

**SYSMEX EDUCATIONAL ENHANCEMENT
AND DEVELOPMENT | Listopad 2012**

SEED Hematologia



Wskaźniki czerwonokrwinkowe

Morfologia krwi

Morfologia krwi (CBC), która jest kluczowym elementem podejmowania decyzji klinicznych, jest najczęstszym badaniem laboratoryjnym przeprowadzanym na całym świecie. Definicja tego, z czego składa się morfologia, zależy od ilości i rodzaju parametrów mierzonych przez różne analizatory, jednakże tradycyjne wskaźniki czerwonokrwinkowe, powszechnie stosowane w klasyfikacji anemii zawsze są w niej uwzględnione.

Laboratoryjne podejście do anemii

Anemia jest problemem zdrowotnym bardzo powszechnym na całym świecie. Jednakże, jest ona tylko objawem, który może wynikać z wielu powodów. Skuteczne leczenie anemii możliwe jest tylko, jeśli jej przyczyna jest prawidłowo zidentyfikowana. Do tego celu zostało przygotowanych kilka systemów klasyfikacji, z których najbardziej użyteczny i powszechnie stosowany opiera się na wskaźnikach czerwonokrwinkowych.

Diagnozowanie anemii

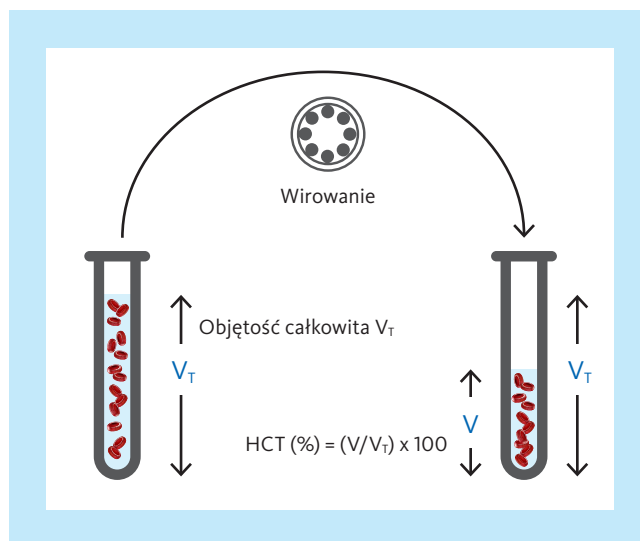
Anemia jest definiowana, jako obniżenie poziomu hemoglobiny (HGB) poniżej dolnego zakresu normy. Wartości, które determinują obecność lub brak anemii, zależą od płci i wieku. Innym parametrem, także zmniejszonym w anemii jest hematokryt (HCT), określany również jako objętość odwirowanych komórek (PCV).

Wskaźniki czerwonokrwinkowe

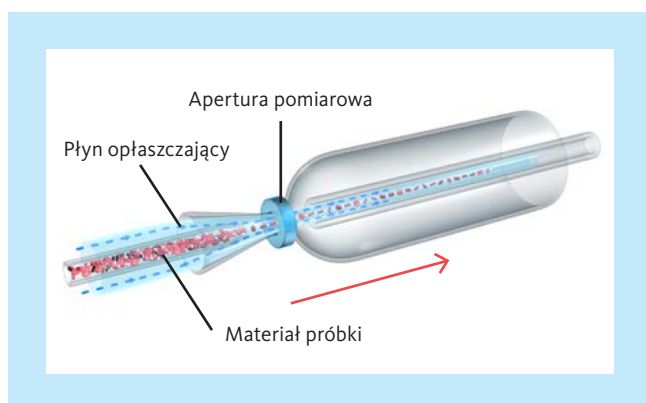
Parametry czerwonokrwinkowe generowane przez wszystkie analizatory hematologiczne uwzględniają: HGB, HCT, liczbę krwinek czerwonych (RBC), średnią objętość komórki (MCV), średnią masę hemoglobiny w krwince (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w krwince (MCHC). MCV, MCH i MCHC są powszechnie nazywane wskaźnikami czerwonokrwinkowymi. Rozpiętość rozkładu objętości krwinek czerwonych (RDW) dostarcza informacji na temat stopnia zróżnicowania rozmiarów poszczególnych krwinek czerwonych. Parametr ten od niedawna, wraz z tradycyjnymi wskaźnikami czerwonokrwinkowymi, jest używany w zawężaniu możliwych przyczyn anemii.

Technologia impedancyjna

Parametry takie jak RBC, HCT i MCV są blisko ze sobą związane, ponieważ wywodzą się z informacji uzyskanych w czasie przejścia komórek przez aperturę kanału impedancyjnego w automatycznym analizatorze hematologicznym. Metoda impedancyjna opiera się na założeniu, że pole elektryczne wytworzone między dwoma elektrodami o przeciwnym ładunku, może być wykorzystane do zliczania i określania wielkości komórek krwi, które są słabymi przewodnikami elektrycznymi. Natomiast rozcieńczalnik, w którym są one zawieszone, jest izotonicznym roztworem dobrze przewodzącym prąd. W konsekwencji, kiedy komórki zawieszone w rozcieńczalniku przechodzą przez aperturę między elektrodami, każda pojedyncza komórka chwilowo zwiększa impedancję (opór) między elektrodami i generuje impuls elektryczny proporcjonalny do jej rozmiaru.



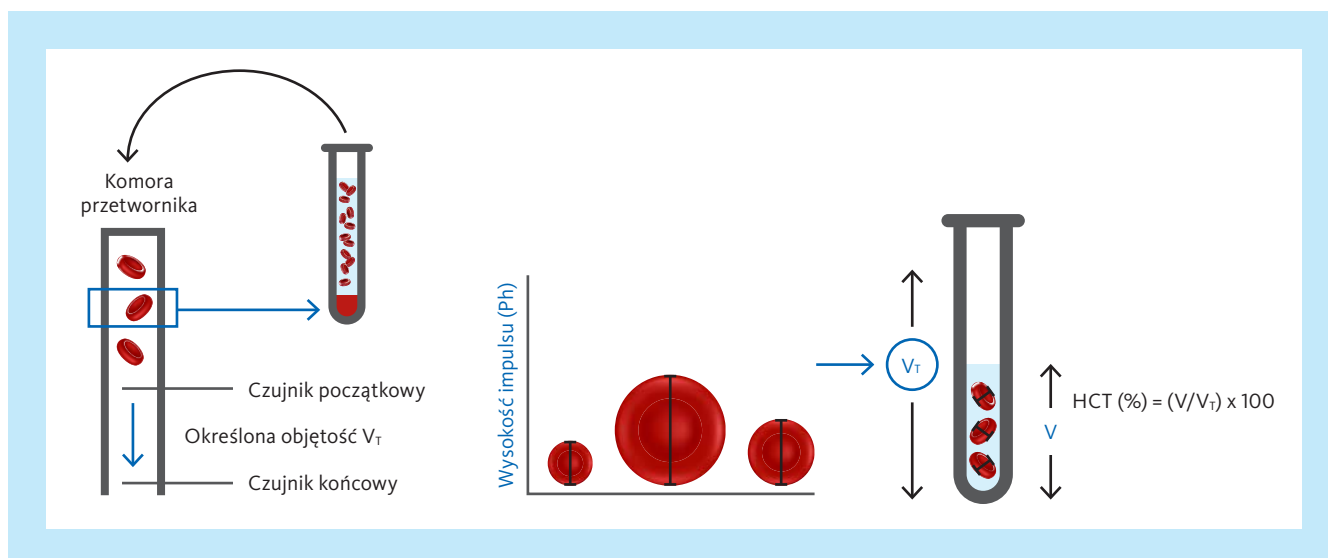
Ryc. 2 Schemat zasady otrzymywania wartości HCT w metodzie wykorzystującej wirowanie



Ryc. 1 Zasada działania metody impedancyjnej z ogniskowaniem hydrodynamicznym

Liczba krwinek czerwonych

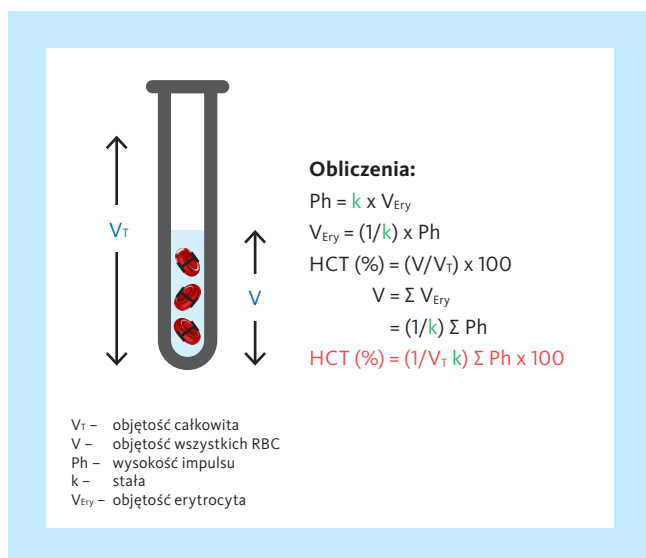
W analizatorach, które tak jak analizatory Sysmex, wykorzystują metodę zliczania bezwzględnego, liczba czerwonych krwinek otrzymywana jest na podstawie liczby impulsów wygenerowanych w określonej objętości próbki. Dla tej metody nie jest wymagana końcowa kalibracja. Analizatory używające względnych metod zliczania, określają liczbę krwinek czerwonych na podstawie impulsów wygenerowanych w określonej jednostce czasu i dlatego są podatne na błędy związane z zatkanie apertury, w związku z czym wymagają regularnej kalibracji.



Ryc. 3 Schemat automatycznego pomiaru HCT za pomocą skumulowanej wysokości impulsów (obliczenia patrz ryc. 4)

Hematokryt

HCT jest parametrem określającym całkowitą lub skumulowaną objętość krwinek czerwonych w stosunku do całkowitej objętości krwi. Powszechnie określany jest także jako objętość krwinek w hematokrycie (PCV) i wyrażany jako wartość procentowa lub ułamek (jednostka l/l). Pomimo że HCT i PCV są używane zamiennie to Międzynarodowa Rada Standaryzacji w Hematologii (ICSH) sugeruje aby przy pomiarach automatycznych używać raczej terminu HCT niż PCV. Pomiar HCT w analizatorach automatycznych ma niewiele wspólnego z upakowaniem krwinek czerwonych, a jest możliwy dzięki technologii impedancyjnej. Przejście każdej komórki przez aperturę pomiarową powoduje powstanie impulsu elektrycznego, proporcjonalnego do objętości komórki. Parametr HCT na analizatorach Sysmex jest otrzymywany ze skumulowanej wysokości poszczególnych pików, tak jak pokazano we wzorze na ryc. 4.



Ryc. 4 Wzór wykorzystywany w automatycznym pomiarze HCT

Średnia objętość krwinki czerwonej

Średnia objętość krwinki czerwonej jest wskaźnikiem wyliczanym z wykorzystaniem parametru RBC i HCT na podstawie następującego wzoru:

$$MCV (fl) = \frac{HCT}{RBC}$$

Zakresy wartości referencyjnych dla MCV są zależne od wieku. Terminy normocytoza, mikrocytoza i makrocytoza opisują populacje krwinek czerwonych odpowiednio o prawidłowym, obniżonym i podwyższonym MCV.

Średnia masa hemoglobiny w krwince

Średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej jest wyliczana z RBC i HGB według wzoru:

$$MCH (pg) = \frac{HGB}{RBC}$$

Zakresy wartości referencyjnych dla MCH są zależne od wieku. Wartość MCH zazwyczaj jest proporcjonalna do wartości MCV. Wielkość komórki w dużym stopniu zależy od zawartości hemoglobiny. Komórki, które mają prawidłowe MCH nazywane są normochromicznymi, natomiast o niskich wartościach MCH hipochromicznymi.

Średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej

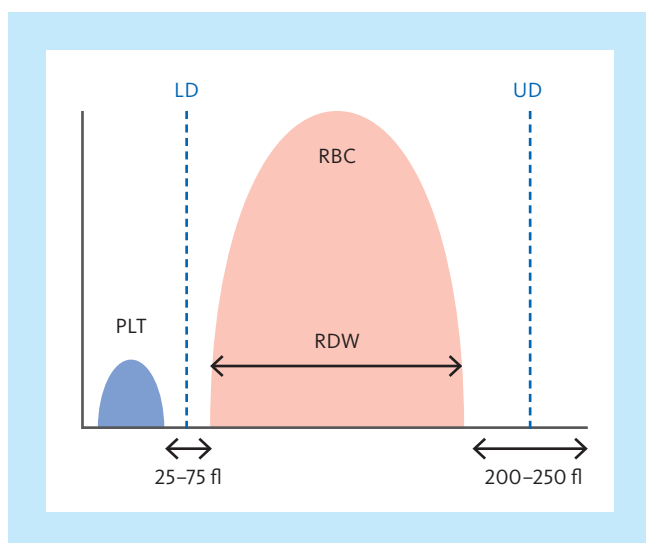
MCHC jest wyliczany z wykorzystaniem parametru HCT i HGB na podstawie następującego wzoru:

$$MCHC (g/dl) = \frac{HGB}{HCT}$$

Warto zauważyć, że zakres wartości referencyjnych dla MCHC jest bardzo wąski i stały, niezależny od wieku. MCHC, szczególnie w starszych źródłach, jest wykorzystywane do określania populacji krwinek czerwonych jako normochromicznych lub hipochromicznych. Wzrost wartości MCHC występuje rzadko i pojawia się praktycznie tylko, jeśli komórki są sferocytami lub są znacząco odwodnione (patrz dalej).

Rozpiętość dystrybucji krwinek czerwonych

Histogramy w analizatorach hematologicznych powstają poprzez naniesienie rozmiaru każdej komórki na wykres. Rozmiar ten jest określany na podstawie wysokości impulsu wytworzonego w czasie przejścia przez aperturę impedancyjną. Prawidłowo, na wykresie pojawia się więcej niż jedna populacja komórek. Razem widoczne są płytki krwi i krwinki czerwone, które odróżniane są od siebie dzięki tak zwanym dyskryminatorom wielkości. RDW jest parametrem, który ilościowo określa, jak bardzo zmienna jest wielkość pojedynczych komórek. Wyrażane jest jako RDW-SD (odchylenie standardowe) i RDW-CV (współczynnik zmienności).



Ryc. 5 Histogram RBC przedstawiający ideę RDW

Klasyfikacja anemii wykorzystująca wskaźniki czerwonekrwinkowe

Wskaźniki czerwonekrwinkowe pozwalają klinicyście na zawężenie zbioru potencjalnych przyczyn anemii, ponieważ mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie anemii wpływają na nie w określony sposób. Jako, że wielkość krwinki czerwonej zależy od zawartości hemoglobiny, to zaburzenia produkcji hemoglobiny powodują powstawanie komórek mniejszych niż prawidłowe. Mikrocytoza krwinek czerwonych zwykle towarzyszy anemii z niedoboru żelaza, talasemii (choroba dziedziczna, w której produkcja łańcucha globiny jest niedostateczna) i anemiom związanym z przewlekłym zakażeniem lub chorobą. Komórki makrocytowe pojawiają się, kiedy zaburzony jest podział prekursorów erytrocytów w szpiku kostnym. Najczęstszą przyczyną anemii makrocytozowej jest niedobór witaminy B12 i kwasu foliowego, nazywany także anemią megaloblastyczną. Liczba RBC w anemii normoblastycznej jest niska, ale wielkość i ilość hemoglobiny w komórkach jest prawidłowa. Anemia normocytowa może być spowodowana zmniejszoną produkcją (z powodu zmian nowotworowych lub innych zaburzeń szpiku kostnego), zwiększonym niszczeniem krwinek czerwonych (hemoliza) lub utratą krwi.

Komórki nazywane hipochromicznymi, oglądane pod mikroskopem są blade i mają niskie MCH, które wskazuje na zbyt małą zawartość hemoglobiny, spowodowaną nieadekwatną produkcją. Niedobór żelaza jest najczęstszą przyczyną anemii hipochromicznej.

MCHC mówi o stosunku zawartości hemoglobiny w krwince do objętości krwinki czerwonej. Komórki ze zbyt małą zawartością hemoglobiny są jaśniejsze i mają niskie MCHC, które jest charakterystyczne dla anemii mikrocytowych hipochromicznych, takich jak niedobór żelaza. W anemiach makrocytowych MCHC jest zazwyczaj prawidłowe. MCHC odzwierciedla także wewnętrzną lepkość komórki, ponieważ hemoglobina wypełnia prawie całą objętość erytrocytu. Jeśli MCHC jest za wysokie, komórki tracą zdolność zmiany kształtu i powrotu do oryginalnego kształtu, co jest niezbędne do powtarzalnego przechodzenia przez mikrocyrkulację bez przedwczesnego zniszczenia. W konsekwencji komórki czerwone mają swój naturalny, maksymalny górny limit MCHC, który jest rzadko podwyższony z przyczyn klinicznych. Jedynym wyjątkiem jest sytuacja, w której krwinki czerwone stają się sferocytami z powodu utraty białek utrzymujących prawidłowy kształt. Podwyższone MCHC jest najczęściej obserwowane w dziedzicznej sferocytzie, w której czas przeżycia krwinek jest zmniejszony z powodu defektu w budowie białka błonowego, ale może pojawić się także w warunkach nabytych, takich jak hemoliza o podłożu immunologicznym lub w ciężkich oparzeniach.

RDW jest wskaźnikiem zmienności rozmiaru krwinek czerwonych. Wysokie RDW wskazuje na nieprawidłową zmienność wielkości komórek, nazywaną anizocytozą. RDW pomaga w rozróżnianiu różnych typów anemii, które mają podobne wskaźniki czerwonekrwinkowe. Jest powszechnie stosowane w rozróżnianiu anemii z niedoboru żelaza i łagodnej talasemii, gdyż obydwie wykazują mikrocytozę, hipochromię i posiadają podobne wartości MCV i MCH. Jednakże anemia z powodu niedoboru żelaza, w odróżnieniu od łagodnej talasemii, ma nieprawidłowo szerokie RDW.

Podsumowanie klasyfikacji anemii za pomocą wskaźników czerwonekrwinkowych przedstawione jest w tabeli 1.

Tabela 1 Klasyfikacja anemii przy użyciu wskaźników czerwonekrwinkowych

Morfologiczny typ anemii	Przykład	MCV	MCH	MCHC
normochromiczna normocytowa	utrata krwi choroby przewlekłe	N	N	N
hipochromiczna mikrocytowa	niedobór żelaza talasemie choroby przewlekłe (późny okres)	↓	↓	N lub ↓
normochromiczna makrocytowa	anemia megaloblastyczna	↑	↑	N

Czy wartości otrzymywane z różnych analizatorów są zawsze takie same?

Odpowiedź brzmi „nie”. Powszechnie przyjmuje się, że z powodu różnic w technologiach, jakościowe i ilościowe informacje (np. czułość flagowania) nie będą w 100 % zgodne pomiędzy analizatorami różnych wytwórców. Zatem, ważne jest aby wyniki tego samego pacjenta były interpretowane w oparciu o zakresy referencyjne opracowane dla danego typu analizatora. Zakresy referencyjne z podręczników lub innych analizatorów nie mogą być używane zamiennie, bez sprawdzenia czy są to wartości odpowiednie. Jednak, jest to rzadko stosowane i w konsekwencji, często pojawiają się pytania o różnice w wartościach otrzymanych od różnych producentów, w szczególności jeśli chodzi o MCHC.

FAQ#1: Dlaczego wartości MCHC otrzymane na analizatorach Sysmex nie są identyczne do tych otrzymywanych na innych analizatorach?

MCHC otrzymane z analizatorów hematologicznych Sysmex jest wyliczane z wartości HGB i HCT za pomocą wzoru tak jak przedstawione to zostało wcześniej w tekście.

Na analizatorach Sysmex klasy X, HGB i HCT są mierzone z dużą precyzją. Wiarygodność wartości MCHC jest zależna od wartości HGB i HCT, które są współzależne. MCHC ma względnie wąski zakres wartości prawidłowych. Niskie MCHC świadczy o obecności hipochromicznych krwinek czerwonych i jest wczesnym markerem rozwoju niedoboru żelaza. MCH i MCHC spada zanim komórki staną się mikrocytami. Wzrost MCHC jest zazwyczaj spowodowany błędami analitycznymi, dlatego MCHC jest powszechnie stosowane do monitorowania sprawności technicznej aparatu. Jednakże, są kliniczne wyjątki:

1. Znaczna sferocytoza krwinek czerwonych (np. sferocytoza dziedziczna, ciężkie oparzenia, ciężkie zakażenie *Clostridium difficile*) – zazwyczaj wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie HGB w krwince czerwonej z powodu utraty objętości komórki.
2. Choroba zimnych aglutynin – zlepy krwinek czerwonych i fałszywie niski HCT
3. Hiperlipidemia lub inny czynnik powodujący wzrost mętności osocza – fałszywie wysokie HGB.

Warto zauważyć, że analizatory hematologiczne różnych producentów wykorzystują różne metody pomiaru HGB i HCT. Ważne jest, aby pamiętać, że MCHC wylicza się z wartości HGB i HCT, natomiast wartość HCT nie jest mierzona u wszystkich producentów, w odróżnieniu od analizatorów Sysmex. Analizatory Beckman Coulter mierzą MCV, które jest używane do wyliczenia HCT.

Istnieje kilka czynników wpływających na ostateczny wynik pomiaru MCV: kształt i wielkość apertury kanału impedancyjnego, obecność lub brak ogniskowania hydrodynamicznego i osmolalność płynu osłonowego. Czynniki te wspólnie wpływają na stopień deformowania komórki w momencie przejścia przez aperturę. Eryocyty mają zdolność zmiany kształtu z dwuwklęsłego dyskoidalnego do wydłużonego, nieco przypominającego cygaro, pod wpływem szybkiego przyspieszenia płynu osłaniającego. Dzięki ogniskowaniu hydrodynamicznemu, które posiadają analizatory Sysmex klasy X (oraz poch-100i), stopień przyspieszenia jest znacząco zmniejszony. Wysokość wygenerowanego impulsu elektrycznego zależy bardziej od wielkości przekroju niż od faktycznej objętości. Wysokość impulsu wykorzystywana jest do wyliczenia objętości danej komórki, według wzoru zawierającego stały współczynnik (Ryc. 3), który oparty jest na założeniu, że komórki deformują się w określony sposób w czasie przejścia przez aperturę.

Jednak, w rzeczywistości poza czynnikami wcześniej wymienionymi, na odkształcenia komórki ma wpływ wewnętrzna lepkość, np. zawartość hemoglobiny.

Należy zauważyć, że komórki o wysokiej lepkości wewnętrznej (tj. komórki o wysokim MCHC) są mniej podatne na deformację i w ten sposób są przeszacowane w wielkości, natomiast te o niskiej lepkości wewnętrznej (tj. komórki o niskim MCHC) mają niedoszacowaną wielkość. Jako, że tylko komórki o wysokim MCHC mają zawyżoną wielkość, a tylko komórki o niskim MCHC mają zaniżoną wielkość, oba „normalizują” ekstrema MCHC i w ten sposób zawężają prawdziwy zakres MCHC. W konsekwencji MCHC w przeszłości uważane było za mało użyteczny parametr kliniczny, ale dobry parametr kontroli technicznej. Jednak MCHC oznaczane na aparatach Sysmex wykazuje dużo mniejszy „efekt zawężania”, ponieważ komórki są mniej deformowane w porównaniu do analizatorów hematologicznych, które nie wykorzystują ogniskowania hydrodynamicznego. Wpływa to na lepsze odzwierciedlenie prawdziwej wartości MCHC i dlatego można się spodziewać znacznie szerszego zakresu referencyjnego.

Bull wspólnie z innymi autorami (1996) wykazali, że „prawdziwość” MCHC otrzymanego z różnych analizatorów z wykorzystaniem mierzonego HCT (lub $MCV \times RBC$) w porównaniu do HCT otrzymanego przy użyciu referencyjnej metody mikrohematokrytu (PCV), zależy od zastosowanej technologii. Ich zdaniem kwadrat współczynnika korelacji (r^2) dla każdej testowanej metody odzwierciedla w wartościach procentowych jak blisko prawdziwej wartości MCHC (metoda manualna) jest MCHC generowane przez analizator. Wyniki pokazano w tabeli 2.

Tabela 2 Wartości r^2 otrzymane na analizatorach automatycznych w porównaniu do metody referencyjnej otrzymywania wskaźników czerwonych krwinek

Method	MCHC	MCV	MCH
Impedancja bez HDF (np. CELL-DYN 3000)	0,178	0,709	0,905
Impedancja bez HDF (np. Counter)	0,278	0,602	0,812
Optyczna z HDF i opłaskaczaniem (np. Bayer Technicon)	0,556	0,738	0,866
Impedancja z HDF (np. Sysmex)	0,729	0,860	0,904

HDF = Ogniskowanie hydrodynamiczne

W oparciu o te i o inne badania [2], oczywiste jest, że wartości otrzymane z analizatorów nieposiadających ogniskowania hydrodynamicznego słabo korelują z rzeczywistym MCHC krwinek czerwonych i nie mogą być używane jako parametr kliniczny. Z drugiej strony, wartości MCHC otrzymane na analizatorach posiadających ogniskowanie hydrodynamiczne (takie jak Sysmex) wykazują dużo lepszą korelację z metodą manualną i mogą być pomocne w klasyfikowaniu anemii.

Dlatego można się spodziewać, że wartości MCHC otrzymane na analizatorach Beckman Coulter będą się różniły od tych otrzymanych na analizatorach Sysmex. Należy również zauważyć, że wskaźniki czerwonych krwinek z jednego analizatora nie mogą być stosowane zamiennie z tymi z innego analizatora w celu obliczenia MCHC tj. zarówno HGB i HCT powinny być otrzymane z tego samego analizatora, jeśli wykonywane jest obliczenie manualne.

Wobec tych niewielkich różnic, w instrukcji obsługi analizatorów Sysmex, wyraźnie jest podkreślone, że każde laboratorium powinno ustalić własne zakresy referencyjne zgodnie z wytycznymi CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute).

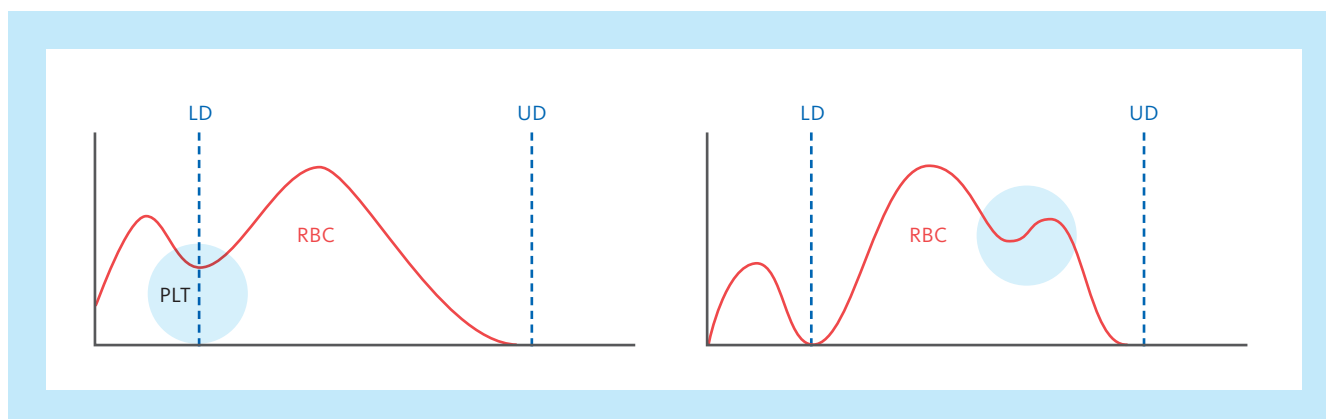
Aparaty, które nie wykorzystują ogniskowania hydrodynamicznego (np. Beckman Coulter i starsze modele CELL-DYN) są w większym stopniu podatne na „efekt zawężania”, tzn. mają węższe zakresy prawidłowego MCHC. Tu, MCHC służy jako parametr QC do oceny technicznej analizatora.

Analizatory Sysmex (impedancyjne z ogniskowaniem hydrodynamicznym) i Advia Siemensa (optyczne z ogniskowaniem hydrodynamicznym i sferyzacją) wykazują najmniejszy stopień „efektu zawężania”. W ich przypadku MCHC ma szerszy zakres wartości referencyjnych i zapewnia kliniczną wartość w ocenie anemii.

Warto podkreślić, że podręcznikowa klasyfikacja anemii jako normochromicznej lub hipochromicznej opierała się na MCHC, który w tym czasie był obliczany przy użyciu metody mikrohematokrytu, a nie był wartością automatyczną. Niektóre późniejsze opisy odnoszą się do MCH, prawdopodobnie z tego powodu, że wartości MCHC z analizatorów nie były dość wiarygodne do odzwierciedlania stanu RBC pacjenta.

FAQ#2: Dlaczego czasem wartość RDW jest odrzucana?

Aby analizator mógł policzyć wartość RDW z krzywej rozkładu objętości krwinek czerwonych, muszą być spełnione pewne kryteria. Pomiar RDW-SD przeprowadzany jest na wysokości względnej 20% powyżej linii bazowej. Jeśli jedno z ramion krzywej histogramu nie zdoła przejść poniżej 20%, wartość RDW nie może być obliczona i nie zostanie wyświetlona. W ten sposób, analizator komunikuje użytkownikowi, że w próbce może być obecne coś innego niż nienaruszone krwinki czerwone i może fałszować informacje dotyczące krwinek czerwonych, np. płytki olbrzymie lub aglutynacja krwinek czerwonych. Przez ograniczenie danych, użytkownik jest zmuszony do weryfikacji próbki w celu wykrycia przyczyny inter-



Ryc. 6 Histogram RBC pokazujący kiedy wartość RDW jest odrzucana

ferencji. Podobnie, jeśli histogram ma podwójny pik, który może się pojawić w przypadku występowania podwójnej populacji krwinek czerwonych, RDW zostaje odrzucony. W tym wypadku RDW nie jest wyświetlane, ponieważ analizator podejrzewa obecność dwóch populacji. W tym wypadku analiza krzywej i zwrócenie uwagi na podwójny pik dostarczy dużo więcej informacji niż samo wyświetlenie wartości RDW. Identyfikacja obecności dimorfizmu dostarcza dużo więcej wskazówek dotyczących stanu pacjenta niż wartość RDW, która w tym przypadku będzie szeroka. Lista możliwych czynników wystąpienia podwójnego piku na histogramie jest znacznie węższa niż możliwe przyczyny szerokiego RDW.

Do zapamiętania

Wskaźniki czerwonych krwinek są bardzo przydatne w klasyfikacji anemii, co pomaga lekarzowi ocenić odpowiedni wybór kolejnych badań w celu zidentyfikowania pierwotnej przyczyny anemii i wprowadzić odpowiednie leczenie. Dodatkowe wykorzystanie zliczania retikulocytów i związany z nim parametr RET-He (dostępny na analizatorach Sysmex wyposażonych w kanał retikulocytarny) ułatwią to jeszcze bardziej. Laboratoria powinny zawsze przestrzegać dobrej praktyki laboratoryjnej i ustanowić własne zakresy referencyjne w celu zapewnienia odpowiedniej interpretacji wyników, ponieważ można się spodziewać różnic między technologiami w analizatorach. Ponadto, należy pamiętać, że kiedy porównujemy wyniki z różnych analizatorów to odstęp czasu pomiędzy pomiarami może mieć znaczny wpływ na wyniki, ponieważ komórki mogą w tym czasie zwiększyć swoją objętość.

Źródła

- [1] **Jones AR.** (1995): *Absolute versus proportional differential leucocyte count.* Clin Lab Haematol 17(2): 115 – 123.
- [2] **Heimpel H.:** „Hämatologie in der Praxis”, Gustav Fischer Verlag, 2nd edition – German
- [3] **Herklotz R et al.** (2006): *Reference ranges in haematology.* Therapeutische Umschau 63:5 – 24.