

## Interpretacja różnicowania leukocytów 3-DIFF

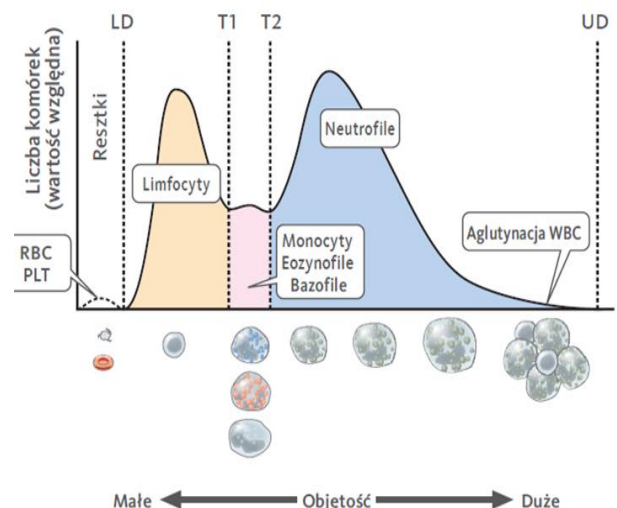


Analizatory 3-DIFF, takie jak Sysmex K-4500, XP-300, oprócz ośmiu parametrów CBC, wykonują także wstępną, trzyczęściową, klasyfikację krwinek białych. Umożliwia ona uzyskanie informacji pomocnych w interpretacji wyniku oraz wskazaniu nieprawidłowości, które w niektórych przypadkach mogą wymagać oceny mikroskopowej. Różnicowanie wstępne, będzie więc pomocne przede wszystkim w wykryciu próbek negatywnych, czyli inaczej prawidłowych, których wynik może być natychmiast przekazany lekarzowi. Próbkę traktowaną jako „prawidłową”, jeśli wyniki analizy mieszczą się w zakresach referencyjnych i nie wymagają dodatkowej weryfikacji diagnostycznej. Jeśli nie występują żadne nieprawidłowości, wystarczające jest rozdzielenie krwinek białych na limfocyty i neutrofile. W ten sposób można potwierdzić lub wykluczyć podejrzenie infekcji wirusowej lub bakteryjnej. Jednocześnie różnicowanie wstępne umożliwia zmniejszenie ilości wykonywanych rozmazów, dzięki czemu diagnosta może skoncentrować się na próbkach patologicznych.

### Działanie odczynników

Odczynnik lizujący powoduje obkurczenie krwinek

białych, dzięki czemu na histogramie stają się trzema oddzielnymi grupami (ryc. 1). Oś OX histogramu WBC wskazuje objętość komórek wyrażoną w femtolitrach (fl). Należy jednak pamiętać, że objętość ta nie wskazuje na objętość komórki natywnej, ale na objętość komórki po działaniu odczynnika. Widoczne jest to chociażby w obrębie populacji monocytów. Są one największymi leukocytami o średnicy około 20  $\mu$ l, które jednocześnie kurczą się najbardziej pod wpływem działania odczynnika lizującego. Działanie



Ryc. 1 Histogram WBC

odczynnika na eozynofile i bazofile jest również względnie silne, dlatego te trzy populacje znajdują się w jednej, mieszanej grupie. Odczynnik lizujący działa znacznie słabiej na limfocyty i neutrofile.

### Interpretacja histogramu

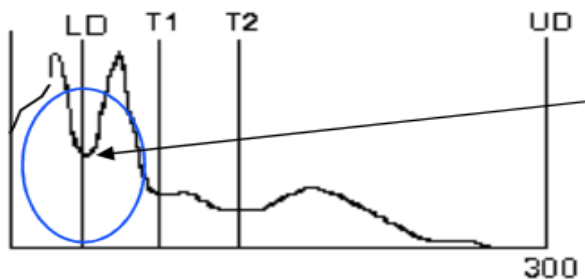
Wszystkie mierzone impulsy są zamieszczone na krzywej rozkładu objętości. W kanale do pomiaru WBC, krwinki czerwone są lizowane, dlatego nie interferują w pomiar leukocytów. Natomiast płytki są oddzielone od leukocytów dzięki zastosowaniu dolnego dyskryminatora (LD). Krzywa rozkładu objętości powinna znajdować się między górnym (UD) a dolnym dyskryminatorem (LD) oraz zaczynać i kończyć się na linii podstawy. Jeśli występuje odchylenie od linii podstawy, analizator generuje odpowiednie ostrzeżenie, po którym należy podjąć kolejne działania.

### Nieprawidłowości występujące przy dolnym dyskryminatorze (LD)

Jeśli występuje odchylenie od linii podstawy przy dolnym dyskryminatorze, analizator generuje ostrzeżenie „WL”, którego przyczyną mogą być:

- agregaty płytkowe (skrzep w próbce, trombocytopenia EDTA-zależna),
- krwinki czerwone odporne na lizę,
- erytroblasty,
- krioglobuliny,
- płytki olbrzymie.

W przypadku pojawienia się flagi WL, należy sprawdzić liczbę WBC, ponieważ może wystąpić fałszywe zawyżenie wyniku, na skutek obecności wyżej wymienionych czynników interferujących. Najczęstszą przyczyną tego ostrzeżenia są agregaty płytkowe, które wpływają na wynik WBC, ponieważ analizator nie jest w stanie odróżnić agregatów od krwinek białych – w tym przypadku na interferencję



Ryc. 2 Ostrzeżenie WL spowodowane interferencją przy dolnym dyskryminatorze

wskazuje także histogram płytkowy. Obecność agregatów można potwierdzić przez ocenę

mikroskopową. Aby uzyskać prawidłowy wynik, konieczne jest pobranie kolejnej próbki krwi. Fałszywe wartości WBC z powodu obecności płytek olbrzymich są bardzo rzadkie, ale należy o nich pamiętać. Pojawienie się ostrzeżenia WL może również być spowodowane obecnością erytroblastów, które posiadają jądra komórkowe i są zliczane jako WBC, dlatego liczba WBC musi być skorygowana

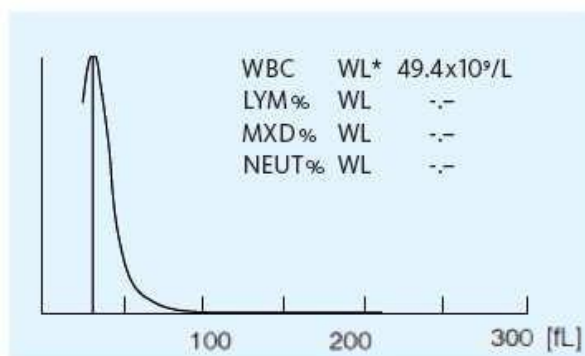
$$\text{Skorygowana liczba WBC} = \frac{\text{wartość WBC} \times 100}{100 + \text{liczba NRBC}^*}$$

przy użyciu poniższej formuły:

\* liczba erytroblastów zliczona na 100 WBC

Liczba WBC może być wątpliwa również z powodu występowania erytrocytów opornych na lizę, u wcześniaków oraz u pacjentów ze zwiększoną opornością osmotyczną. Działanie odczynnika lizującego na błonę RBC nie jest wystarczające i z tego powodu występuje interferencja w pomiarze WBC. Jest ona widoczna na histogramie WBC w postaci bardzo charakterystycznej „krzywej bocznej” (ryc. 3). W tym przypadku, próbkę należy rozcieńczyć w celu zwiększenia siły działania odczynnika lizującego na krwinki czerwone.

### Nieprawidłowości występujące przy górnym dyskryminatorze (UD)

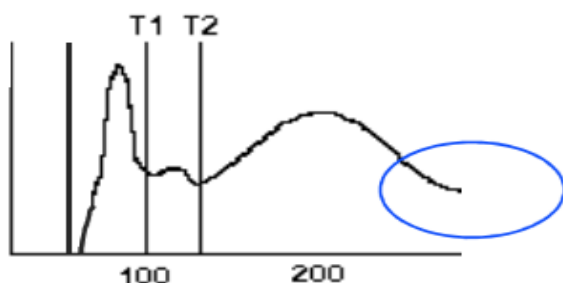


Ryc. 3 „Krzywa boczna”

W przypadku wystąpienia odchylenia przy górnym dyskryminatorze UD (ryc. 4), system generuje ostrzeżenie „WU”. W tym przypadku znacznie przekroczony jest zakres liniowości – z powodu zwiększenia liczby WBC ( $WBC > 100 \times 10^3/\mu l$ ). Nie wszystkie komórki są widoczne na histogramie – wartość leukocytów najprawdopodobniej jest znacznie wyższa. Próbka taka powinna być rozcieńczona w stosunku 1:5 w celu uzyskania wiarygodnego wyniku.

## Flagi T1 i T2

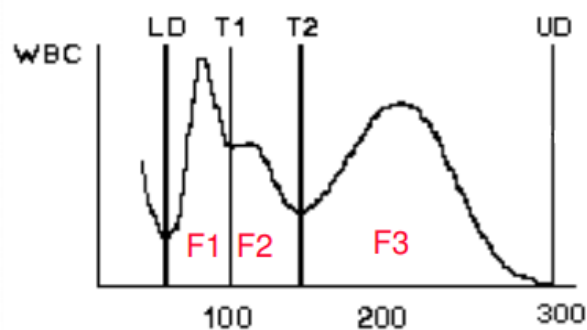
Poza dwoma ograniczającymi dyskryminatorami występują również dyskryminatory rozdzielające populację krwinek białych na trzy części. Dwa dyskryminatory „T1” i „T2” mogą w obrębie pewnych obszarów zmieniać położenie; tj. mogą się w pewnym stopniu dostosowywać do danej próbki. Jednak w przypadku niektórych próbek patologicznych, nie jest możliwe wiarygodne rozdzielanie populacji WBC. W tym wypadku generowane są flagi T1 lub T2, a wartości wstępnego różnicowania nie powinny być wydawane, ponieważ populacje WBC nie zostały od siebie wiarygodnie oddzielone. Zalecane jest wykonanie rozmazu ręcznego. Jednakże całkowita liczba WBC jest w tym przypadku wiarygodna (jeśli nie ma ostrzeżenia WL lub WU).



Ryc. 4 Ostrzeżenie „WU” dla górnego

## Flagi F1, F2 i F3

Flagi te pojawiają się jeśli zostało odnaleziono wystarczające oddzielenie populacji, ale przewężenia na histogramie są znacznie oddalone



Ryc. 5 „F1”, „F2”, „F3” w próbce

od linii podstawy. Wtedy bardzo możliwym jest, że populacje są ze sobą zmieszane np. frakcja 1 z frakcją 2 lub frakcja 2 i 3 pokrywają się ze sobą w znacznym stopniu. W tym przypadku całkowita liczba WBC będzie wiarygodna, zakładając, że nie występuje ostrzeżenie WL lub WU. Jednakże różnicowanie krwinek białych powinno być wykonane mikroskopowo.

## Podsumowanie

Wyżej opisane ostrzeżenia generowane przez aparat, zwracają uwagę użytkownika na próbki pozytywne, wobec których należy podjąć dodatkowe działania. W ten sposób wstępne różnicowanie przez analizator pomaga zredukować liczbę rozmazów mikroskopowych. Zmiany morfologiczne – zwłaszcza wcześniejsze stadia nieprawidłowości linii limfoidalnej i mieloidalnej wymagają różnicowania mikroskopowego.

Tab. 1 Informacje o flagach w różnicowaniu 3-DIFF leukocytów

Komunikat	Możliwa przyczyna
<b>WL</b>	przekroczenie limitu LD; niepełna liza RBC, duże PLT lub agregaty płytkowe
<b>WU</b>	przekroczenie limitu UD; niepełna liza RBC, duże PLT lub agregaty płytkowe
<b>T1</b>	nie można ustalić dolnego wewnętrznego dyskryminatora
<b>T2</b>	nie można ustalić górnego wewnętrznego dyskryminatora
<b>F1</b>	nieprawidłowość histogramu w obszarze małych komórek
<b>F2</b>	nieprawidłowość histogramu w obszarze średnich komórek
<b>F3</b>	nieprawidłowość histogramu w obszarze dużych komórek