

SEED Hematologia



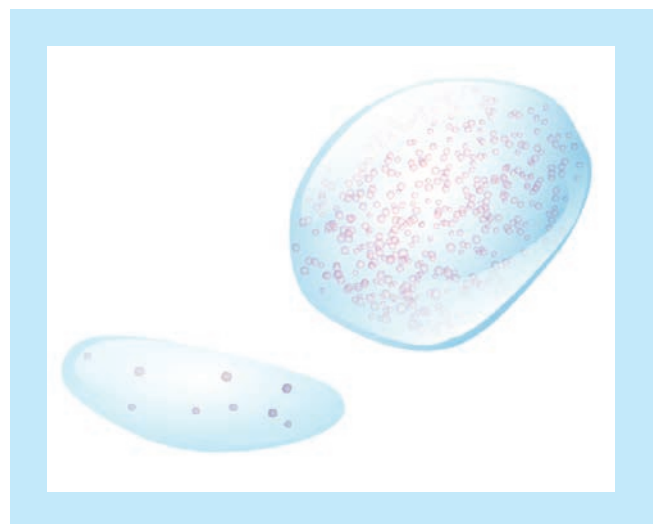
Płytki krwi i znaczenie ich wiarygodnego oznaczenia

Produkcja płytek

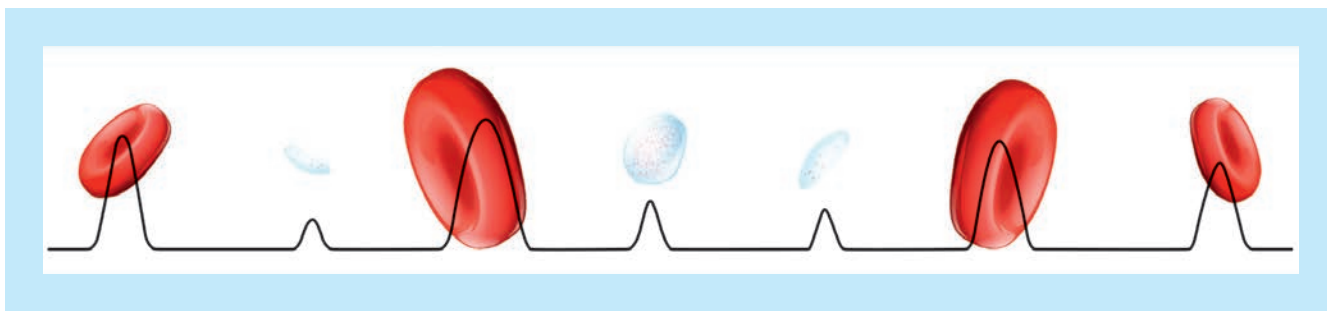
Płytki krwi, tak jak opisał je po raz pierwszy Wright [1], są to małe, bezjądrzaste „wydłużenia” cytoplazmy megakariocytów. Komórki prekursorowe płytek są obecne w szpiku i rozwijają się z komórek macierzystych w procesie trombopoëzy (tworzenia płytek). W procesie produkcji płytek, wokół ziarnistości w cytoplazmie megakariocytów, formują się błony komórkowe, które następnie różnicują się do podjednostek płytkowych. Po osiągnięciu pewnego poziomu dojrzałości, płytki uwalniane są do krwi obwodowej.

Płytki to najmniejsze elementy morfotyczne krwi, o średnicy 1 – 4 μm i objętości 2 – 20 fl, przy czym młodsze płytki krwi są większe niż płytki dojrzałe (ryc. 1). Nie posiadają one jądra komórkowego, a jedynie szczątkowe mRNA pochodzące z megakariocytów.

Prawidłowa liczba płytek w krwi człowieka wynosi $166 - 308 \times 10^9/\text{l}$ u mężczyzn oraz $173 - 390 \times 10^9/\text{l}$ u kobiet [2]. Wartości poza tymi zakresami nie muszą świadczyć o występujących zaburzeniach. W celu dopasowania zakresów referencyjnych do populacji pacjentów, zalecane jest wyznaczenie lub weryfikacja zakresów referencyjnych zgodnie z metodami rekomendowanymi przez Międzynarodową Federację Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej (IFCC) [3].



Ryc. 1 Ilustracja płytki dojrzałej (po lewej) i niedojrzałej (po prawej)



Ryc. 2 Prezentacja wytwarzanych sygnałów oporu elektrycznego proporcjonalnych do objętości komórki

Ocena liczby płytek krwi

Istnieje kilka metod umożliwiających ocenę liczby płytek krwi obwodowej. Początkowo wykonywało się to w komorach zliczeniowych, natomiast w dzisiejszych czasach pomiar liczby płytek dokonywany jest niemalże wyłącznie na zautomatyzowanych analizatorach hematologicznych, w trakcie badania podstawowej morfologii krwi.

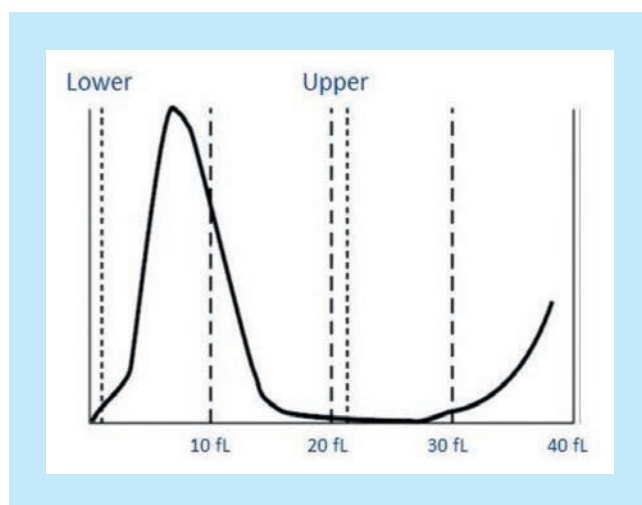
Zautomatyzowane określenie liczby płytek zastąpiło ich zliczanie w komorach już wiele lat temu. Ułatwiło ono znacząco oraz widocznie ulepszyło oznaczanie liczby komórek. Jednym z najważniejszych powodów automatycznego zliczania – pomijając oszczędność czasu – jest wyraźnie wyższa dokładność, dzięki większej liczbie analizowanych komórek. Jednakże, techniczna walidacja liczby płytek nie jest tak prosta i czasami wymaga weryfikacji w rozmiarze mikroskopowym.

Zasada pomiaru metodą impedancyjną

Metodę tę stosuje się od wielu lat. Wykorzystywana jest przez wszystkie analizatory dostępne na rynku i stanowi bardzo dobrą metodę w przypadku braku interferencji.

Podczas pomiaru impedancyjnego, komórki przechodzą jedna po drugiej przez otwór kapilary – aperturę. Po każdej stronie apertury znajdują się elektrody, między którymi przepływa stały prąd. Przechodząca komórka generuje zmianę natężenia prądu stałego, tym samym powstaje sygnał elektryczny proporcjonalny do wielkości komórki (ryc. 2). Dzięki temu, komórki identyfikowane są na podstawie ich rozmiaru i zostają zaprezentowane w postaci krzywej rozkładu objętości, tzw. histogramu (ryc. 3).

Ta metoda pomiarowa została udoskonalona w nowszych aparatach dzięki ogniskowaniu hydrodynamicznemu. Jest to metoda, w której płyn opłaszczający otacza strumień cząstek tak, aby przechodziły one przez środek kapilary pomiarowej, jedna po drugiej (ryc. 4). Wyklucza to interferencje, takie jak przypadkowe, podwójne przejście, recyrkulację itp., dzięki czemu komórki są zliczane z większą dokładnością.



Ryc. 3 Przykład histogramu płytkowego

W warunkach fizjologicznych, erytrocyty (RBC) i płytki różnią się znacząco rozmiarem i mogą być łatwo różnicowane metodą impedancyjną. Dzięki płynnym dyskryminatorom (dolny i górny dyskryminator; ryc. 3) populacje komórek są od siebie optymalnie oddzielone. Górny dyskryminator jest tym, który oddziela płytki krwi (fizjologiczna objętość 8 – 12 fl, zliczane w zakresie 2 – 30 fl) od erytrocytów (fizjologiczna objętość 80 – 100 fl, zliczane w zakresie 25 – 250 fl). Jednakże w warunkach patologicznych, kiedy płytki są większe niż 30 fl (np. płytki olbrzymie) lub kiedy erytrocyty są mniejsze niż 25 fl (np. fragmentocyty), dokładny rozdział nie jest zagwarantowany. W takich przypadkach analizator hematologiczny zwykle wyświetla komunikat ostrzegawczy, a użytkownik musi sprawdzić wiarygodność wyniku inną metodą.

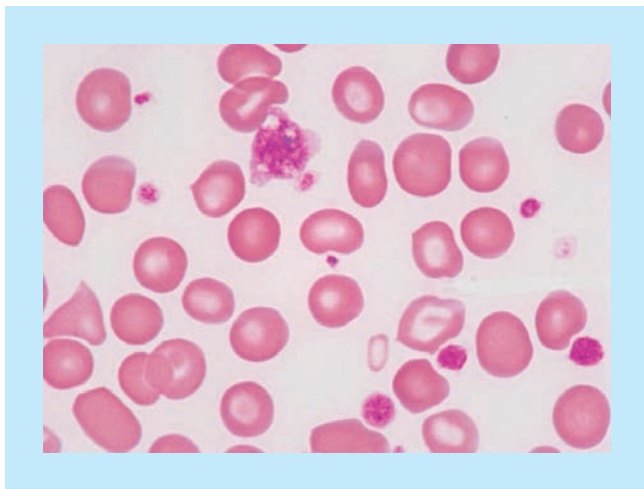


Ryc. 4 Przepływ cząsteczek w metodzie ogniskowania hydrodynamicznego

Możliwe interferencje w metodzie impedancyjnej

Interferencje analityczne mogą powodować fałszywie zaniżoną lub zawyżoną liczbę płytek. Poniżej opisano czynniki, które mogą powodować wystąpienie interferencji w metodzie impedancyjnej.

Płytki olbrzymie



Ryc. 5 Płytki olbrzymie u pacjenta z nadpłytkowością samoistną (ET)

Bardzo duże płytki – większe niż przeciętny erytrocyt – nazywane są płytkami olbrzymimi (przykład zaprezentowano na ryc. 5). Pojawiają się w chorobach wrodzonych, takich jak zespół Bernarda-Souliera i zespołach mieloproliferacyjnych, takich jak MDS, AML czy nadpłytkowość samoistna.

Ze względu na ich rozmiar – podobny do wielkości erytrocytów – płytki olbrzymie mogą przekraczać próg wielkości normalnej płytki. Wyjaśnia to, dlaczego pojawiają się problemy z prawidłowym zliczaniem płytek w metodzie impedancyjnej, która rozdziela elementy tylko na podstawie ich wielkości. Niemniej jednak, problem ten jest odpowiednio zaznaczony w postaci ostrzeżenia. Duże płytki są błędnie liczone jako RBC, co przy zignorowaniu ostrzeżenia, może powodować pseudotrombocytopenię. Aby wyznaczyć prawidłową liczbę płytek, próbka musi zostać przeanalizowana alternatywną metodą.

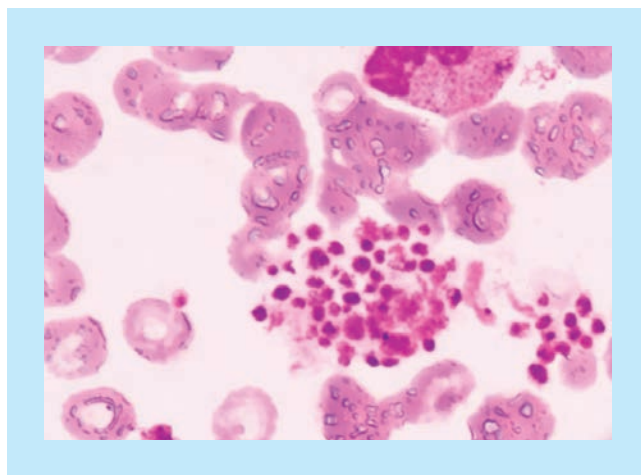
Agregacja i aglutynacja płytek krwi

Fałszywie niska liczba płytek krwi jest często spowodowana obecnością zlepiń płytek lub rzadziej satelityzmem płytek. Można różnicować agregację i aglutynację płytek. Agregacja płytek jest to zlepianie się płytek we krwi. Jest to nieodwracalna część procesu prowadzącego do powstania skrzepu. Najczęściej pojawia się na skutek aktywacji płytek krwi po nieprawidłowym pobraniu krwi.

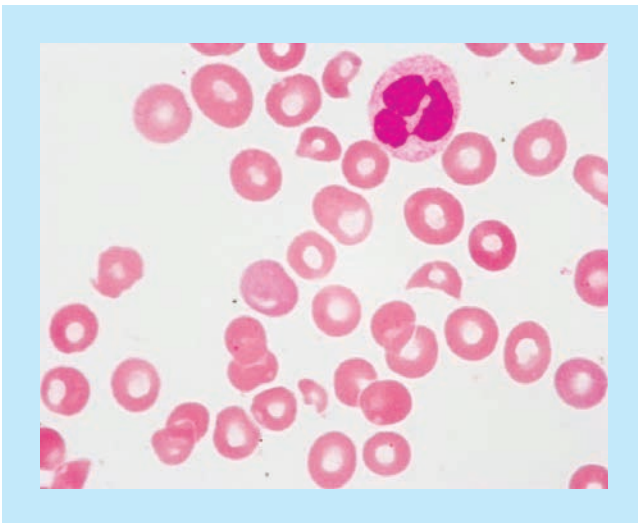
W przeciwieństwie do tego, aglutynacja płytek (ryc. 6) jest procesem odwracalnym, spowodowanym zwykle obecnością przeciwciał we krwi. Przykładem mogą być przeciwciała typu zimnego, które poprzez przyłączanie się do płytek w temperaturze poniżej 34°C powodują fałszywą trombocytopenię. Jest to zaburzenie *ex vivo*, które nie występuje w fizjologicznym zakresie temperatur ciała.

Innymi przyczynami mogącymi prowadzić do fałszywej trombocytopenii jest niezgodność z antykoagulantem EDTA lub w rzadszych przypadkach, heparyną czy cytrynianem. Pojawienie się satelityzmu płytek jest również związane z działaniem przeciwciał w próbkach pobranych na EDTA. Wszystkie te zjawiska są technicznymi problemami występującymi *in vitro* i nie pojawiają się *in vivo*.

W wielu przypadkach, analizator hematologiczny wyświetla ostrzeżenia i flaguje nieprawidłowy rozkład na histogramie. Jednakże trzeba wziąć pod uwagę, że agregaty płytek mogły nie zostać zaaspirowane przez analizator, ze względu na niehomogeniczny rozkład w próbce i mogą nadal być obecne w próbce. W takim przypadku zlepy mogą zostać niewykryte, otrzymany wynik nie jest oznaczony jako niewiarygodny, a liczba płytek jest fałszywie niska. Ogólnie, liczba płytek, która jest uważana za niewiarygodną, pomimo dodatkowej oceny rozmazu krwi, powinna być oceniona ponownie ze świeżo pobranej próbki krwi.



Ryc. 6 Aglutynacja płytek



Ryc. 7 Fragmenty erytrocytów w zakrzepowej plamicy małopłytkowej (TTP)

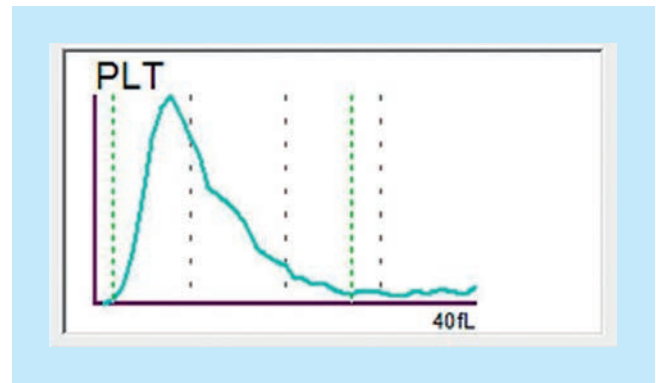
Fragmentocyty

Fałszywie podwyższona liczba płytek może być spowodowana obecnością fragmentów erytrocytów lub erytrocytami dysplastycznymi (np. u pacjentów z MDS; ryc. 7). Liczne fragmenty, które są mniejsze niż 25 fl, mieszczą się poniżej górnego dyskryminatora dla płytek krwi. Nawet przy zmiennych wartościach dyskryminatorów nie zawsze jest możliwe rozdzielenie bardzo małych erytrocytów lub ich fragmentów od płytek. W takich przypadkach, dokładną liczbę płytek można uzyskać wykorzystując barwniki wiążące się z RNA, znakowanie przeciwciałami lub nawet zliczanie w komorze, jeśli weźmiemy pod uwagę statystyczną niedokładność.

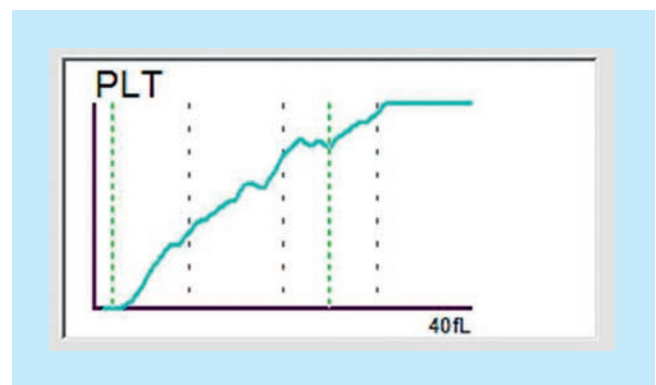
Zjawisko to może również występować w przypadku obecności fragmentów leukocytów. Takie cząsteczki mogą również interferować w metodzie impedancyjnej i być zliczane jako płytki.

Mikrocyty

Mikrocyty są klasyfikowane jako wyjątkowo małe ze względu na średnią objętość krwinki [4] i również mogą interferować w liczbę płytek krwi. Jest wiele przyczyn mikrocytozy – terminu, który odnosi się jedynie do wielkości krwinki. Komórki mogą być małe z powodu obecności mutacji wpływających na erytropoezę (dziedziczna mikrocytoza) lub nie zawierają dostatecznej ilości hemoglobiny, jak w przypadku powiązanej z mikrocytozą anemii z niedoboru żelaza. W analizatorach hematologicznych wykorzystujących metodę impedancyjną, mikrocyty są często zliczane jak płytki, ponieważ ich rozmiar jest taki sam jak płytek.



Ryc. 8 Interferencje spowodowane zlepianiem się płytek



Ryc. 9 Interferencje spowodowane obecnością fragmentocytów

Bakterie

Bardzo małe cząsteczki, jak fragmenty WBC lub komórki, takie jak bakterie, również mogą być błędnie zliczane jako płytki. Jednakże, rozmiar takich cząsteczek zwykle nie przekracza 2 fl a system wyświetla odpowiedni komunikat, wskazujący na konieczność wykonania kontroli wartości tła oraz konieczność rozwiązania problemu w przypadku powtarzających się komunikatów.

Przypadki histogramów płytkowych obrazujących występowanie różnych interferencji znajdują się na ryc. 8. i ryc. 9. Podsumowanie możliwych interferencji zebrano w poniższej tabeli 1.

Tabela 1 Elementy mogące potencjalnie interferować w pomiarze płytek w metodzie impedancyjnej

Element	Wpływ na liczbę PLT	Czynność jaką należy wykonać
Płytki olbrzymie	Niższa niż prawdziwa wartość	Oceń histogram. Jeśli możliwe, powtórz pomiar metodą fluorescencyjną.
Fragmentocyty	Wyższa niż prawdziwa wartość	Oceń histogram (płytki i fragmentocyty nie są wyraźnie oddzielone). Jeśli możliwe, powtórz pomiar metodą fluorescencyjną.
Mikrocyty	Wyższa niż prawdziwa wartość	Oceń histogram (płytki i mikrocyty nie są wyraźnie oddzielone). Jeśli możliwe, powtórz pomiar metodą fluorescencyjną.
Cząsteczki pochodzenia zewnętrznego	Wyższa niż prawdziwa wartość	Oceń histogram. Jeśli możliwe, powtórz pomiar metodą fluorescencyjną.
Agregaty płytek	Niższa niż prawdziwa wartość	Oceń histogram. W przypadku niewiarygodnej trombocytopenii sprawdź możliwość wystąpienia trombocytopenii EDTA-zależnej. Powtórz pomiar na świeżej próbce krwi.

Alternatywy dla pomiaru impedancyjnego

W przypadku gdy podejrzewana jest błędna analiza liczby płytek krwi, jest wiele możliwości powtórnej oceny liczby płytek: np. komora zliczeniowa, znakowanie przeciwciałami lub pomiar fluorescencji przy użyciu analizatora hematologicznego.

Zliczanie w komorze

Manualne oznaczanie liczby płytek krwi wykonuje się zwykle w komorze. Z powodu wysokiej ilości erytrocytów w próbce krwi, niezbędne jest przeprowadzenie wstępnego etapu lizy, w celu ich usunięcia. Jednakże, jak już wspomniano, w wielu laboratoriach zaprzestano oceny liczby płytek krwi w komorach zliczeniowych. Jednym z najważniejszych powodów jest wysoka niedokładność takiego oznaczenia oraz oszczędność czasu w metodach automatycznych. Szczególnie w próbkach z niską liczbą płytek, gdzie wymagana jest wyższa dokładność, metoda manualna okazuje się być bardzo niedokładną.

Szacowanie liczby płytek metodą Fonio

Ta metoda jest użyteczna do szybkiej oceny dokładności danego (zautomatyzowanego) pomiaru liczby płytek krwi. Przeprowadza się ją pod mikroskopem, w normalnym rozmazie krwi, w 1000-krotnym powiększeniu (okular 10, obiektyw 100). Zliczana jest liczba płytek w polu widzenia, a następnie przyrównywana do całkowitej liczby płytek krwi: 1 płytka w polu widzenia równa się 20000/μl płytek we krwi obwodowej. Oczywiście wartości uzyskane w tej metodzie zawsze są tylko przybliżeniem i nie mogą być uznane za dokładne.

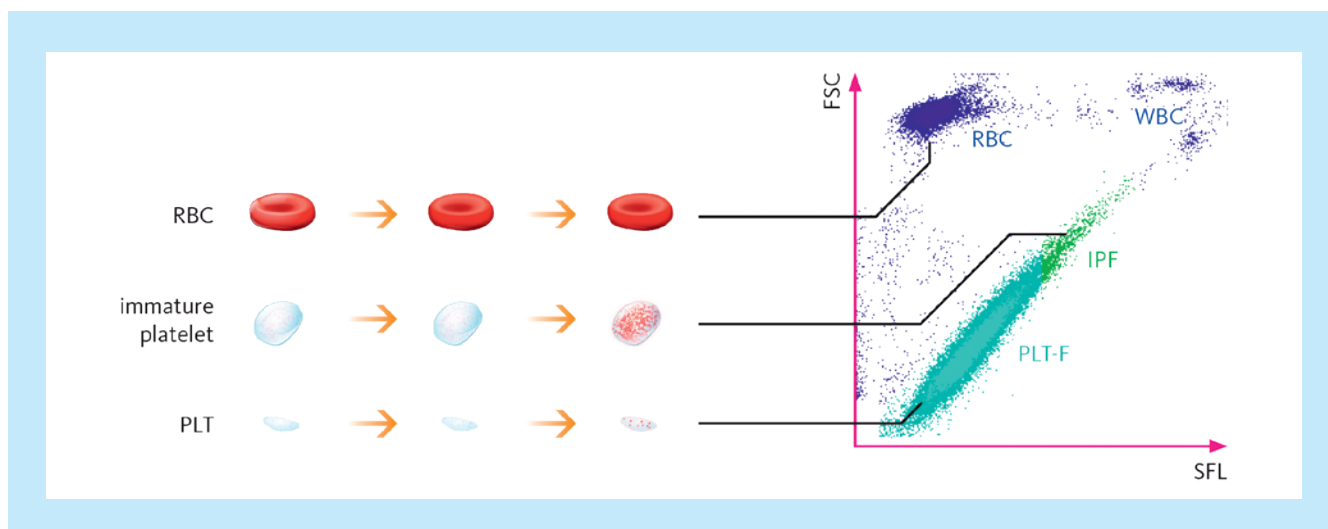
Znakowanie immunologiczne CD61/CD41

Znakowanie immunologiczne receptorów powierzchniowych płytek jest obecnie, zgodnie z ICSH/ISLH, metodą referencyjną

dla oznaczania płytek krwi. Metoda ta polega na oznakowaniu receptorów powierzchniowych płytek krwi CD61 i CD41 za pomocą monoklonalnych przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie i wykrywaniu ich w cytometrze przepływowym. Ta metoda zastąpiła zliczanie w komorze jako metodę referencyjną. Największą zaletą omawianej metody jest wyjątkowo wiarygodny wynik oznaczania płytek o każdej wielkości, jednakże może być on zależny od laboratorium. Badanie to nie jest wystandaryzowane oraz zautomatyzowane, co może powodować znaczące różnice w wynikach pomiędzy laboratoriami. Innymi wadami są: skomplikowanie metody, brak możliwości wykonywania badania w rutynowej pracy laboratorium oraz wysoka cena.

Znakowanie fluorescencyjne oraz cytometria przepływowa

Szybką i niedrogą alternatywą jest pomiar ilości płytek krwi poprzez fluorescencyjne znakowanie RNA płytek. Znakowanie kwasów nukleinowych umożliwia analizatorowi wyznaczenie dokładnej ilości płytek w sposób zautomatyzowany na podstawie aktywności fluorescencyjnej komórki oraz objętości. Pozwala to również na prawidłową klasyfikację płytek olbrzymich (o takiej samej objętości jak erytrocyty, ale różniące się zawartością RNA) i fragmentocytów (nie posiadają RNA). W dwuetapowej reakcji, pierwszym krokiem jest perforacja błon komórkowych płytek, które zachowują swój rozmiar. Następnie znacznik fluorescencyjny specyficznie znakuje płytki, dzięki czemu praktycznie całkowicie maskuje interferujące cząsteczki (np. fragmenty innych komórek o podobnym rozmiarze), aby zminimalizować interferencję. Zmierzony sygnał fluorescencji jest wprost proporcjonalny do stopnia dojrzałości płytek, co pozwala na uzyskanie dodatkowych informacji o niedojrzałych płytkach.



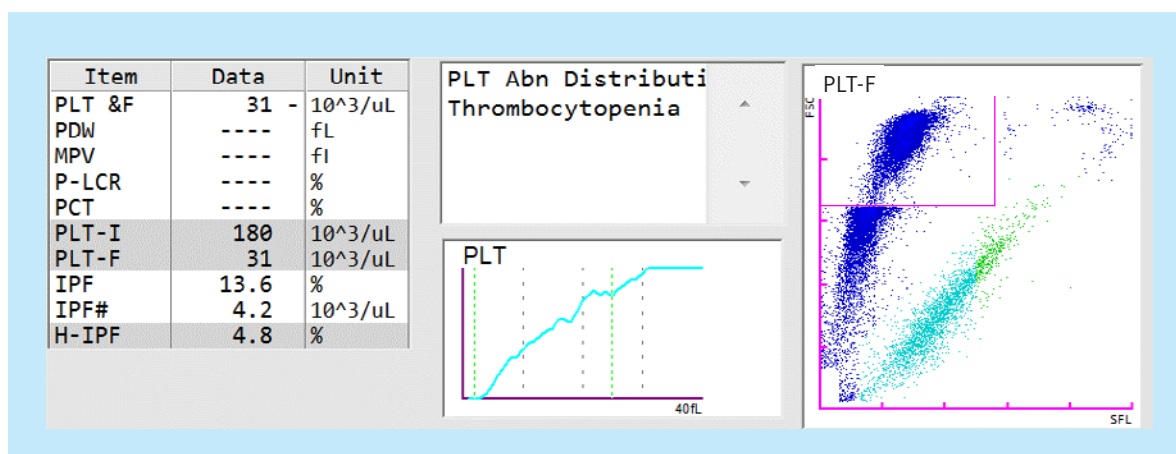
Ryc. 10 Skatergram dla kanału PLT-F

Dobrym przykładem znakowania fluorescencyjnego jest kanał PLT-F w analizatorach hematologicznych serii XN (Sysmex). Posiada on udokumentowaną wiarygodność oznaczania płytek krwi, która wysoko koreluje z referencyjną metodą immunocytochemii przepływowej nawet w przypadku próbek trombocytopenicznych [5-8]. Specyficzne odczynniki oraz 5-krotnie większa objętość próbki w porównaniu do metody impedancyjnej, pozwalają na uzyskanie wyników o wysokiej wiarygodności nawet w próbkach trombocytopenicznych. W jednym z ostatnich opublikowanych artykułów Wada i wsp. stwierdzają, że właściwości znakujące odczynników stosowanych w kanale PLT-F, dzięki którym płytki oraz fragmenty czerwonych krwinek są dokładnie rozdzielone, przyczyniają się do wysokiej dokładności zliczania płytek w kanale PLT-F.

Na poniższej rycinie (ryc. 11) przedstawiono, w jaki sposób kanał PLT-F dostarcza dużo dokładniejsze wyniki w przypadku interferencji ze strony fragmentocytów. Wartość PLT-I (metoda impedancyjna) wynosi $180 \times 10^3/\mu\text{L}$, podczas gdy kanał PLT-F wskazuje na $31 \times 10^3/\mu\text{L}$, ujawniając trombocytopenię, która mogłaby zostać niezauważona przy wykonaniu oznaczenia wyłącznie metodą impedancyjną.

Kanał PLT-F jest doskonałym narzędziem do oceny płytek krwi. Nie tylko dostarcza dokładnej i precyzyjnej liczby płytek, ale również pozwala na oznaczenie frakcji niedojrzałych płytek we krwi za pomocą parametru IPF. IPF pozwala na ocenę obecnego stanu trombopojezy, dostarczając informacji o produkcji płytek w szpiku kostnym [10-14].

W przypadku próbek z ostrą trombocytopenią oraz tych wymagających podjęcia akcji na skutek niewiarygodnej liczby płytek krwi z metody impedancyjnej, aparaty z serii XN mają wbudowaną regułę, która automatycznie zleci pomiar próbki w kanale PLT-F jako „reflex test”. Od niedawna, nowo opracowany algorytm TWO, został włączony do Extended IPU, co pozwala na optymalizację zlecenia PLT-F i wspieranie diagnostyki różnicowej u pacjentów z trombocytopenią oraz monitorowanie ich leczenia. Kanał PLT-F stanowi szybką i dokładną metodę zapewniającą wiarygodną liczbę płytek krwi. Dzięki parametrowi IPF, pozwala również odpowiedzieć na pytania lekarzy, dostarczając informacji, które pozwalają różnicować zwiększone niszczenie płytek z dysfunkcją szpiku kostnego.



Ryc. 11 Skatergram dla kanału PLT-F

Źródła

- [1] **Wright JH.** (1906): 'The Origin and Nature of the Blood Plates'. *The Boston Medical and Surgical Journal*. 154(23) : 643 – 645.
- [2] **Pekelharing JM et al.** (2010): Haematology reference intervals for established and novel parameters in healthy adults. *Sysmex Journal International*. Vol. 20 No. 1.
- [3] **Solberg HE** (2004): The IFCC recommendation on the estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med*. 42 : 710 – 714.
- [4] **Mach-Pascual S et al.** (1996): 'Investigation of microcytosis: A comprehensive approach'. *Eur. J. Haematol*. 57(1) : 54 – 61.
- [5] **Schoorl M. et al.** (2013): New Fluorescent Method (PLT-F) on Sysmex XN2000 Hematology Analyzer Achieved Higher Accuracy in Low Platelet Counting. *Am J Clin Pathol*. 140 : 495 – 490.
- [6] **Taylor H et al.** (2014): Evaluating platelet counting on a new automated analyser. *Hospital Health Care Europe (HHE)*. 2 : 181 – 184.
- [7] **Park SH et al.** (2014): The Sysmex XN-2000 Hematology Autoanalyzer Provides a Highly Accurate Platelet Count than the Former Sysmex XE-2100 System Based on Comparison with the CD41/CD61 Immunoplatelet Reference Method of Flow Cytometry. *Ann Lab Med*. 34(6) : 471 – 474.
- [8] **Tanaka Y et al.** (2014): Performance Evaluation of Platelet Counting by Novel Fluorescent Dye Staining in the XN-Series Automated Hematology Analyzers. *J Clin Lab Anal*. 28(5) : 341.
- [9] **Wada A et al.** (2015): Accuracy of a New Platelet Count System (PLT-F) Depends on the Staining Property of Its Reagents. *PLoS ONE*. 10(10) : e0141311.
- [10] **Goncalo A et al.** (2011): Predictive value of immature reticulocyte and platelet fractions in hematopoietic recovery of allograft patients. *Transplant Proc*. 43 : 241 – 243.
- [11] **Briggs C et al.** (2004): Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 126 : 93 – 99.
- [12] **Mao W et al.** (2015): Immature platelet fraction values predict recovery of platelet counts following liver transplantation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 39(4) : 469.
- [13] **Sakuragi M et al.** (2015): Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. *Int J Hematol*. 101(4) : 369.
- [14] **Van der Linden N et al.** (2014): Immature platelet fraction (IPF) measured on the Sysmex XN haemocytometer predicts thrombopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 93(2) : 150.