

SEED Hematologia



Znaczenie rozmazu krwi obwodowej w nowoczesnej hematologii laboratoryjnej

Automatyczne liczenie komórek

Przez kilkanaście ostatnich lat dziedzina hematologii laboratoryjnej znacznie się rozwinęła. Manualne metody oznaczania pojedynczych parametrów zostały zastąpione przez automatyczne analizatory wykonujące pełną morfologię krwi (CBC), jak również ocenę wzoru odsetkowego leukocytów. Przyczyną tego jest większa precyzja i dokładność automatycznego zliczania, w porównaniu do metod manualnych. Należy jednak pamiętać, że automatyczne zliczanie jest lepsze w przypadku dobrze scharakteryzowanych dojrzałych krwinek białych, natomiast do różnicowania niedojrzałych i nieprawidłowych komórek, w których występują zmiany cytologiczne, dokładniejsza jest ocena mikroskopowa. Analizatory hematologiczne oprócz informacji ilościowych, dostarczają danych jakościowych w formie „flag”, czyli alertów komunikujących możliwość wystąpienia interferencji lub nieprawidłowych komórek, a tym samym możliwość otrzymania błędnych wyników.

W związku z tym wykonanie manualnego rozmazu krwi obwodowej wymagane jest tylko, gdy występują nieprawidłowości ilościowe i flagi.

Manualny rozmaz krwi obwodowej

Powszechnie panuje przekonanie, że manualna metoda różnicowania jest lepsza niż zliczanie automatyczne, w odniesieniu do próbek patologicznych. Jednak jest to słuszne tylko w określonych warunkach. Manualne obliczanie wzoru odsetkowego krwinek białych polega na wizualnej ocenie zabarwionego rozmazu krwi pod mikroskopem.

Do prawidłowej oceny morfologii komórek niezbędne są świeże i dobrze przygotowane rozmazy krwi obwodowej, a na końcowy wynik takiej oceny wpływają cztery czynniki: jakość rozmazu, jakość barwnika, jakość mikroskopu oraz umiejętności i doświadczenie osoby oceniającej.

a) Wykonanie rozmazu krwi obwodowej

Rozmazy krwi obwodowej są zazwyczaj wykonywane przy użyciu technik „spread” (ang. rozprosz) lub „wedge” (ang. klin). W celu manualnego wykonania rozmazu należy kroplę krwi umieścić na brzegu szkiełka i rozprowadzić ją na szkiełku podstawowym, za pomocą szybkiego przesunięcia drugiego szkiełka (lub szkiełka rozprowadzającego) nachylonego pod odpowiednim kątem.

Dobrze zrobiony rozmaz jest gruby na początku (krwinki czerwone nakładają się na siebie), stopniowo staje się coraz cieńszy, a na końcu posiada dobrze rozdzielone komórki. Tak zwana „strefa oceny” — obszar o optymalnej grubości do oceny pod mikroskopem świetlnym, powinna mieć przynajmniej 2 cm długości. Rozmaz powinien zajmować centralną część szkiełka, a po bokach powinien być pozostawiony margines.

Wykonanie dobrego rozmazu wymaga praktyki. Rozmaz nie może być zbyt cienki lub zbyt gruby, a ogon rozmazu powinien być gładki. Idealna jakość rozmazu zależy od: szybkości, kąta i wielkości kropli.

- Szybkie przesunięcie szkiełka rozprowadzającego daje długi i cienki rozmaz. Im wolniej szkiełko jest przesuwane, tym krótszy i grubszy jest rozmaz.
- Kąt większy niż 30° powoduje, że rozmaz jest grubszy; kąt mniejszy niż 30° sprawia, że rozmaz jest cieńszy.
- Mała kropla krwi może być niewystarczająca do wykonania rozmazu o odpowiedniej długości; zbyt duża może spowodować rozciągnięcie rozmazu poza granice szkiełka.

Na rozmaz może wpływać także, bardzo zmienna i zależna od pacjenta, lepkość krwi (hematokryt).

U osób cierpiących na anemię krew wykazuje mniejszą lepkość, przez co rozmaz może być zbyt cienki, jeśli nie zostanie zwiększony kąt nachylenia. Przeciwna sytuacja wystąpi w przypadku krwi pacjenta cierpiącego na czerwienicę.

Nieodpowiednia grubość rozmazu może stanowić problem. W rozmazach wyjątkowo cienkich (z powodu zbyt małej kropli, zbyt wolnego rozprowadzania lub zbyt małego kąta nachylenia), krwinki czerwone (RBC) mogą wyglądać jak sferocyty. Z kolei liczba krwinek białych (WBC), takich jak monocyty i neutrofile, będzie większa na ogonie. Powoduje to wyznaczenie nieprawidłowego wzoru odsetkowego. Natomiast w wyjątkowo grubych rozmazach obszar zliczania jest zbyt mały, ponieważ do odpowiedniego różnicowania WBC konieczne jest co najmniej 10 pól widzenia (pod małym powiększeniem), w których 50% RBC nie nakładają się na siebie. Z kolei ostry koniec, zabrudzenie szkiełka rozprowadzającego lub akumulacja WBC (z powodu zbyt wolnego rozprowadzania lub bardzo wysokiej liczby WBC) powodują, że rozmaz kończy się obszernym lub postrzępionym ogonem.

b) Barwienie rozmazu

Krew obwodowa wymaga barwienia, ze względu na potrzebę uwydatnienia szczególnych cech wyglądu cytoplazmy i jądra komórkowego u różnych komórek. W hematologii powszechnie stosowane jest barwienie Romanowskiego lub jego pochodne, takie jak Wright, Wright-Giemsa i May-Grunwald-Giemsa.



Ryc. 1 a) rozmaz ręczny o słabej jakości
b) rozmaz automatyczny o dobrej jakości

Tab. 1 Zabarwienie elementów komórkowych w wyniku barwienia Romanowskiego (Dacie and Lewis, *Practical Haematology*)¹

	Element komórkowy	Kolor
Jądro	chromatyna jąderko	fioletowy jasny niebieski
Cytoplazma	erytrocyt	ciemny róż
	retikulocyt	szaro-niebieski
	limfocyt	niebieski
	monocyt	szaro-niebieski
	neutrofil	różowy
	eozynofil	różowy
Ziarnistości	bazofil	niebieski
	neutrofile	fioletowy
	(ziarnistość toksyczna)	(ciemny niebieski)
	eozynofile	pomarańczowo-czerwony
	bazofile	fioletowo-czarny
Wtręty	płytki krwi	fioletowy
	zarodek malarii	fioletowy

Barwienie Romanowskiego zawiera kombinację barwników: eozyny i błękitu metylenowego i/lub któregośkolwiek z produktów jego oksydacji. W wyniku tego barwienia, oglądane pod mikroskopem komórki uzyskują niebieskie, fioletowe lub różowe zabarwienie (tab. 1).

Mechanizm barwienia

Mechanizm, w którym niektóre elementy strukturalne komórki są barwione, podczas gdy inne podobne struktury nie ulegają zabarwieniu, zależy od złożonych różnic pomiędzy barwnikami, od tego jak ze sobą reagują, a także od pH barwnika i mikrośrodowiska komórkowego. Kwasowe struktury oddziałują z zasadowym barwnikiem — błękitem metylenowym o niebieskim kolorze. Natomiast struktury zasadowe przyłączają barwniki kwasowe, w tym wypadku eozynę, która jest różowa. Dlatego ziarnistości eozynofili są intensywnie różowe, a ziarnistości bazofili intensywnie fioletowe. Termin „eozynofilny” odnosi się do powinowactwa do eozyny (barwnik różowy), a „bazofilny” do zasady lub niebieskiego barwnika.

W procedurze barwienia Romanowskiego wykorzystywany jest także alkohol metylowy, który działa zarówno jako rozpuszczalnik, jak i środek utrwalający.

Czynniki powodujące błędne barwienie

Złe barwienie szkiełka może być wywołane przez wiele czynników. Objawia się tym, że szkiełko jest zbyt ciemne lub zbyt blade, zbyt niebieskie lub zbyt różowe, ziarnistości są bardzo ciemne lub niewidoczne, tło jest niebieskie lub widoczne są złoży barwnika. Różne struktury komórkowe mają różne powinowactwo do barwników – DNA łączy się natychmiast, wolniej wiąże się RNA, a najwolniej hemoglobina. Z tego powodu w celu otrzymania jakościowo dobrego wyniku konieczny jest prawidłowy czas barwienia.

Niezbędne jest również stosowanie barwników w odpowiedniej proporcji, ponieważ one także reagują ze sobą. W przypadku odczynników przygotowywanych samodzielnie, częstą przyczyną błędów są źle dobrane proporcje, jednak problem ten można wyeliminować przez stosowanie komercyjnie dostępnych barwników. Istotne jest również pH barwnika, które powinno znajdować się w zakresie 6,8–7,2. Innymi przyczynami błędów są: nadużywanie barwnika, wysoka temperatura otoczenia powodująca parowanie oraz zanieczyszczenie bakteriami lub innymi cząstkami.

Automatyczne wykonanie rozmazu i barwienia

Jeśli nie są przestrzegane wytyczne dotyczące przygotowywania i barwienia szkiełek, istnieje prawdopodobieństwo, że rozmazy będą niskiej jakości. Może być to przyczyną błędów w ocenie mikroskopowej i potencjalnie poważnych konsekwencji w opiece nad pacjentem.

Zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej, standaryzowane przygotowywanie szkiełek i barwienia gwarantują dobrą jakość rozmazów krwi obwodowej. Najlepszą formą standaryzacji jest automatyzacja, która jeśli została zastosowana w laboratorium, najczęściej ogranicza się do etapu barwienia. Większość automatycznych systemów barwienia to tak zwane „systemy otwarte” pozwalające na użycie dowolnego barwnika, również przygotowywanego samodzielnie. Dlatego można powiedzieć, że w tej procedurze kontrolowany jest tylko czas barwienia. Nie jest eliminowane prawdopodobieństwo użycia zbyt dużej ilości lub nieprawidłowego składu barwników. Ponadto automatyczne barwienie rozmazów wykonywanych ręcznie, nadal nie gwarantuje dobrej jakości wyniku.

W pełni zautomatyzowane aparaty do wykonywania i barwienia rozmazów zazwyczaj są przeznaczone dla laboratoriów wykonujących bardzo dużo rozmazów. Rozwiązanie dla mniejszych laboratoriów zostało przygotowane przez Sysmex, we współpracy z RAL Diagnostics oraz Cellavision i składa się z niezależnych

urządzeń umożliwiających automatyczne przygotowanie standaryzowanego rozmazu, barwienia i cyfrowej oceny morfologii komórek krwi.

Mikroskopowa ocena rozmazów krwi obwodowej

Optymalne wyniki, oprócz dobrej jakości rozmazu i barwienia, wymagają także odpowiedniej konserwacji mikroskopu oraz wprawionego operatora.

Tak jak w przypadku innych urządzeń laboratoryjnych, mikroskop wymaga regularnych czynności konserwacyjnych. Ciepłe, wilgotne klimaty sprzyjają rozwojowi grzybów, które niszczą układ optyczny, przez co mikroskop staje się bezużyteczny. Z kolei w gorącym i suchym klimacie problemem jest kurz.

Mikroskop powinien być prawidłowo ustawiony w celu otrzymania odpowiedniej ilości światła i wyeliminowania artefaktów refrakcyjnych, które mogą być błędnie ocenione jako wtręty komórkowe.

Porównanie różnicowania krwinek białych metodą manualną i automatyczną

Szczegółowy opis działania analizatorów Sysmex i sposób różnicowania WBC jest opisany w artykule „Przegląd korzyści płynących ze zmiany analizatora hematologicznego 3-Diff na analizator hematologiczny 5-Diff”. W przypadku porównania liczenia automatycznego i manualnego widoczne są różnice, które większość laboratoriów interpretuje na korzyść zliczania manualnego, kwestionując dokładność zliczania automatycznego.

Należy pamiętać, że status metody referencyjnej przypisany do manualnego różnicowania krwinek białych opiera się o wytyczne CSLI, mówiące o zliczeniu 800 komórek (2 osoby liczące po 200 komórek w 2 rozmazach), a nie o rutynowej praktyce zliczania przez jedną osobę 100 komórek w jednym rozmazie.

Ponadto analizatory hematologiczne zliczają znacznie więcej elementów, np. analizator Sysmex wykonuje różnicowanie krwinek białych z około 10 000 komórek, dlatego różnice w stosunku do metody manualnej mogą być całkiem znaczne i obejmować przyczy, takie jak:

a) Nierówny rozkład komórek w rozmazie

Nawet w najlepszym rozmazie rozkład komórek nie jest przypadkowy. Z reguły neutrofile i monocyty mają skłonność do umiejscawiania się na końcu rozmazu, a limfocyty pośrodku.

Ten problem jest uwidoczniony, gdy rozmaz jest zbyt cienki lub brzeg jest poszarpany. W automatycznym zliczaniu, komórki są zawieszone w roztworze i każda pojedyncza komórka jest liczona w każdej podwielokrotności próbki.

b) Nieprawidłowe określanie i pomijanie komórek

Cechą ludzkiej natury jest przeglądanie szkiełka w poszukiwaniu „dobrego miejsca do liczenia”, a wszelkie nietypowe komórki, które zobaczymy są często używane, jako punkt startowy obszaru zliczeń. W związku z tym, odsetek komórek nieprawidłowych może zostać przeszacowany. Podobnie dość powszechna jest tendencja do przeskakiwania komórek, które są trudne morfologicznie do rozpoznania. Analizator z kolei identyfikuje i kategoryzuje każdą pojedynczą komórkę.

Najczęściej jako przykład rozbieżności wyniku, zależnego od metody zliczania, wskazywana jest liczba monocytów. Przyczyna tego jest złożona, ponieważ:

- monocyty mają skłonność do gromadzenia się w ogonie rozmazu, który z reguły nie stanowi obszaru zliczeń.
- monocyty morfologicznie mogą być mylone z aktywowanymi limfocytami, przez co są „pomijane” w zliczaniu 100 komórek.
- im starsza jest krew przed wykonaniem rozmazu tym więcej komórek ulega rozpadowi, w wyniku czego trudniej jest dokładnie zidentyfikować monocyty.
- eozynofile i bazofile, chociaż względnie występują dość rzadko, są bardzo charakterystyczne i łatwe do zidentyfikowania.

Monocyty są mniejszościową populacją, więc każda mała różnica spowodowana którąś z powyższych przyczyn jest nasilana. W związku z tym, liczba monocytów pochodząca z analizatora jest z zasady wyższa niż w przypadku liczenia manualnego. Różnice te byłyby mniejsze gdyby wytyczne CSLI były ściśle przestrzegane.

Ponieważ manualne zliczanie monocytów uznane zostało za metodę mało wiarygodną, jako nową metodę referencyjną zaproponowano wykorzystanie znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał monoklonalnych CD45 i CD14, we fluorescencyjnej cytometrii. Wykazała ona dobrą korelację ze zliczaniem automatycznym².

Zakresy referencyjne dla automatycznego i manualnego różnicowania komórek

Sposobem aby poradzić sobie z widocznymi różnicami pomiędzy zliczaniem automatycznym i manualnym, w szczególności z liczbą monocytów, jest ściśle postępowanie z Dobrą Praktyką Laboratoryjną i ustanowienie zakresów referencyjnych dla każdej z metod. W ten sposób wartości otrzymane będą odpowiednio interpretowane w zależności od źródła, bez wpływu na ocenę kliniczną.

Porównanie normalnych i patologicznych populacji komórek

Jak opisano w artykule „Przegląd korzyści płynących ze zmiany analizatora hematologicznego 3-Diff na analizator hematologiczny 5-Diff”, analizatory automatyczne poprzez flagi powiadają użytkownika o podejrzeniu obecności nieprawidłowych krwinek białych. W takim przypadku należy wykonać rozmaz krwi obwodowej i ocenić go pod mikroskopem.

Dla całkowicie prawidłowych próbek, gdzie nie występują flagi, odpowiedniejsze jest zliczanie i różnicowanie automatyczne.

Podsumowanie

1. W dobie nowoczesnej zautomatyzowanej technologii, nie ma potrzeby wykonywania manualnego zliczania i różnicowania krwinek białych, jak i wykonywania rozmazu krwi obwodowej we wszystkich przypadkach. Powinno być to zarezerwowane tylko dla próbek, które przez aparat są zidentyfikowane jako podejrzan o występowanie zaburzeń morfologicznych lub nieprawidłowości ilościowych komórek. To powinno dać laboratoriom możliwość lepszego wykorzystania umiejętności i dostępności personelu, dzięki skupieniu się tylko na tych rozmazach, które naprawdę wymagają szczególnej uwagi.
2. W celu zapewnienia, że ocena mikroskopowa dostarczy wynik, któremu można zaufać w ocenie klinicznej, jakość rozmazu i barwienia muszą być optymalne. Najlepszą drogą osiągnięcia tego jest automatyzacja, zarówno wykonywania szkiełek jak i barwienia.
3. Różnice w manualnym i automatycznym zliczaniu będą się pojawiać szczególnie w przypadku monocytów. Zaleca się określenie zakresów referencyjnych, oddzielnych dla każdej metody.

Źródła

- [1] **Dacie and Lewis, Practical Haematology**, 9th edition, Edited by SM Lewis, BJ Bain, I Bates, Chapter 4: Preparation and staining methods for blood and bone marrow smears, page 50.
- [2] **Hübl W, Andert S, Erath A, Lapin A, Bayer PM. (1995):** Peripheral blood monocyte counting: towards a new reference method. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 33: 839-845.

Redakcja Dr Marion Münster