

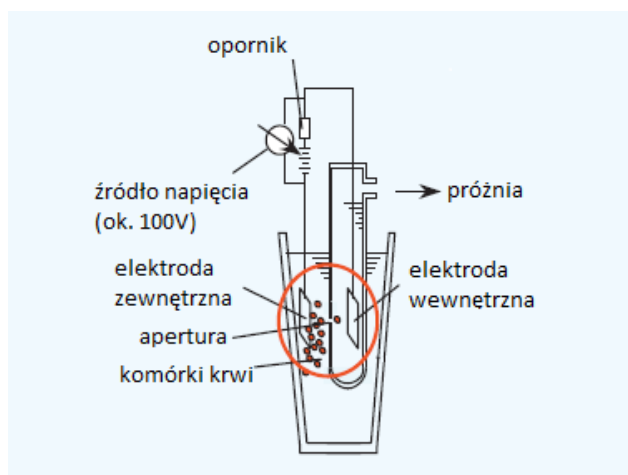
Histogram płytek krwi

Interpretacja, możliwości i interferencje

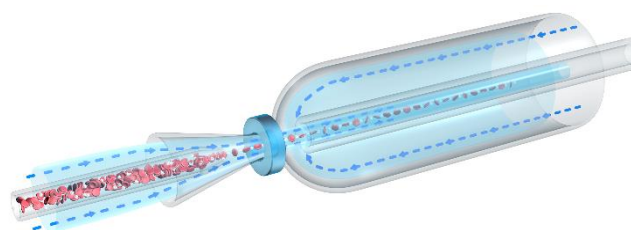


Automatyczne zliczanie płytek krwi od lat zastępuje metodę zliczania w komorze, znacznie ułatwiając pracę w laboratorium i zwiększając wiarygodność wyniku, ze względu na większą liczbę analizowanych komórek. Jednakże pomimo wprowadzenia automatyzacji, wynik oznaczenia liczby płytek niekiedy wymaga dodatkowej uwagi.

Większość analizatorów hematologicznych w celu zliczania płytek krwi wykorzystuje metodę impedancyjną. Podczas analizy komórki przechodzą jedna za drugą przez otwór pomiarowy czyli tzw. aperturę pomiarową (ryc. 1). W momencie przejścia następuje zmiana napięcia elektrycznego w przetworniku, dając sygnał proporcjonalny do wielkości komórki. Po odłożeniu wysokości impulsów na osi powstaje krzywa rozkładu objętości dla odpowiedniej populacji komórek. Ta metoda pomiarowa została udoskonalona poprzez zastosowanie ogniskowania hydrodynamicznego. Strumień próbki jest „opłaszczany” przez strumień przepływającego rozpuszczalnika, dzięki czemu komórki przepływają dokładnie przez środek otworu pomiarowego w uporządkowany sposób (ryc. 2). Pozwala to na wyeliminowanie zjawisk interferujących, takich jak podwójny przepływ (koincydencja), recyrkulacja itp. W ten sposób



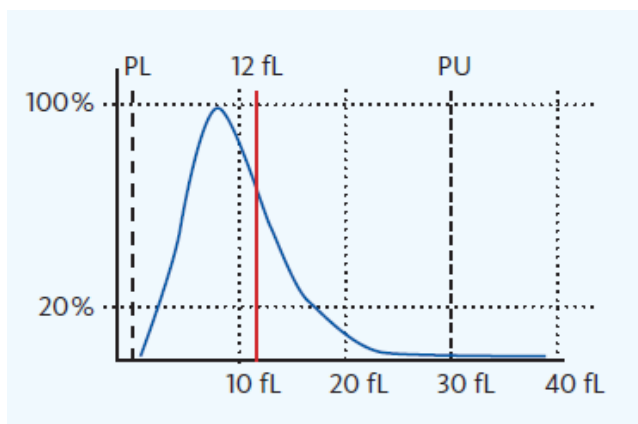
Ryc. 1 Pomiar objętości w metodzie impedancyjnej



Ryc. 2 Ogniskowanie hydrodynamiczne – przepływ płynu „opłaszczającego”

komórki są zliczane z najwyższą precyzją. Pozwala to także na zliczanie próbek o bardzo wysokiej i bardzo niskiej liczbie płytek krwi.

Pomimo rozwiązań technologicznych zapewniających właściwy wynik, należy wziąć pod uwagę, że w metodzie impedancyjnej elementy morfotyczne różnicowane są jedynie na podstawie ich objętości. Poza liczbą płytek, analizatory dostarczają dodatkowych informacji w postaci krzywej rozkładu objętości płytek - histogramu, który stanowi graficzne przedstawienie sumy impulsów komórek o określonej wielkości (ryc. 3).



Ryc. 3 Histogram dla płytek krwi

Populacje płytek i erytrocytów są optymalnie od siebie oddzielone dzięki wykorzystaniu ruchomych dyskryminatorów: dolnego (PL) i górnego (PU) (ryc. 3). Fizjologiczne płytki osiągają wielkość 8-12 fl, mierzone są natomiast w przedziale 2-30 fl, przy czym ruchomy dyskryminator PU ustawiany jest tak, by zapewnić optymalne rozdzielanie płytek i erytrocytów. Erytrocyty fizjologicznie osiągają wielkość 80-100 fl i są zliczane w przedziale od 25 fl do 250 fl. W przypadku obecności patologii wpływającej na zmianę objętości krwinek czerwonych lub płytek krwi, w analizie takich próbek mogą wystąpić błędy. Małe cząsteczki (o objętości poniżej 30 fl), takie jak fragmenty cytoplazmy, mikrocyty czy fragmentocyty mogą być nieprawidłowo zliczane jako płytki, z kolei płytki olbrzymie jako erytrocyty. Przyczyną interferencji może być również obecność agregatów płytkowych. W takich przypadkach różnicowanie na podstawie samej objętości może być niewystarczające dla jednoznacznego ustalenia liczby komórek i konieczna jest dodatkowa weryfikacja. Ze względu na swoją zwiększoną objętość, obecne we krwi płytki olbrzymie, z płytkami niekiedy osiągającymi rozmiary krwinek czerwonych, mogą być zliczane jako erytrocyty. W przypadku ich występowania w obrazie mikroskopowym

zauważalna jest znaczna anizocytoza płytek. Czasami agregaty płytkowe również mogą być niepoprawnie zliczane jako erytrocyty. Odwrotna sytuacja natomiast występuje w przypadku obecności fragmentocytów i mikrocytów – mogą być niepoprawnie zliczane jako płytki krwi

Jednakże we wszystkich tych przypadkach możliwe jest wykrycie interferencji w pomiarze ze względu na nieprawidłowy rozkład objętości krwinek na histogramie. Krzywa zawsze powinna zaczynać i kończyć się na linii podstawy (ang. baseline). Jeśli zostają wykryte odchylenia od linii podstawy, ruchomy dyskryminator będzie szukał optymalnego miejsca do rozdzielania od siebie dwóch populacji. W takich przypadkach analizator wygeneruje ostrzeżenie, by zwrócić uwagę użytkownika na konieczność sprawdzenia próbki – albo przez dokładniejszą ocenę histogramu, albo przez weryfikację liczby płytek przy użyciu innej metody np. za pomocą zliczania w komorze. Jednakże należy wziąć pod uwagę, że liczenie komórek w komorze może być źródłem wielu błędów manualnych, a także wymaga pewnego doświadczenia i wprawy.

Drugą możliwością jest półilościowe oszacowanie liczby płytek przy użyciu metody Fonio. Pozwala ona na orientacyjną ocenę liczby komórek. Przy 1000-krotnym powiększeniu (okular 10x, obiektyw 100x) jedna płytka krwi w polu widzenia odpowiada ilości $20 \times 10^3/\mu\text{l}$ w krążącej krwi. W przypadku dysproporcji pomiędzy wynikiem z analizatora, a wartością oszacowaną, należy użyć komory.

Immunologiczne znakowanie płytek specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi jest bardzo dobrym sposobem ustalenia liczby płytek. Niestety jest to metoda bardzo kosztowna i nie odpowiednia do rutynowej pracy.

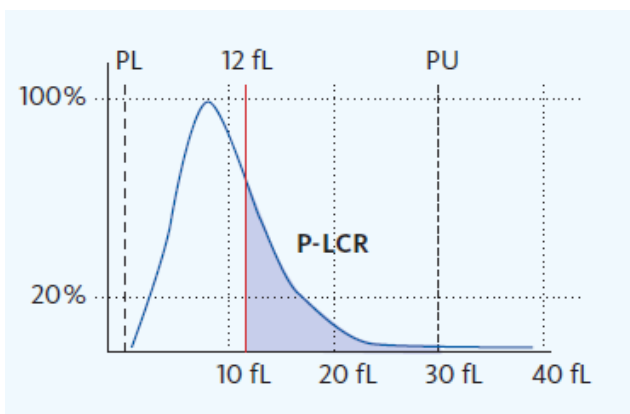
Inną alternatywą dla oznaczenia liczby płytek jest wybarwienie RNA trombocytów przy użyciu barwnika fluorescencyjnego. Po wybarwieniu następuje pomiar aktywności fluorescencyjnej i objętości komórki. Następnie właściwa liczba płytek, włącznie z płytkami olbrzymimi, zostaje ustalona automatycznie. Większość analizatorów hematologicznych Sysmex po zainstalowaniu odpowiedniej aplikacji umożliwia barwienie RNA płytek, a następnie ich pomiar. Dodatkowo w przypadku wystąpienia interferencji w pomiarze impedancyjnym analizator może sam przełączyć się na pomiar metodą fluorescencyjną, dzięki zastosowaniu odpowiedniego algorytmu.

Parametry ułatwiające interpretację histogramu

Oprócz oceny histogramu istnieją jeszcze dodatkowe parametry, takie jak P-LCR, MPV, PDW i PCT dostarczające przydatnych informacji na temat morfologii płytek.

P-LCR (wskaźnik obecności dużych płytek)

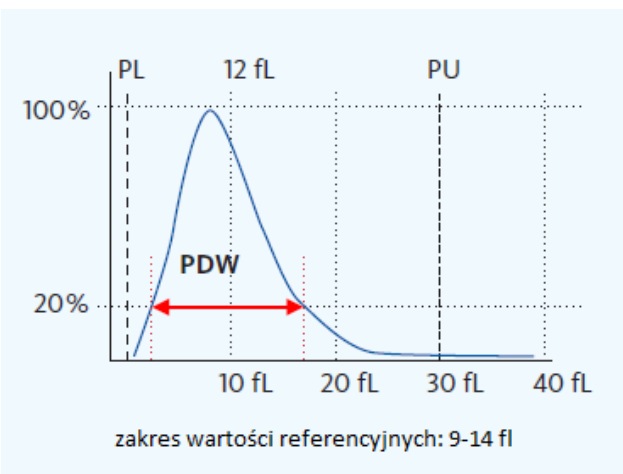
P-LCR wskazuje procent dużych płytek, o objętości powyżej 12 fl. Oprócz dwóch ruchomych dyskryminatorów ograniczających krzywą rozkładu objętości płytek, istnieje jeszcze dodatkowy, stały dyskryminator o wartości 12 fl (ryc. 4). Wzrost tego parametru może wskazywać na obecność płytek olbrzymich, ale także agregatów płytkowych lub mikrocytów.



Ryc. 4 Histogram z zaznaczonym dyskryminatorem dla płytek dużych

PDW (rozpiętość rozkładu objętości płytek)

PDW oznacza szerokość rozkładu objętości płytek na poziomie 20% wysokości piku rozkładu traktowanego jako 100% (ryc. 5). Podwyższony PDW jest wskaźnikiem anizocytozy płytek.



Ryc. 3 Histogram z zaznaczonym PDW

MPV (średnia objętość płytki krwi)

Ten parametr dostarcza informacji o średniej objętości płytek pomiędzy dolnym i górnym dyskryminatorem, wyliczany jest ze wzoru:

$$MPV = \frac{PCT (\%)}{PLT (x10^3 / \mu l)}$$

PCT (hematokryt płytkowy)

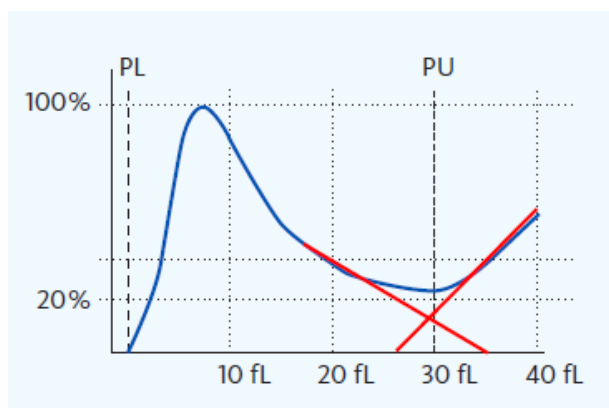
Hematokryt płytkowy jest odpowiednikiem sumy impulsów płytkowych, które pojedynczo są zliczane w pomiarze impedancyjnym. W ten sposób jest on odpowiednikiem hematokrytu krwinek czerwonych.

Dostępność parametrów płytkowych

Jeśli wysokość krzywej rozkładu objętości w dolnym lub górnym dyskryminatorze odbiega od normy, jeden lub kilka parametrów może być niedostępnych. Wynik będzie wtedy zastąpiony znakami „----”. Ponadto wartość liczbową płytek krwi zostanie oflagowana, a analizator wygeneruje ostrzeżenie. W takiej sytuacji należy zweryfikować poprawność wyniku przez sprawdzenie histogramu. Aby dokładniej ocenić histogram dla płytek, krzywe można podzielić na 3 różne kategorie nazwane tutaj jako: A, B i C.

„Krzywa A”

Krzywa zaczyna się na linii podstawy, ale się na niej nie kończy. Prawdopodobną przyczyną mogą być interferencje ze strony mikrocytów. W przypadku skrajnie małych erytrocytów prawidłowy rozdział pomiędzy dwoma populacjami komórek czasami może być niemożliwy. Ponieważ nakładanie się obydwu populacji jest w przybliżeniu takie samo po obu stronach dyskryminatora, uzyskana liczba płytek może być uznana za wiarygodną, jeśli MCV mieści się w przedziale wartości referencyjnych. W takim przypadku zliczanie komorowe statystycznie byłoby mniej precyzyjne.



Ryc. 6 Kształt „krzywej A”

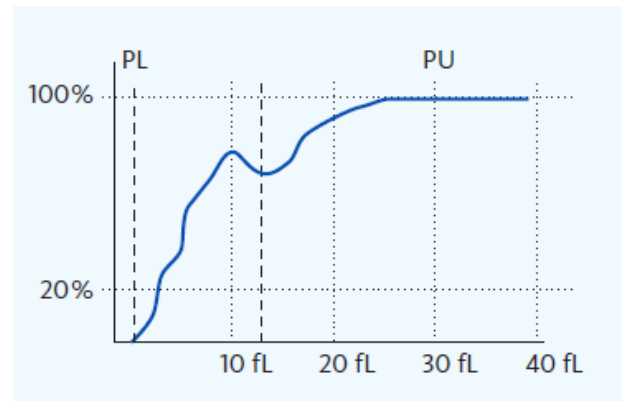
„Krzywa B”

W tym przypadku krzywa również nie kończy się na linii podstawy histogramu. Odległość od linii podstawy jest duża i nie ma rozdziału pomiędzy dwoma populacjami. Populacje całkowicie na siebie nachodzą. Możliwą przyczyną takiego rozkładu mogą być fragmentocyty, które nachodzą na populację płytek i uniemożliwiają prawidłowy rozdział. Taki wynik jest wątpliwy i za każdym razem wymaga weryfikacji.

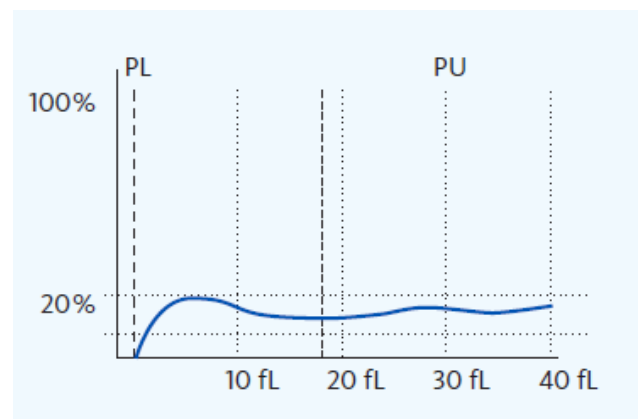
„Krzywa C”

W tym przypadku również wymagana jest weryfikacja liczby płytek. Ruchomy górny dyskryminator (PU) zawsze próbuje ustawić się w miejscu optymalnego rozdziału populacji. Jednakże, w związku z brakiem widocznego przewężenia, spowodowaną obecnością płytek olbrzymich lub agregatów, miejsce rozdziału nie może być znalezione, dlatego liczba płytek powinna być zweryfikowana przy użyciu innej metody.

Nieprawidłowy rozkład krwinek w dolnym dyskryminatorze zdarza się raczej rzadko. Może być spowodowany przez cząsteczki o objętości poniżej 2 fl. Przyczyną interferencji może być zwiększona wartość tła, bakterie, grzyby lub resztki komórkowe. W takim przypadku należy sprawdzić wartość tła i jeśli to konieczne wymienić odczynniki.



Ryc. 4 Kształt „krzywej B”



Ryc. 8 Kształt „krzywej C”

Tabela 1 Czynniki mogące interferować w zliczaniu płytek metodą impedancyjną

Czynniki mogące interferować w oznaczeniu płytek metodą impedancyjną		Proponowany sposób postępowania
Płytki olbrzymie	PLT ↓	<ul style="list-style-type: none"> ocena histogramu jeśli konieczne, weryfikacja liczby płytek metodą Fonio lub zliczenie w komorze pomiar płytek metodą optyczną lub fluorescencyjnie, w miarę dostępności
Agregaty płytkowe	PLT ↓	<ul style="list-style-type: none"> ocena histogramu w przypadku niskiego prawdopodobieństwa trombocytopenii należy wykluczyć pseudotrombocytopenię EDTA-zależną poprzez analizę liczby płytek w materiale pobranym na cytrynian
Mikrocyty	PLT ↑	<ul style="list-style-type: none"> ocena histogramu mikrocyty i płytki mogą nie być dokładnie rozdzielone na podstawie objętości jeśli konieczne, weryfikacja liczby płytek metodą Fonio lub zliczenie w komorze pomiar płytek metodą optyczną lub fluorescencyjnie, w miarę dostępności
Fragmentocyty	PLT ↑	<ul style="list-style-type: none"> ocena histogramu fragmentocyty i płytki mogą nie być dokładnie rozdzielone na podstawie objętości jeśli konieczne, weryfikacja liczby płytek metodą Fonio lub zliczenie w komorze pomiar płytek metodą optyczną lub fluorescencyjnie, w miarę dostępności