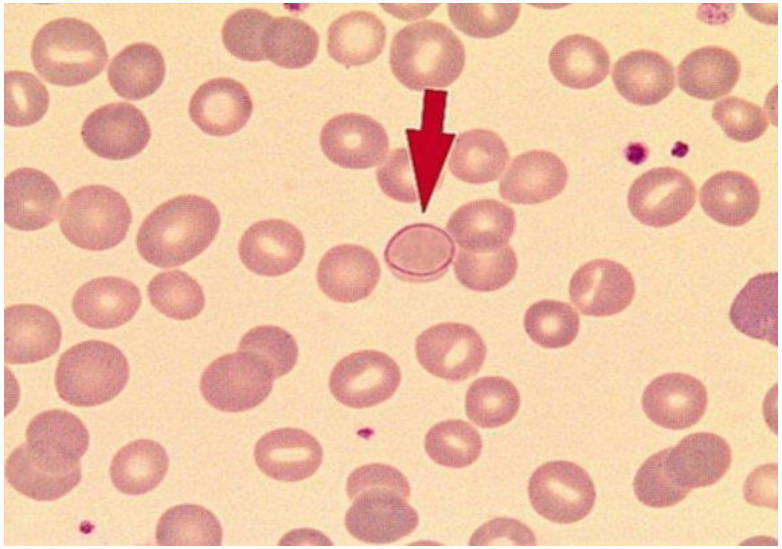
Пойкилоцитоз нередко возникает вследствие переливания крови, осложнений после сильного кровотечения!

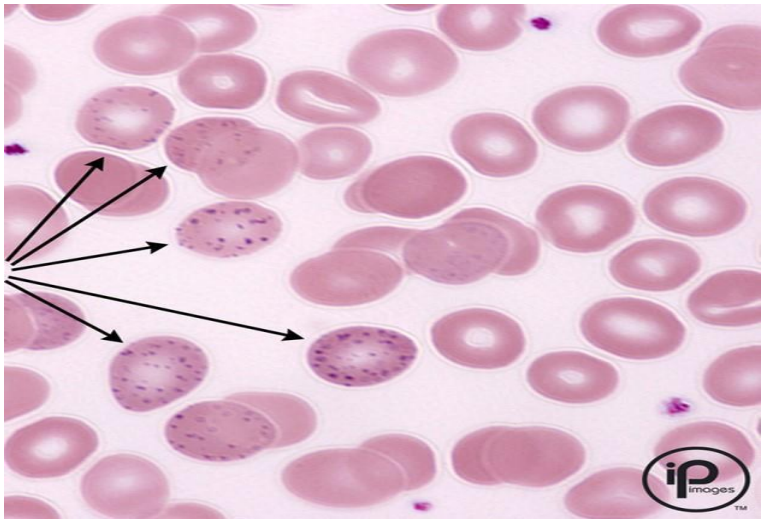
Включения в эритроцитах

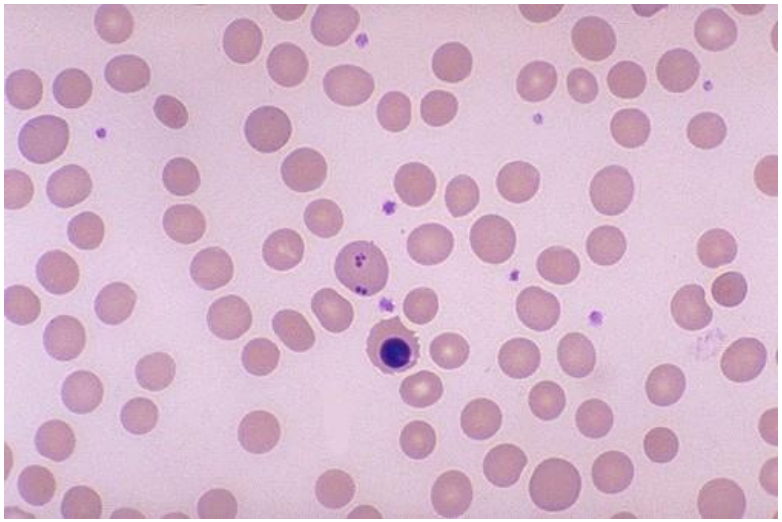
- Тельца Жолли (тельца Хауэлла-Жолли) - мелкие круглые фиолетово-красные включения размером 1 - 2 мкм, встречаются по 1 (реже по 2 - 3) в одном эритроците.
- Кольца Кебота - остатки оболочки ядра эритрокариоцита в виде восьмерки или кольца, окрашиваются в красный цвет.
- Базофильная зернистость (пунктация) эритроцитов - гранулы сине-фиолетового или синего цвета, различного размера, располагаются чаще по периферии эритроцита или нормобласта, представляет собой агрегированную базофильную субстанцию (остатки рибосом).
- Сидерозные (железосодержащие) гранулы - представляют собой связанное с митохондриями внутриклеточное железо (гемосидерин, ферритин), не включенное в гемоглобин, которое окрашивается берлинской лазурью в синий цвет.
- Тельца Гейнца-Эрлиха - маленькие округлые включения (единичные или множественные) размером 1 - 2 мкм, образуются из денатурированного гемоглобина.

Включения в эритроцитах









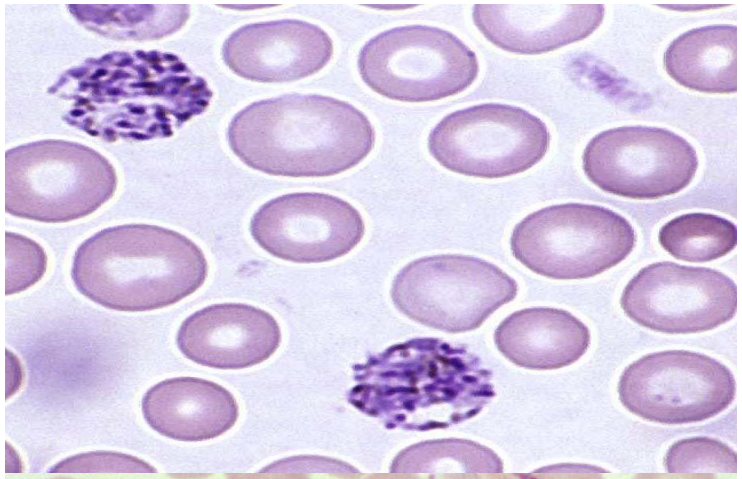
Включения в эритроцитах при малярии

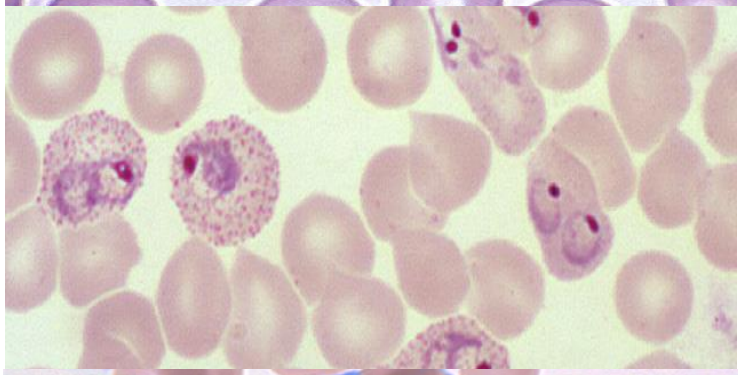
Ранние кольцевидные формы - трофозоит. Синеватого цвета и могут иметь на концах красную точку (точки)

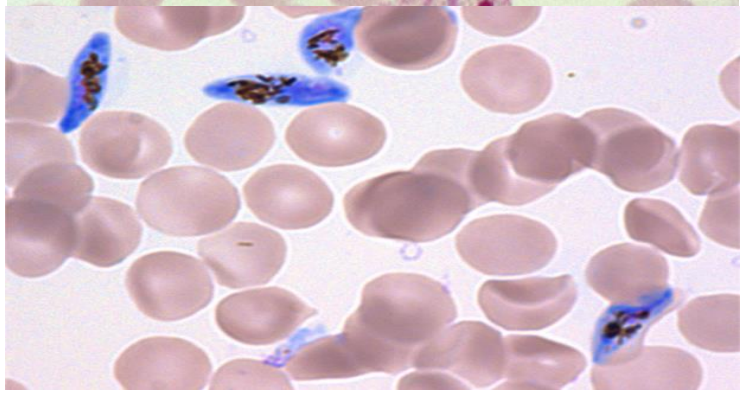
При инвазии P.vivax и P.ovale пораженные возбудителем эритроциты увеличиваются в диаметре и содержат характерную зернистость Шюффнера - мелкие розово-красные включения, иногда в значительном количестве

При разделении зрелые шизонты образуют от 4 до 20 ядер

Гаметоциты большие, имеют округлую или продолговатую форму. P.falciparum распознаются по характерной конфигурации макрогаметоцитов виде бананов







Подсчет лейкоцитарной формулы

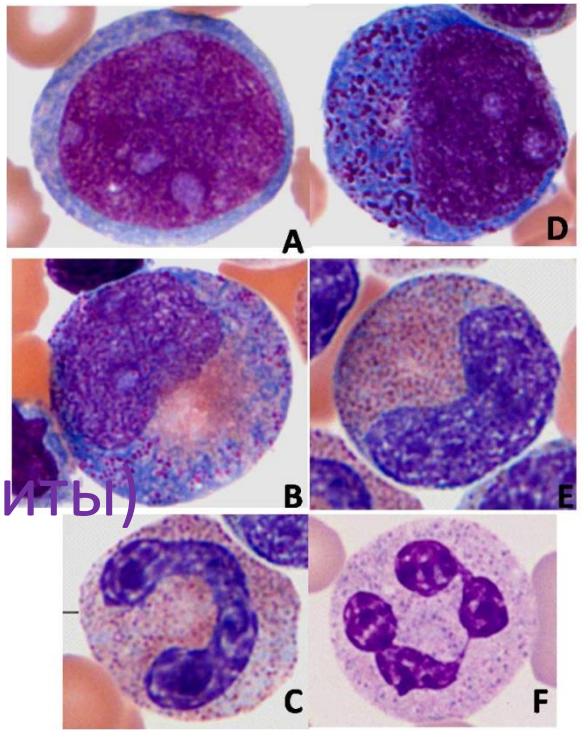
Нормальные показатели лейкоцитарной формулы:

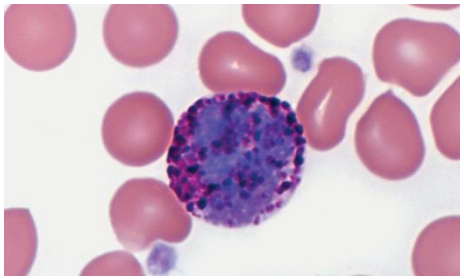
- Нейтрофилы: палочкоядерные – 1 – 6 % сегментоядерные – 45 – 70 %
- Эозинофилы – 0-5% Базофилы– 0-1%
- Моноциты– 2-9%
- Лимфоциты – 18 – 40%

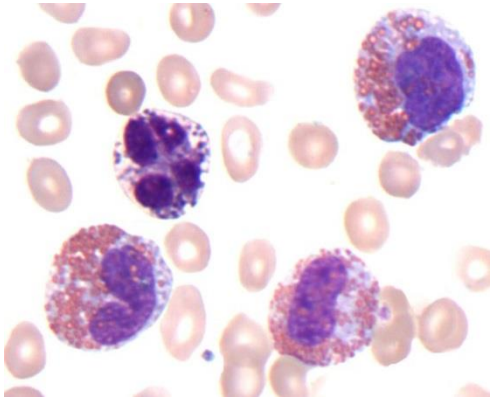
Подсчет лейкоцитарной формулы проводят в окрашенном мазке с использованием микроскопа при большом увеличении с использованием иммерсионной системы

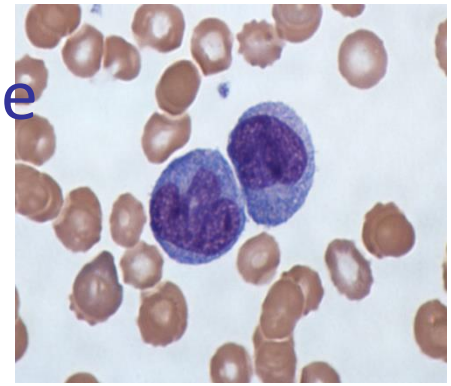
Лейкоциты

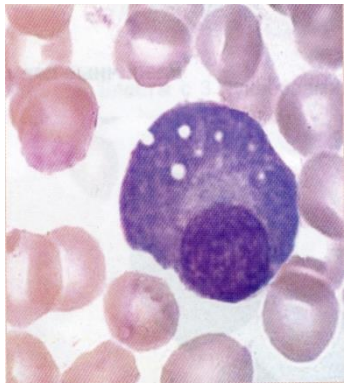
- Базофилы
- Эозинофилы
- Нейтрофилы
- Промиелоциты
- Миелоциты
- Юные (метамиелоциты)
- Палочкоядерные
- Сегментоядерные
- Лимфоциты
- Плазматические клетки
- Моноциты

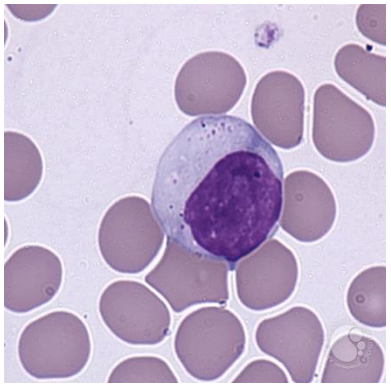




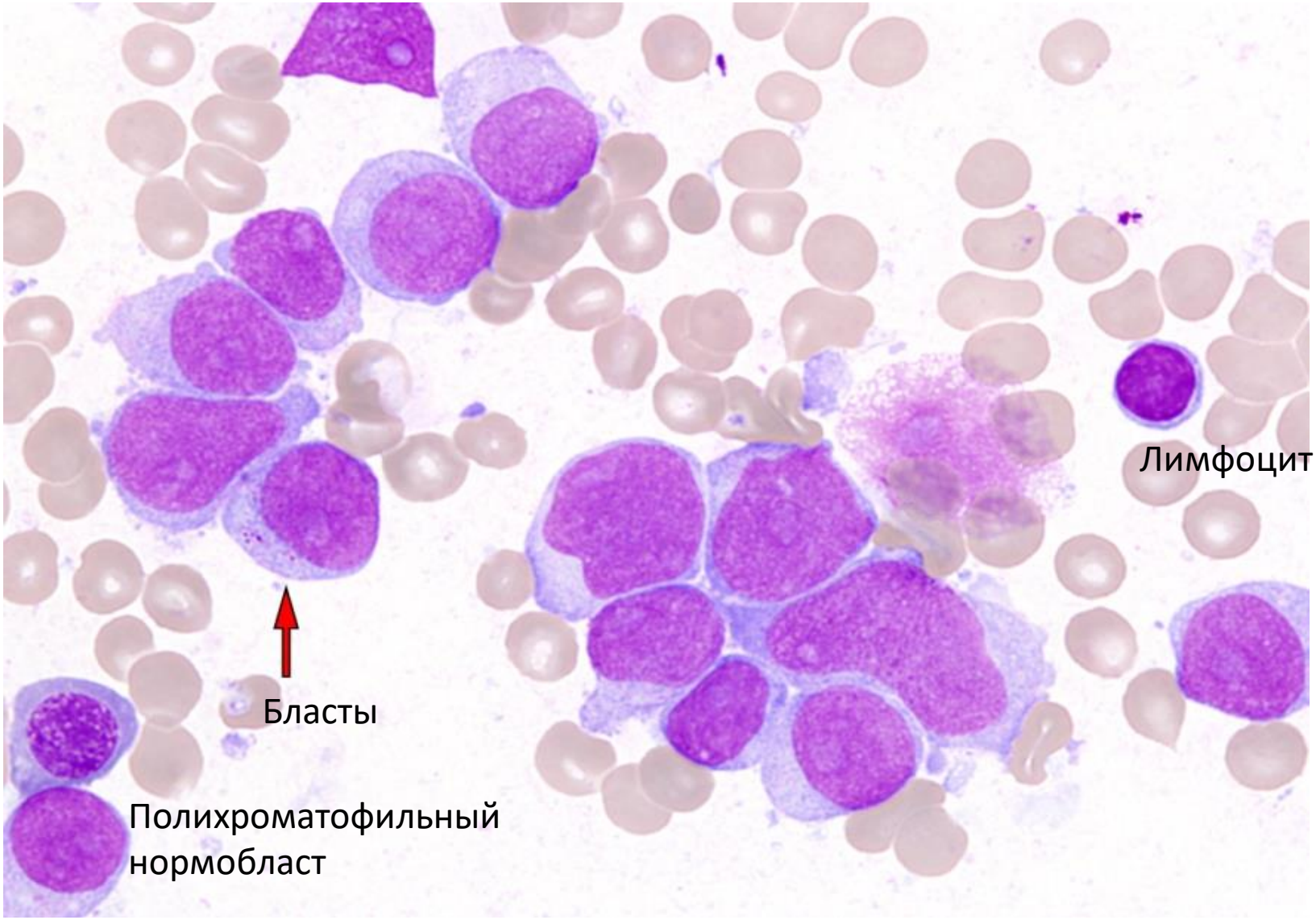




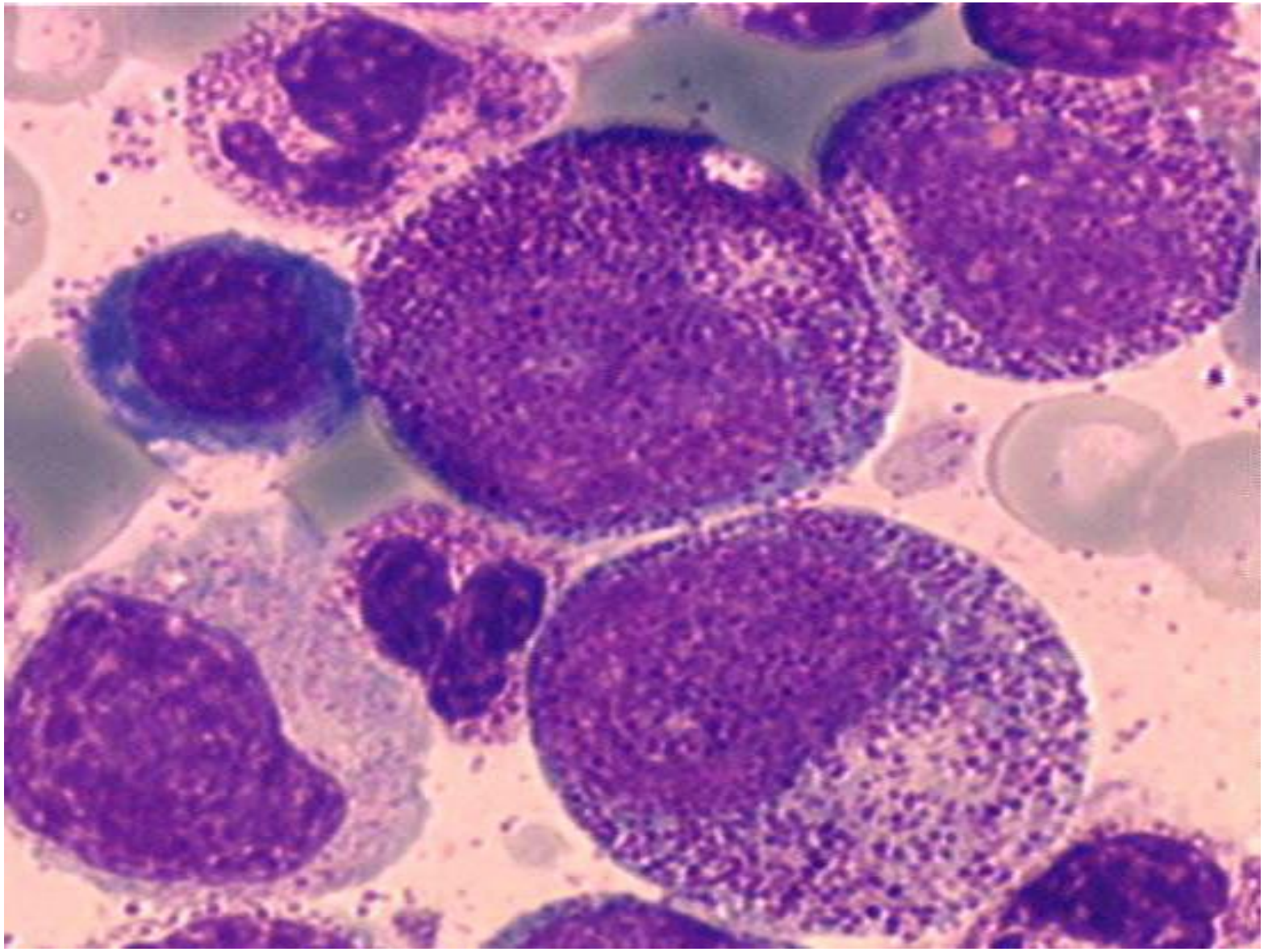




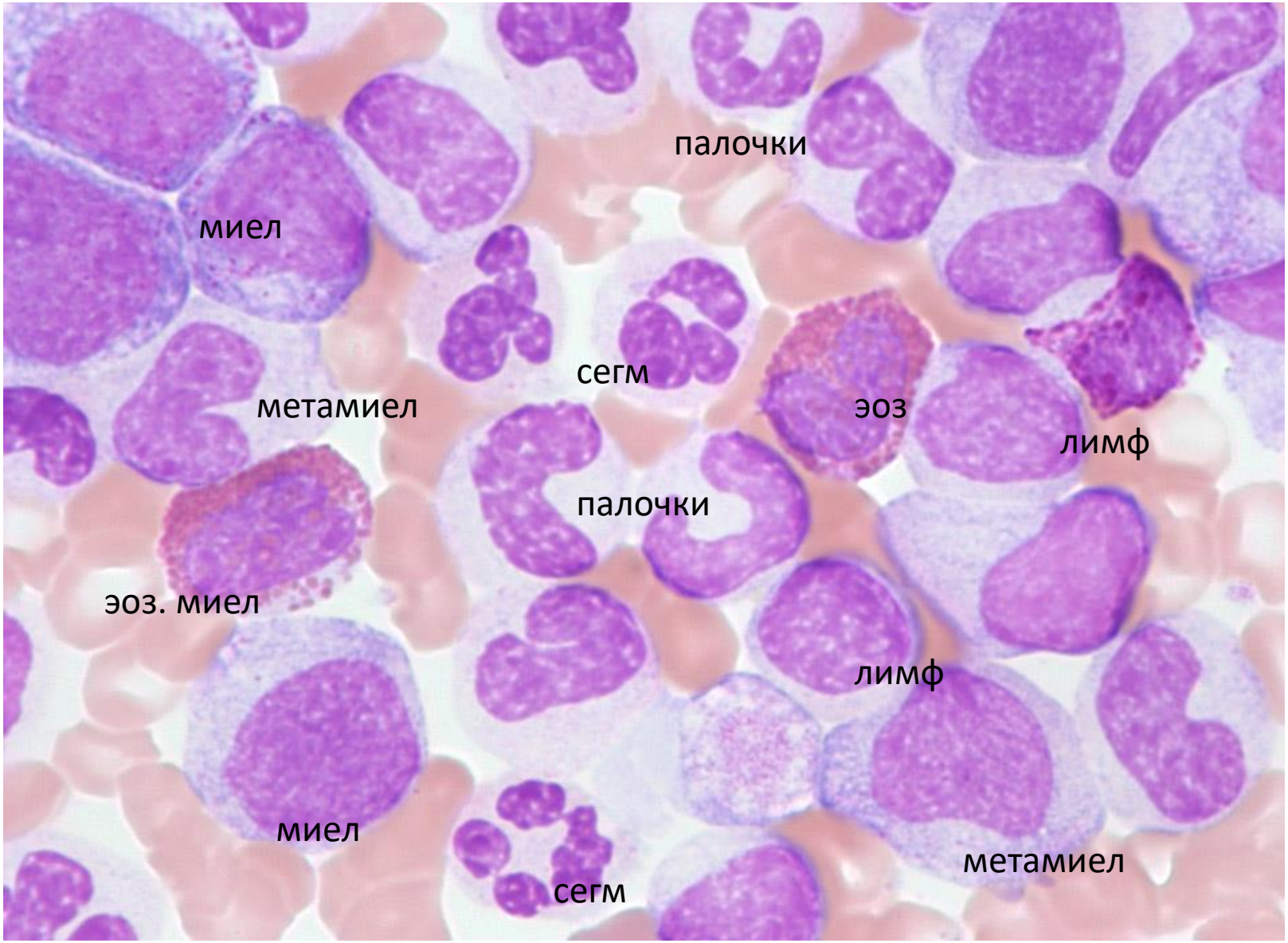
Бласты



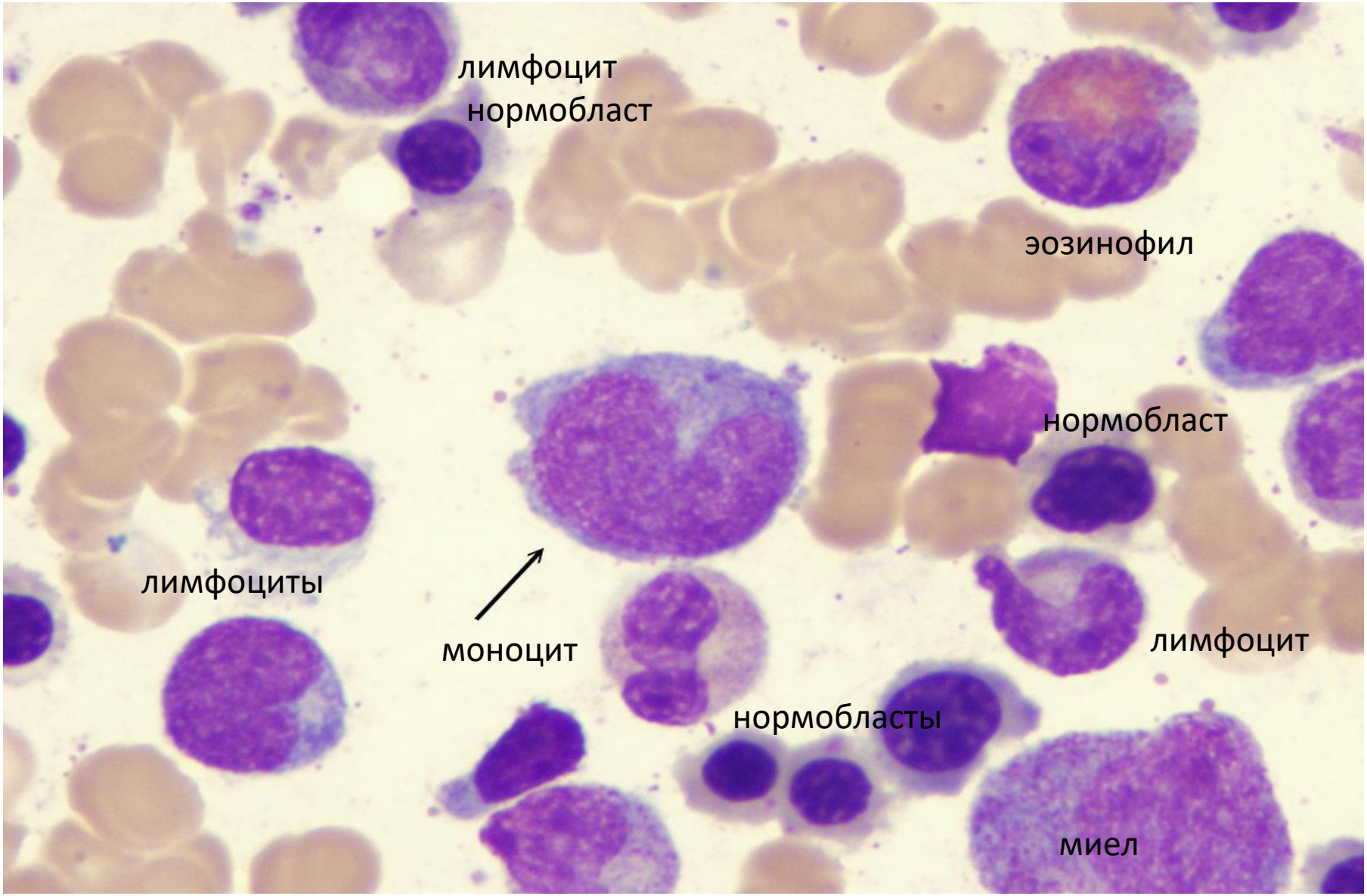
Промиелоциты



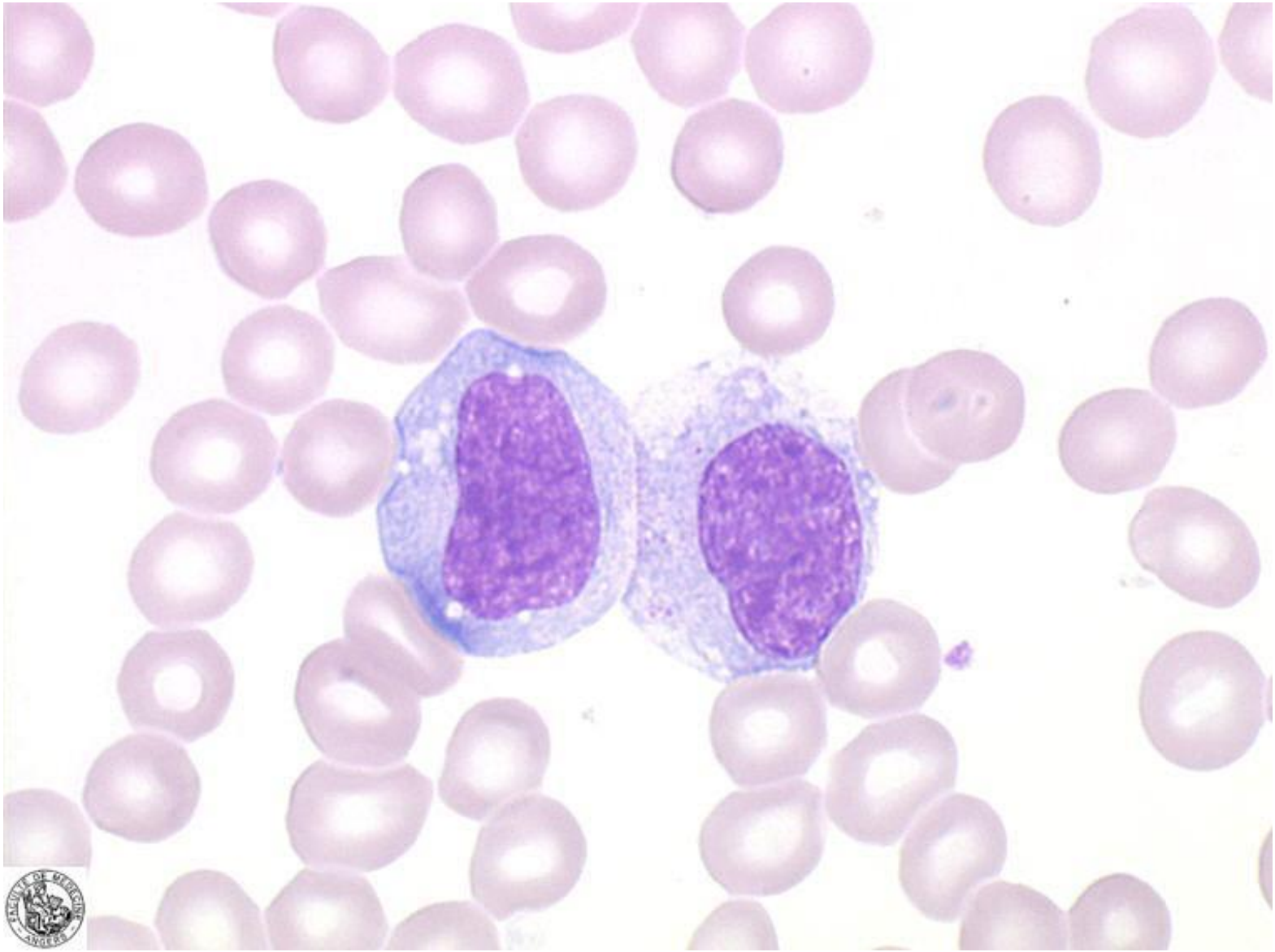
Гранулоциты



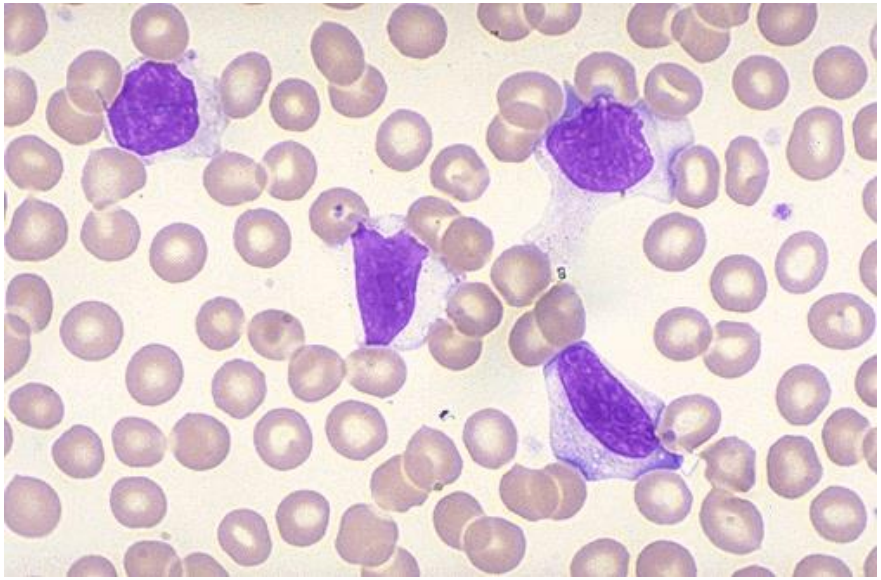
Лейкоциты

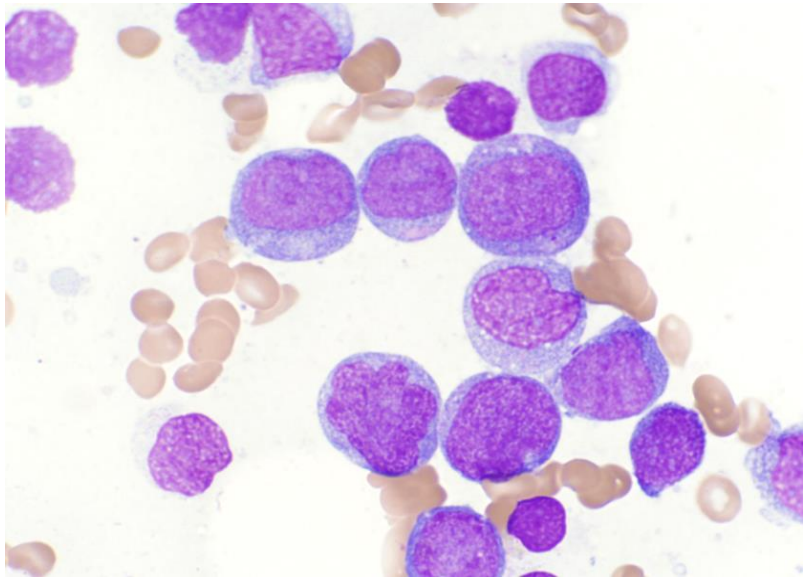

лимфоцит
нормобласт
эозинофил
нормобласт
лимфоциты
моноцит
лимфоцит
нормобласты
миел

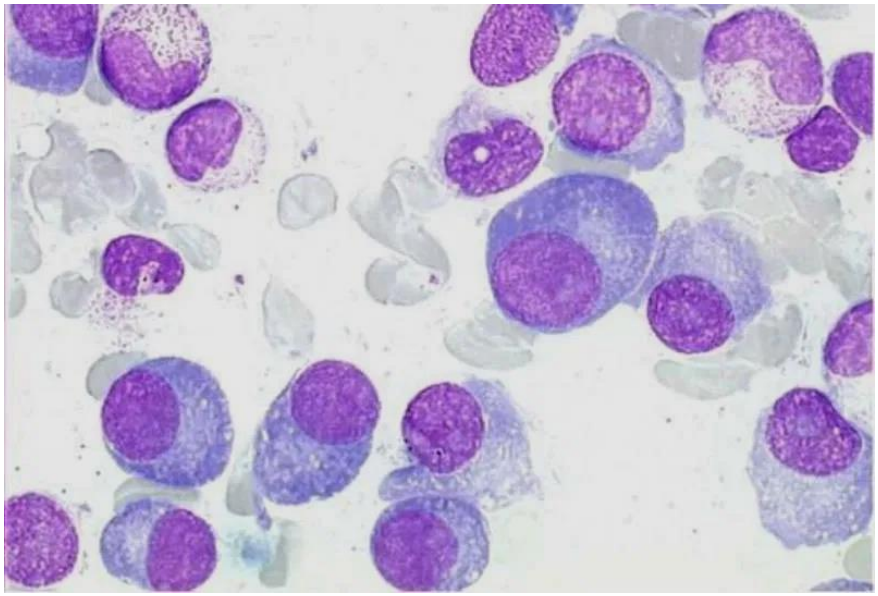
Моноциты

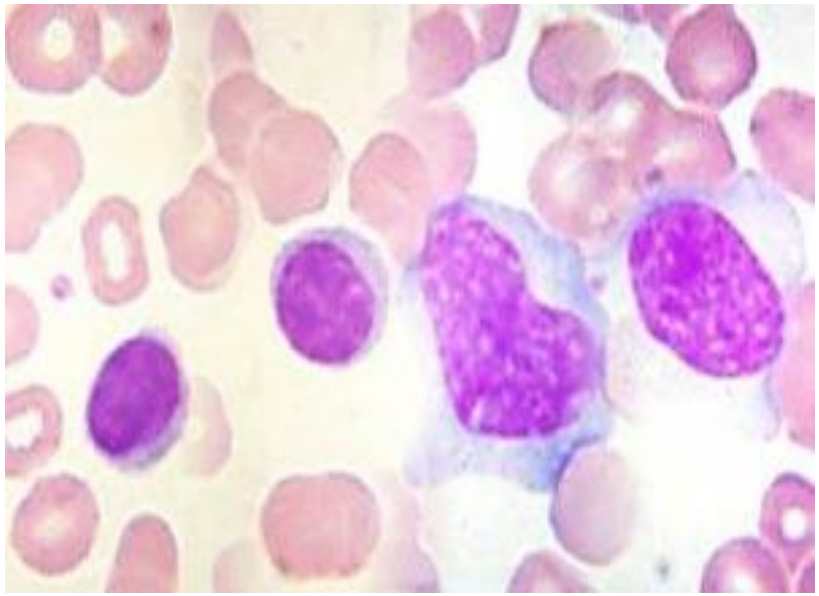


Анизоцитоз лимфоцитов

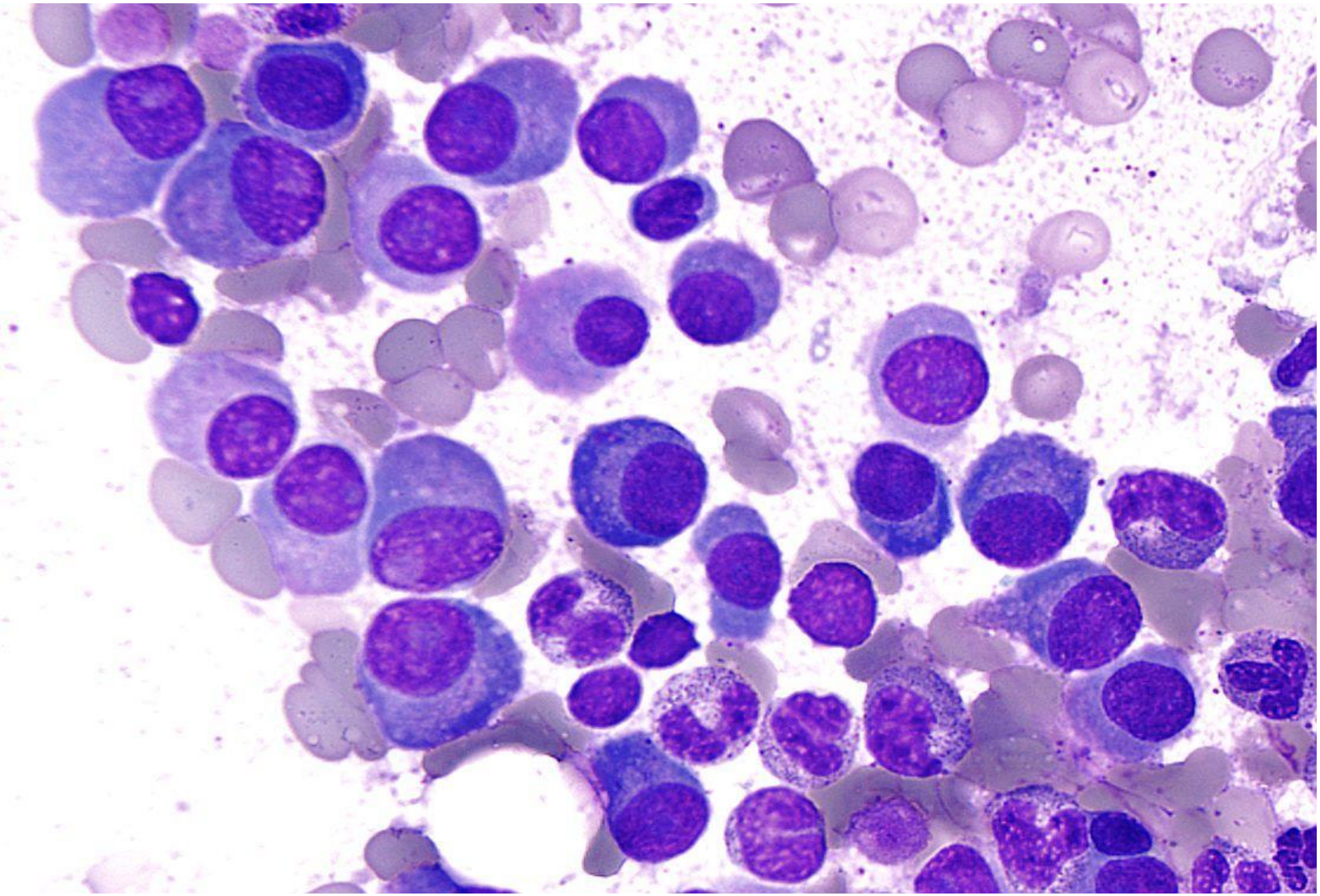






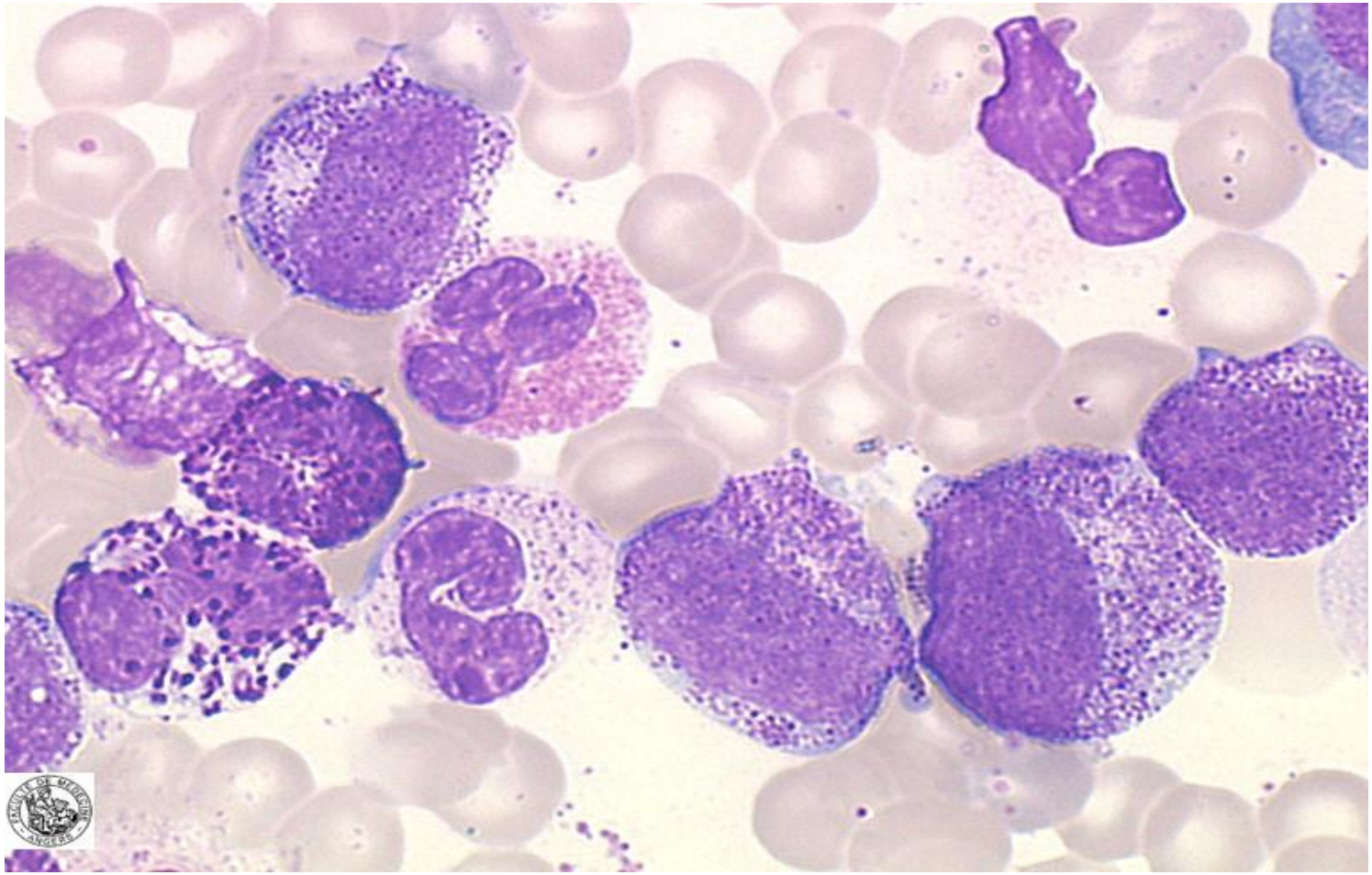


Плазмоциты и плазмобласты, множественная миелома



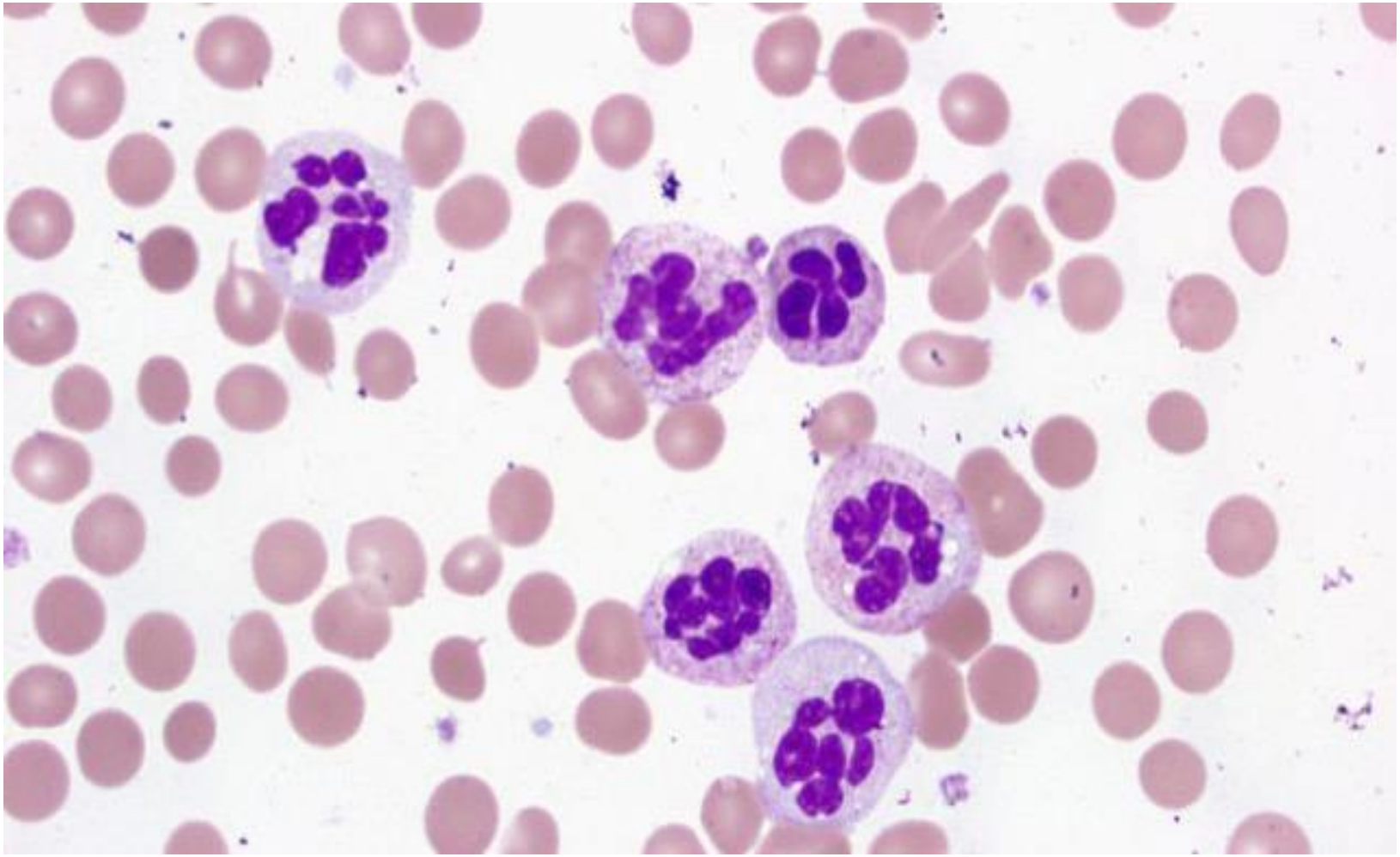
Токсическая зернистость нейтрофилов

Грубая зернистость, сходная с азурофильными гранулами. Образование ее происходит внутри клетки в результате физико-химических изменений белковой структуры



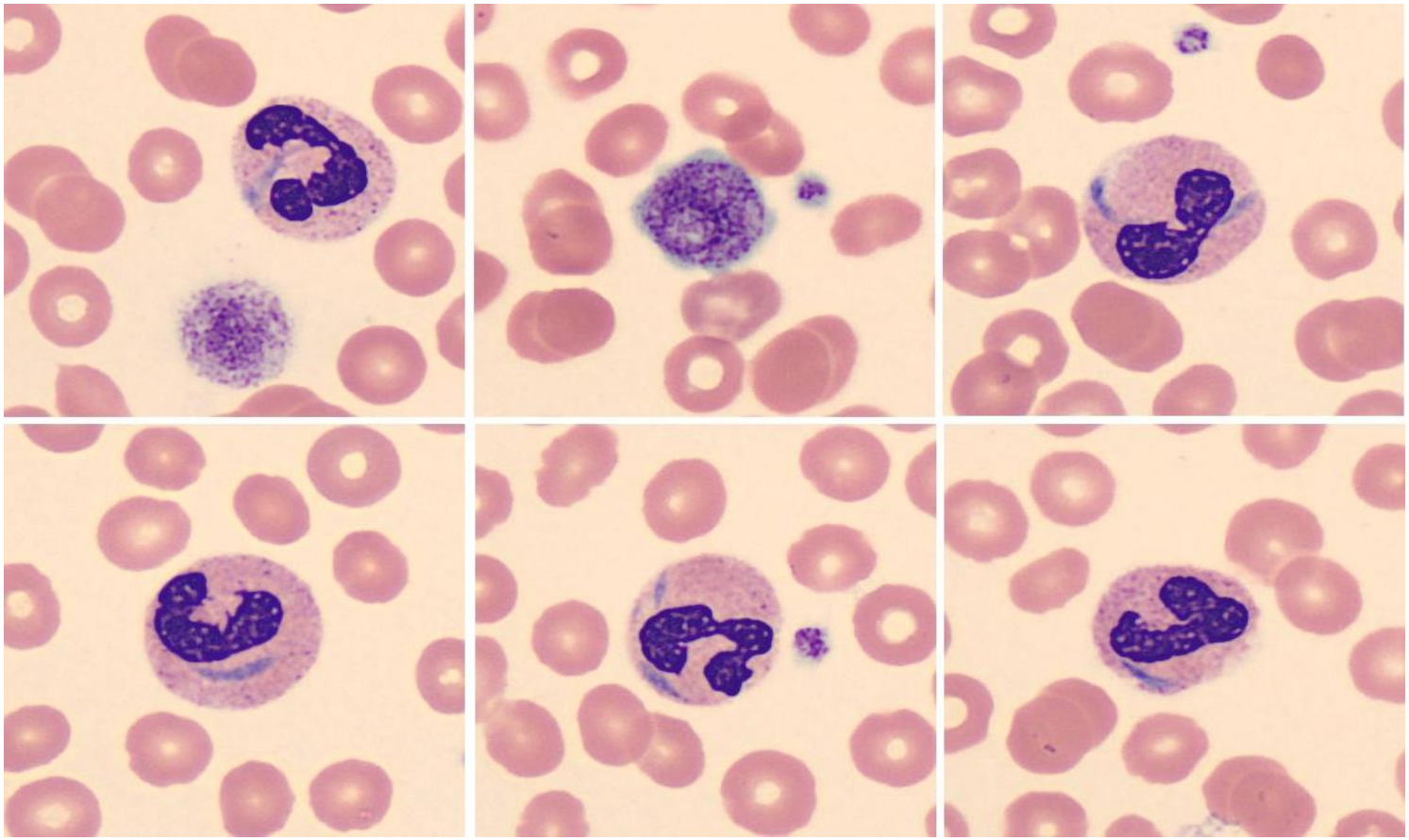
Гиперсегментация ядер нейтрофилов

Ядро имеет более пяти долей, соединенных тонкой хроматиновой нитью



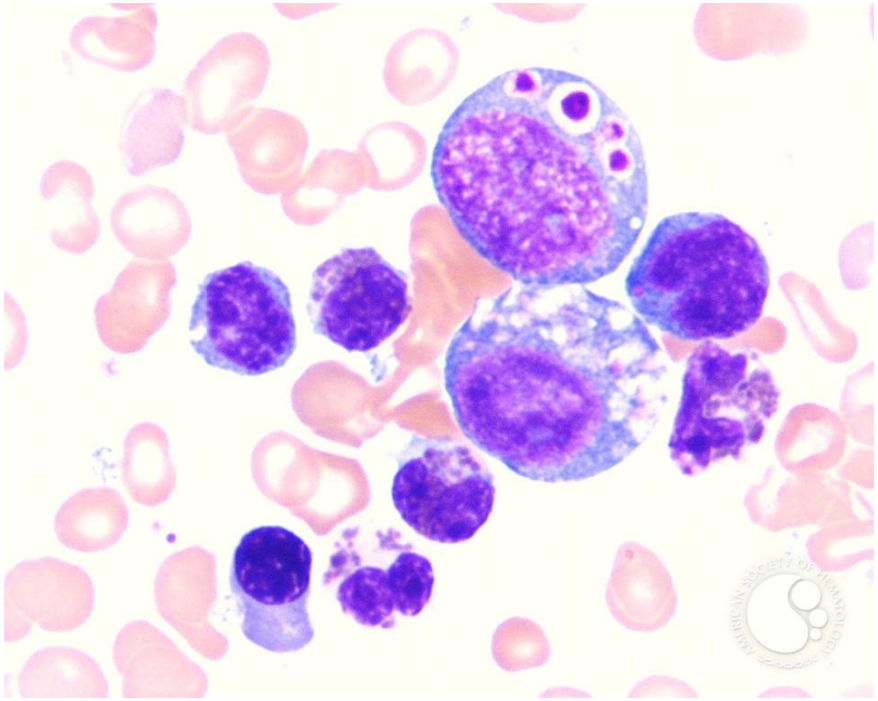
Гипосегментация ядер нейтрофилов

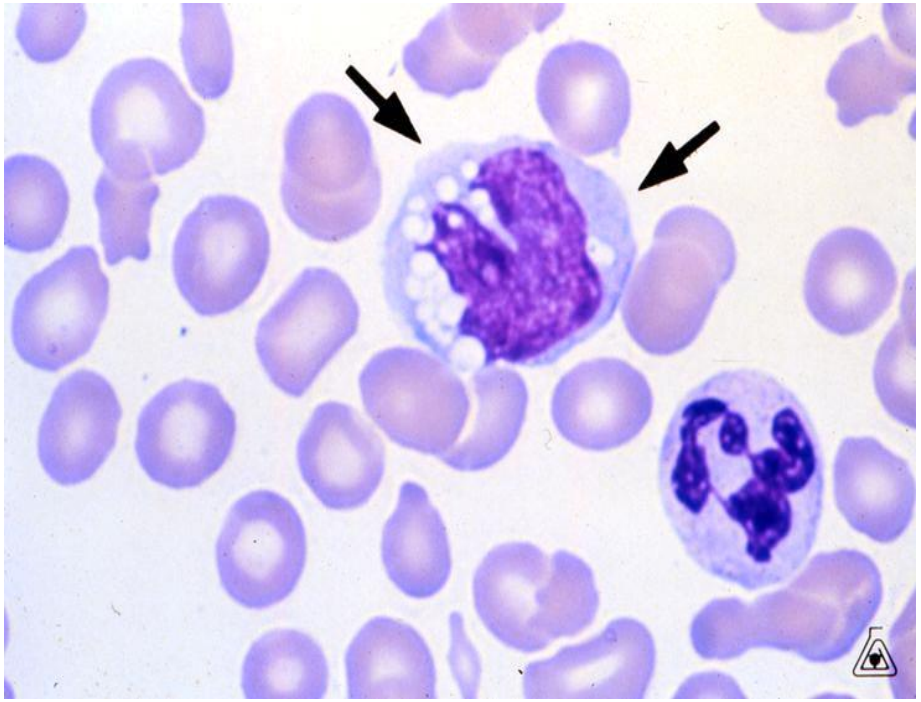
Пельгероид, псевдопельгеровская аномалия - увеличение количества двусегментированных нейтрофилов, а также палочкоядерных нейтрофилов и нейтрофилов с круглым ядром. При этом хроматин имеет плотную структуру



Вакуолизация цитоплазмы

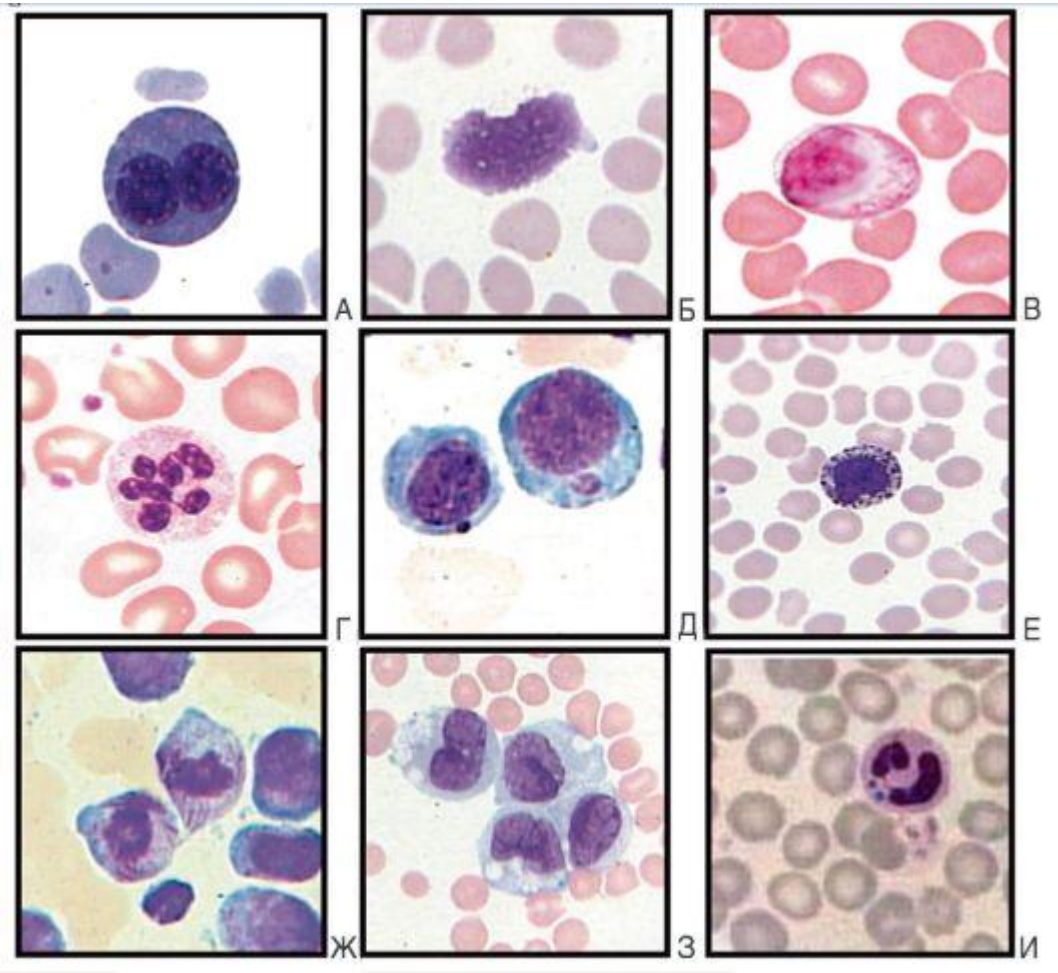
Цитоплазматические вакуоли – активация фагоцитоза, наблюдаются при тяжелых инфекциях, часто в сочетании с токсической зернистостью и тельцами Деле.





Дегенеративные изменения нейтрофилов

- Пельгероид (А)
- Хроматинолиз - при распаде хроматин теряет свою нормальную структуру – растворяется
- Кариолиз - растворение лишь части ядра с сохранением его нормальной структуры (В)
- Фрагментоз - процесс при котором от ядра отделяются отдельные фрагменты (частицы) (Г, Д)
- Пикноз - уплотнение базихроматина ядра. Ядро при этом становится темным, бесструктурным. Размер клетки уменьшается (Е, Ж)
- Кариорексис - распад ядра на отдельные части, не связанные между собой, округлой формы и резко пикнотичные, темные бесструктурные образования (И)
- Вакуолизация (З)
- Цитолиз — распад клетки. Цитоплазма чаще отсутствует. Ядро теряет свою обычную структуру, контуры его расплывчатые (Б)

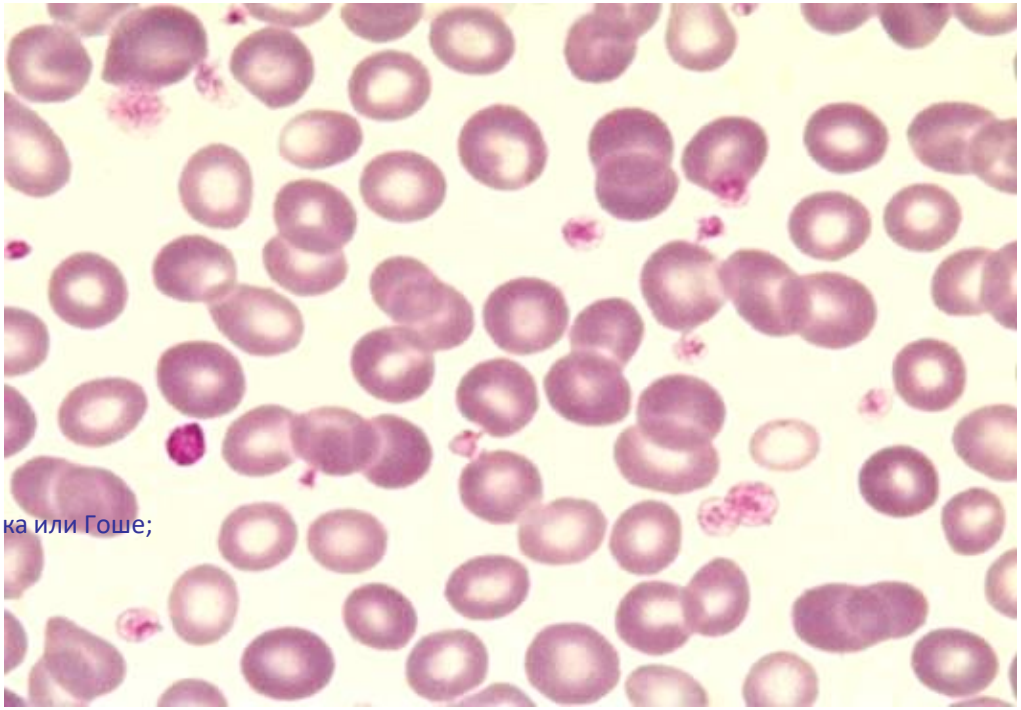


Анизоцитоз тромбоцитов

- Показатель PDW характеризует уровень отклонения объемов тромбоцитов от средних величин. Референсное значение -14 – 18 %.

Причины

- миелодиспластический синдром, онкология, паразитарная инвазия.
- Изменение диаметра частиц в большую сторону может быть связано с такими состояниями:
- недостаточное поступление железа или витаминов;
- метастазы в костном мозге;
- миелодиспластический синдром;
- наличие болезней воспалительной или инфекционной природы, приводящих к тяжелой интоксикации;
- гемотрансфузия;
- глистная или паразитарная инвазия;
- поражение стенок сосудов;
- реабилитация пациентов после хирургической операции;
- иссечение селезенки;
- длительный прием кортикостероидов;
- тромбоцитопения аутоиммунного происхождения.



Индекс анизоцитоза понижается на фоне:

- лейкемии;
- апластической анемии;
- лучевой болезни;
- продолжительного лечения цитостатиками;
- тромбоцитопатий;
- спленомегалии;
- септического состояния;
- малокровия мегалобластного типа;
- болезней накопления, например, болезнь Ниманна-Пика или Гоше;
- гемолитико-уремического синдрома;
- хронического протекания гепатита;
- цирроза печени;
- ДВС-синдрома.

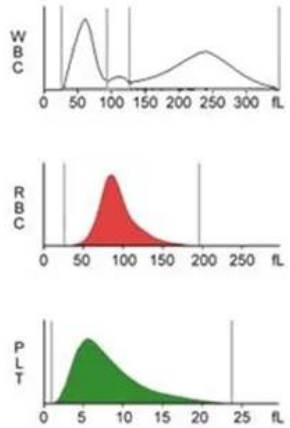
Новые технологии

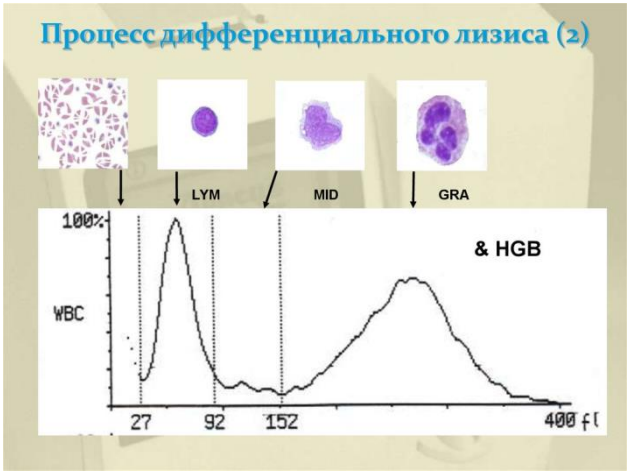
Возможности современных гематологических анализаторов

- Автоматический подсчет числа ядросодержащих эритроцитов, предоставление информации о микроцитах и макроцитах
- Функция дифференциального подсчета незрелых гранулоцитов и выявление отклонений лейкоцитов
- Подсчет ретикулоцитов, обнаружение фракций ретикулоцитов (фракция незрелых ретикулоцитов, ретикулоциты с низкой, умеренной и высокой флуоресценцией), которые отражают стадии созревания и, следовательно, активность эритропоэтина, отражение уровня гемоглобинизации ретикулоцитов
- Флуоресцентно-оптический анализ тромбоцитов. Подсчеты незрелых тромбоцитов производятся методом, полностью исключающим наличие фрагментированных эритроцитов или разрушенных лейкоцитов
- Система флагов для лейкоцитов-прекурсоров помогает диагностировать миелоидные и лимфатические заболевания с подлинной диагностической достоверностью
- Автоматизированная подготовка и окраска предметных стекол. Данная функция позволяет значительно сократить долю ручных операций

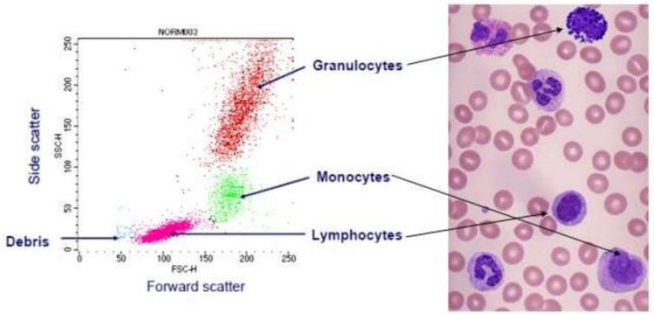
Визуализация в гематологии

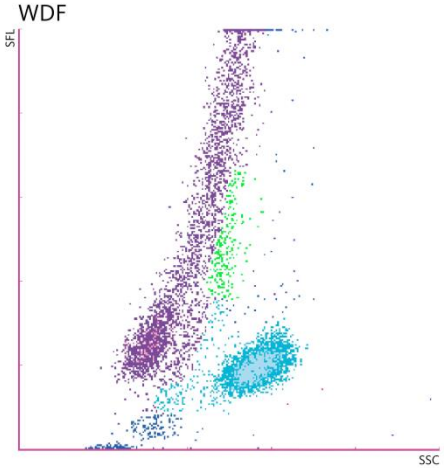
Гистограммы и скатерограммы

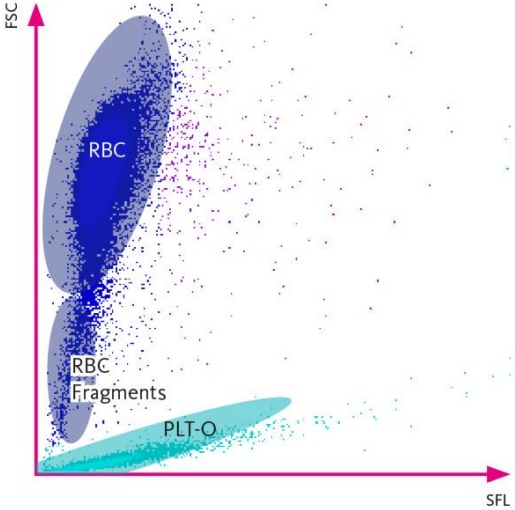


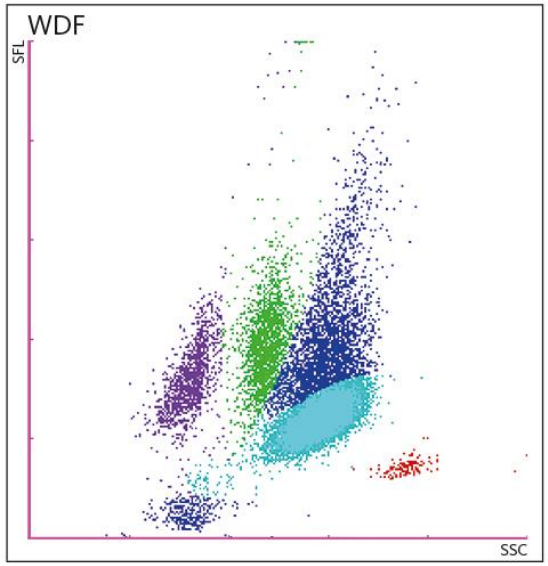


Скатерограмма









Однако несмотря на эти впечатляющие результаты, именно микроскопия до сих пор пока остается «золотым стандартом» диагностики

Спасибо за внимание!