

Hematologi og tolkning av cytogrammer

Stein Istre Thoresen
Sentrallaboratoriet
Norges veterinærhøgskole

Hemogram

1. Systematisk tilnærming
2. Vurdering av de enkelte analysesvar
3. Se enkeltresultatene i sammenheng

Analysemuligheter

1. Prøvemateriale
2. Valg av analyser

Tolkning av cytogrammer

1. Forkortelser (Tabell 1)
2. Grafisk tolkning for erythrocytter
3. Grafisk tolkning for leukocytter

Eksempler på utskrifter fra ulike dyrearter

Hemogram

En fullstendig hematologisk undersøkelse er en samling analyser som gir en mest mulig fullstendig beskrivelse av blodcellene. Dette er kanskje en av de analyseprofilene som samlet sett gir mest klinisk informasjon forutsatt at metodene som benyttes for analyse er validert for den dyrearten det gjelder. Ofte gir analyse av hemogram tilstrekkelig informasjon til å evaluere kliniske tilstander relatert til forandringer i blodceller, men av og til oppstår behov for tilleggsinformasjon som bare en benmargsprøve kan gi. Benmargsprøver og diskusjon av disse omtales ikke videre her.

1. Systematisk tilnærming

Det er viktig å etablere en systematisk tilnærming til resultatene av et hemogram.

Informasjonsmengden fra et fullstendig hemogram er stor og består vanligvis av en rekke tallresultater, indekser, cytogrammer og histogrammer.

2. Vurdering av de enkelte analysesvar

Først må man bli familiær med hva alle tallene og kurvene betyr og vurdere hvert enkelt resultat for seg. Oppgitte referanseområder må ikke tolkes som absolutte størrelser men ses i sammenheng med den enkelte pasient (alder, rase).

3. Se enkeltresultatene i et hemogram i sammenheng

Før man kan stille en diagnose må alle enkeltresultatene være vurdert i sammenheng. Enkelte resultater er mer eller mindre relatert til hverandre (for eksempel antall erytrocytter og hematokrit) mens for eksempel antall reticulocyttar bør vurderes som en absolutt størrelse (grad av benmargsrespons) og ikke utelukkende som en andel av det totale antall erytrocytter. En diagnose må ikke stilles basert på et hemogram før hele hemogrammet er vurdert og alle resultatene vurdert. Det er også viktig å ha klart for seg hva som nødvendige og tilstrekkelige forutsetninger for å stille en diagnose. Hvilke kriterier skal være tilfredsstillende for å stille diagnosen anemi? Hvilke kriterier skal være tilfredsstillende for å stille diagnosen regenerativ anemi? Non-regenerativ anemi? Slike spørsmål må være besvart før tolkningsarbeidet av pasientprøver kan starte.

Analysemuligheter

1. Prøvemateriale

Alle undersøkelser i et hemogram gjøres i blod tilsatt antikoagulans. Dannes det koagler i blodet blir det uegnet for undersøkelse av de fleste analysene som inngår i et hemogram.

EDTA er langt bedre egnet enn heparin som tilsetning til blod for hemogramundersøkelse.

Heparin bør derfor unngås. Analyseteknisk kreves det i dag et svært lite blodvolum for å kunne utføre en fullstendig hemogram undersøkelse. Allikevel er det viktig at blodvolumet som tas ut til hemogram undersøkelse ikke er for lite fordi:

- Det er viktig at blodprøven er representativ for blodet i pasienten. Dette kravet er lettere å innfri dersom prøvevolumet er av en viss størrelse (minst noen mL)
- Det er viktig at forholdet mellom blod og antikoagulans blir riktig. Derfor må blodglassene som inneholder antikoagulans fylles ca. $\frac{3}{4}$ fulle med blod. Fylles glassene med for mye blod oppstår fare for koagulering (for lite antikoagulans i forhold til blod). Fylles glassene med for lite blod blir forholdet mellom blod og antikoagulans for lite, noe som påvirker både cellene direkte og analyseresultatene indirekte. På noen blodglass er det et merke som angir optimal fyllingsgrad med blod slik at det blir et optimalt forhold mellom blod og antikoagulans.

Blodutstryk må lages av så ferskt blod som mulig for å unngå celleartefakter som skyldes antikoagulans eller lagring.

2. Valg av analyser

Det første laboratorieansvarlig må ta stilling til er hvilke analysemuligheter som skal etableres på klinikken.

Analyser som bør kunne utføres på klinikken:

- Blodutstryk
 - Som nevnt under pkt. 1 (Prøvemateriale) er gammelt blod lite egnet for å lage blodutstryk av god kvalitet. Dette må derfor gjøres i forbindelse med prøvetakingene på klinikken. Rutiner og utstyr for å produsere blodutstryk må derfor finnes på klinikken.
- Hematokrit
 - Måling av hematokritt er en enkel analyse som gir mye informasjon i forbindelse med anemier, væskebehandling med mer. Når hematokritt måles ved hjelp av en hematokritt sentrifuge fås informasjon som kan leses ut av ”buffy-coat”en (unormalt store mengder med leukocytter og/eller trombocytter) og plasma (hemolyse, lipemi, ikterus) samtidig. Selv om blodprøver sendes til eksternt laboratorium vil det allikevel være behov for å kunne utføre denne analysen på klinikken ved akutte sykdomstilfeller.
- Hemoglobin
 - Selv om total mengde hemoglobin i en blodprøve kan måles korrekt selv etter lagring/transport vil det være en fordel å kunne utføre denne analysen på klinikken. Sammen med muligheter for måling av hematokritt og tillaging av blodutstryk vil det med begrensede ressurser være mulig å ha et godt beslutningsgrunnlag i akutte situasjoner.

Hvorvidt det skal etableres muligheter på klinikken til å utføre celletellinger og evt. partielle eller fullstendige differensialtelling av leukocytter blir en avveining som må gjøres i hvert enkelt tilfelle og der mange forhold spiller inn.

- Celletellinger

- Manuelle celletellinger

Manuelle celletellinger kan foretas ved hjelp av tellekammer og mikroskop.

Denne metoden er arbeidskrevende og gir lite reproducerbare resultater.

- Automatiserte celletellinger

Tidligere var muligheter for automatiserte celletellinger forbeholdt større laboratorier. Utviklingen den senere tiden har gjort at også mindre laboratorier kan vurdere å anskaffe utstyr til dette formålet. Selv om det i den senere tiden også markedsføres utstyr spesielt beregnet for analyse av dyreblod viser det seg ofte at hematologisk analyse av selv de vanligste dyreartene er en for stor utfordring for slikt utstyr. Spesielt gjelder dette patologiske prøver.

Det er ikke tilstrekkelig dokumentasjon å analysere et begrenset antall normale prøver fra de ulike dyreartene for å kunne markedsføre utstyret til veterinærmedisinsk bruk. Det er ofte først ved analyse av ulike patologiske prøver svakhetene i metodikk og databehandling viser seg.

Impedans tellere

De første automatiske celletellere var impedans tellere. Prinsippet er at cellene etter å ha blitt fortynnet transporteres gjennom et kapillær slik at cellene passerer enkeltvis gjennom dette kapillæret. Hver gang det passer en partikkel

(celle) gjennom kapillæret registreres dette elektrisk og danner grunnlag for å beregne (partikkel) antall og (partikkel) størrelse. Ved å definere ulike grenseverdier kan utstyret kalibreres til å identifisere ulike celler. Dette må gjøres for hver art som ønskes undersøkt.

Laser tellere

Denne teknologien er basert på laser målinger og ”flow-cytometri” og foreløpig bare tilgjengelig i utstyr beregnet for større, spesialiserte laboratorier. I tillegg er det viktig at databehandlingen er tilpasset de dyreartene som blodprøvene tas fra. I tillegg til å gi en full (5-parts) differensialtelling av leukocytene og en rekke målte og beregnede parametere presenteres resultatene både aritmetisk og grafisk på en måte som komprimerer og visualiserer informasjon.

Tolkning av cytogrammer fra flow cytometri/lasermålinger (ADVIA 120)



Hver enkelt celle evaluseres og plasseres i de enkelte cytogrammene og histogrammene avhengig av hemoglobin innhold, cellevolum, peroxidase innhold og kjernekompleksitet. Fra hver blodprøve klassifiseres på denne måten ca. 30.000 celler.

ADVIA 120

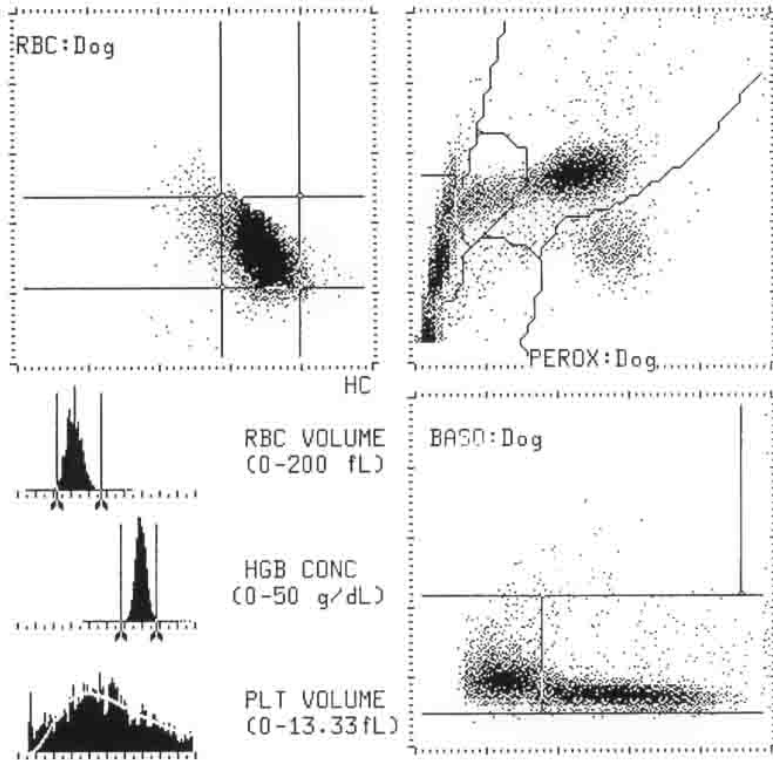
I tillegg til gjennomsnittsverdier presenteres også ulike spredningsmål (variasjonsbredden i cellepopulasjonen).

Utskriftene kan brukertilpasses og kan derfor kunne variere noe, men vil i stor grad ligne på utskriften som er vist i Figur 1. En forklaring på de vanligst forkortelsene er gitt i Tabell 1.

SEQ# 0000026 CAL:DSK V
 TIME 11:55 24/05/91
 SYS# Dog
 ID 0000000036326

CBC		
14.32	$\times 10^3/\mu\text{L}$	WBC
7.44	$\times 10^6/\mu\text{L}$	RBC
16.3	g/dL	HGB
48.1	%	HCT
64.6	fL	MCV
33.8	g/dL	MCHC
14.0	%	RDW
328	$\times 10^3/\mu\text{L}$	PLT

RBC FLAGS			0000
%	DIFF	$\times 10^3/\mu\text{L}$	
L 52.3	NEUT	7.49	
H 36.1	LYMP	5.17	
6.3	MONO	.90	
4.0	EOS	.57	
.4	BASO	.06	
.9	LUC	.13	
LI		2.20	
MPXI		-5.3	
WBC FLAGS		0000	



Figur 1. Eksempel på cytogram fra flow cytometri/lasermålinger i en blodprøve fra en hund

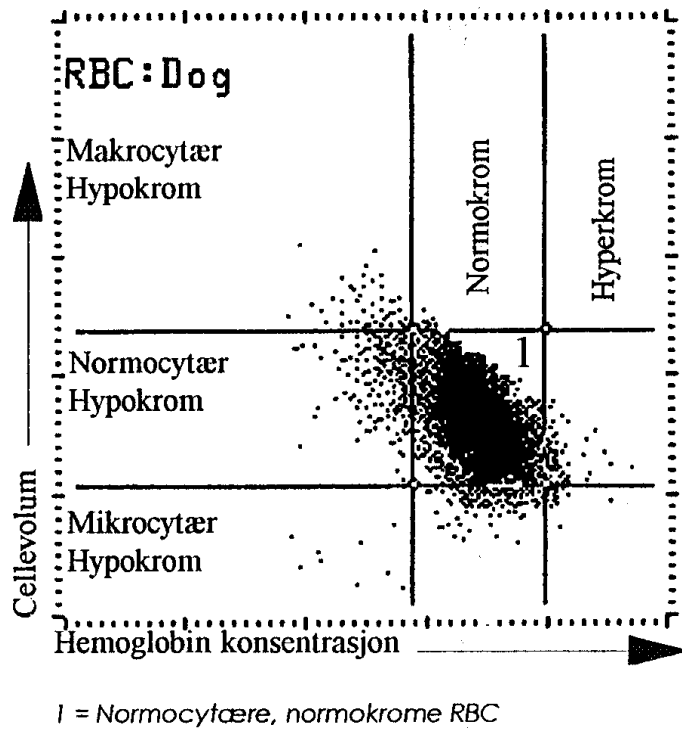
1. Forkortelser

Tabell 1. Vanlige forkortelser benyttet i hematologi rapporter

“WBC”:	”White Blood Cells” – antall
“RBC”:	”Red Blood Cells” – antall
“HGB”:	”Hemoglobin” – mengde i blod
“HCT”:	”Hematocrit”
“MCV”:	”Mean Corpuscular Volume” – erythrocytter
“MCHC”:	”Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration” – mengde pr. erythrocytt
“RDW”:	”RBC Distribution Width” – indeks for anisocytose
“PLT”:	”Platelets” – antall
“NEUT”:	”Neutrophils” – (i % og absolutt antall)
“LYMP”:	”Lymphocytes” – (i % og absolutt antall)
“MONO”:	”Monocytes” – (i % og absolutt antall)
“EOS”:	”Eosinophils” – (i % og absolutt antall)
“BASO”	”Basophils” – (i % og absolutt antall)
“LUC”	”Large Unstained Cells” – som regel blastceller /i % og absolutt antall)

(”FLAGS” er til bruk for laboratoriet og skal ikke tolkes)

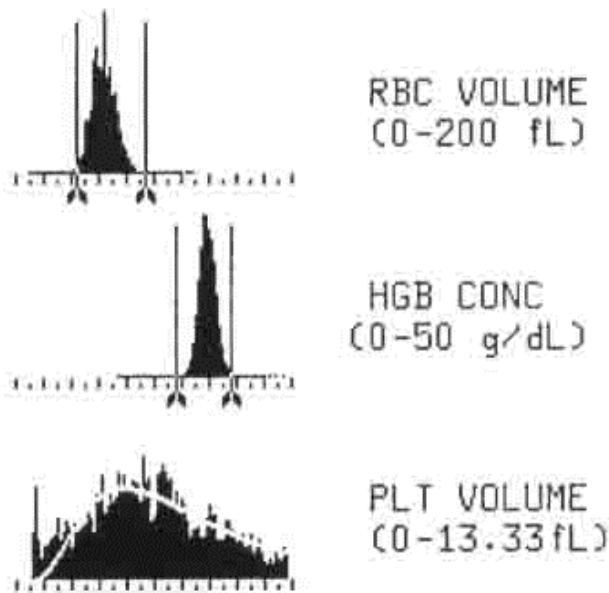
2. Grafisk tolkning av erythrocytter



Morfologisk klassifisering av erythrocytter basert på størrelse (cellevolum) og hemoglobinkonsentrasjon i hver enkelt celle.

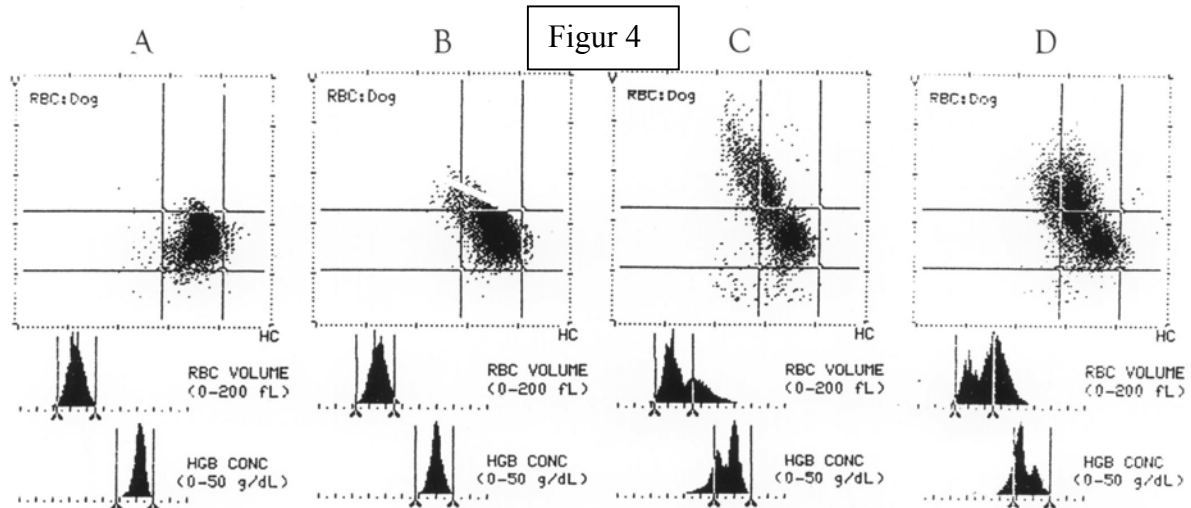
Terskelverdiene for mikro-/makrocyttose (horisontale linjer) og hypo-/hyperkromasi (vertikale linjer) justeres av programvaren avhengig av dyreart

Figur 2. Alle erythrocyttene plottes i cytogrammet etter størrelse og hemoglobinnhold.



Figur 3. Ut i fra RBC cytogrammet konstrueres et volumfordelings histogram (øverst) og et histogram over erythrocytt hemoglobinkonsentrasjon (midten). Nederst ses et volumfordelingshistogram for blodplater (nederst).

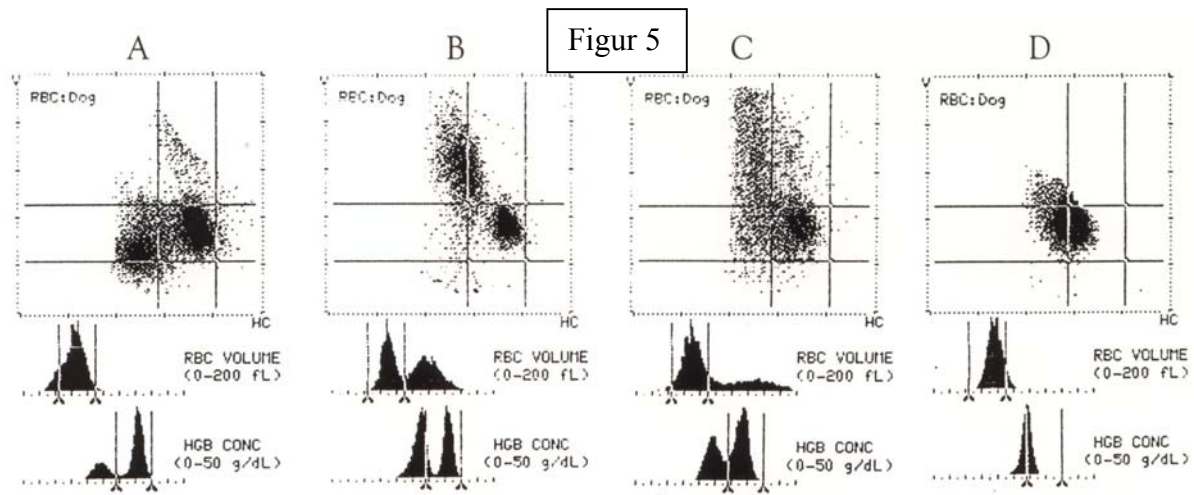
Figur 4 og 5. Eksempler på anemier som viser ulik grad av benmargsrespons.



A.
Non-regenerativ (normocytær, normokrom) anemi. NB! Antall erythrocytter kan ikke leses ut av dette diagrammet da det bare er ved sterke erythropenier at det vil bli synlig redusert celletetthet i dette diagrammet.

B. C. D.
Regenerative anemier med økende grad av respons (økende andel av makrocyttære, hypokrome erythrocytter)

NB! Husk benmargens normale responstid på 3-5 dager!



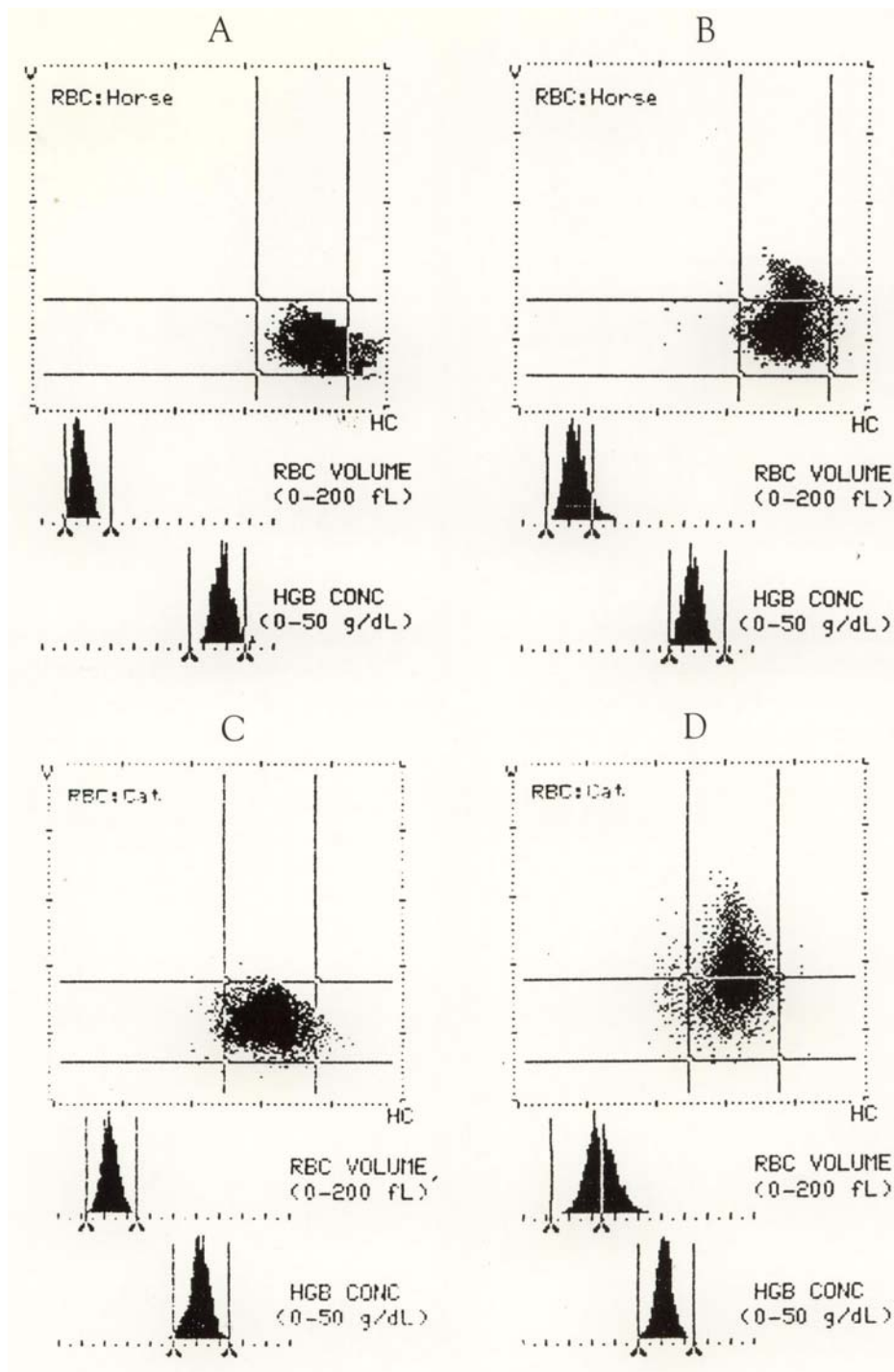
A. Jernmangel anemi (mikrocyttær, hypokrom anemi)

B. To distinkte erythrocytt-populasjoner etter en kraftig stimulering av erythropoiesen

C. Autoagglutinasjon av erythrocytter (immunmediert hemolytisk anemi)

D. Gammel blodprøve som medfører oppsvulming av cellene

Figur 6. Andre eksempler på cytogrammer



A. Normal HEST

B. Regenerativ anemi (HEST). Makrocyttære, normokrome erythrocytter.

NB! Hesten slipper ikke ut retikulocytter til sirkulasjonen ved en regenerativ anemi.

C. Normal KATT

D. KATT med FeLV infeksjon

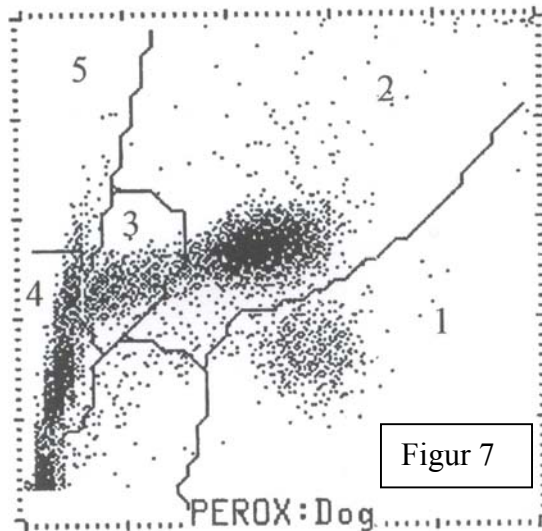
2. Grafisk tolkning av leukocytter

I ADVIA 120 analyseres leukocytterne etter to separate analyseprinsipper ("kanaler"), Perox-kanalen og Baso-kanalen med hver sine cytogrammer.

PEROX-kanalen (Figur 7)

I perox kanalen skjer en cytokjemisk farging etter cellenes innhold av myeloperoxidase. Dette enzymet befinner seg hovedsakelig i granula hos neutrofile og eosinofile granulocytter.

Monocytter har lavt peroxidase innhold. Lymfocytter mangler dette enzymet og forblir ufargede. Leukocyttenes myeloperoxidase innhold er artsspesifikk. Cellenes størrelse bestemmes ved lysspredningsmåling.



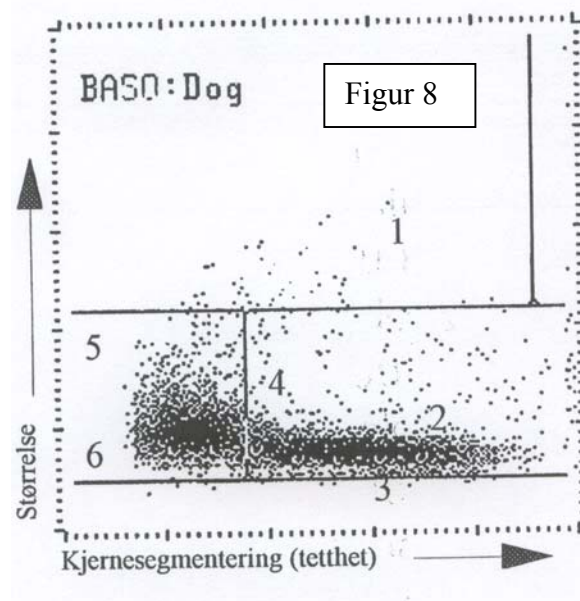
Cellene inndeles i 5 fraksjoner etter måling av peroxidaseinnhold og størrelse av hver enkelt celle.

1. Eosinofile granulocytter
2. Neutrofile granulocytter
3. Monocytter
4. Lymfocytter
5. LUC-celler (blaster, vanligvis lymfoblaster)

2. BASO-kanalen (Figur 8)

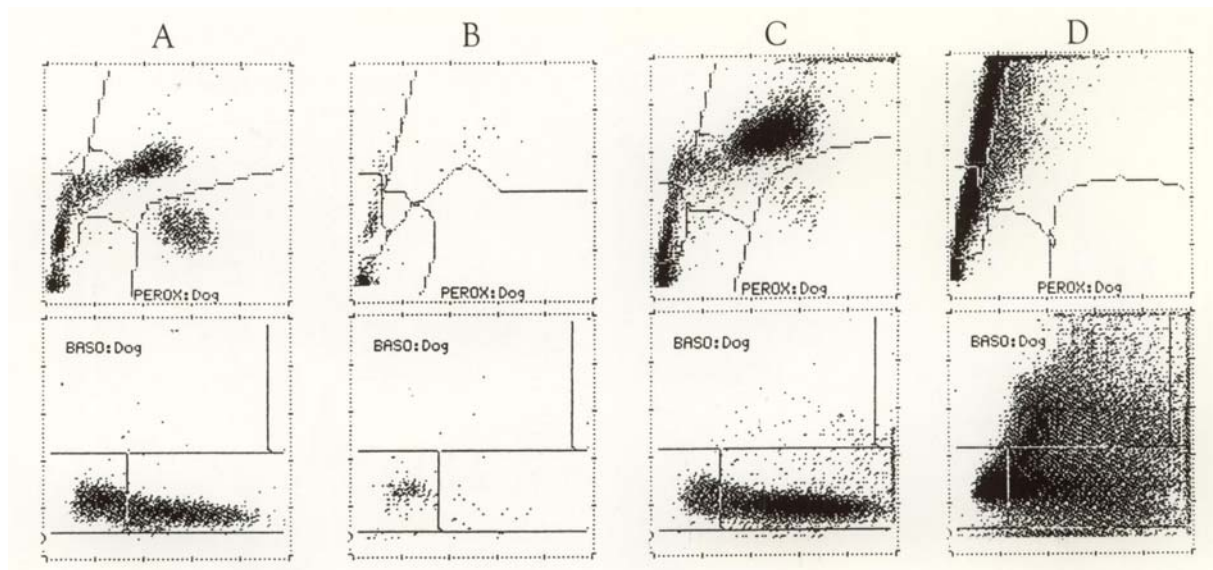
I dette reagenssystemet oppløses leukocyttenes cytoplasma med unntak for de basofile granulocytterne. Blandingen av cellekjerner og intakte basofile celler analyseres med optisk laserteknikk. Antallet basofile bestemmes.

Cellekjernene klassifiseres deretter som mononukleære eller polymorfnukleære. Forekomst av umodne celletyper (båndformede neutrofile granulocytter (4)) identifiseres også ved dette analyseprinsippet.



1. Basofile granulocytter
2. Segmenterte neutrofile granulocytter
3. Eosinofile granulocytter
4. Båndformede granulocytter
5. Lymfocytter og Monocytter
6. evt. Blastceller

Figur 9. Andre eksempler på leukocytogrammer



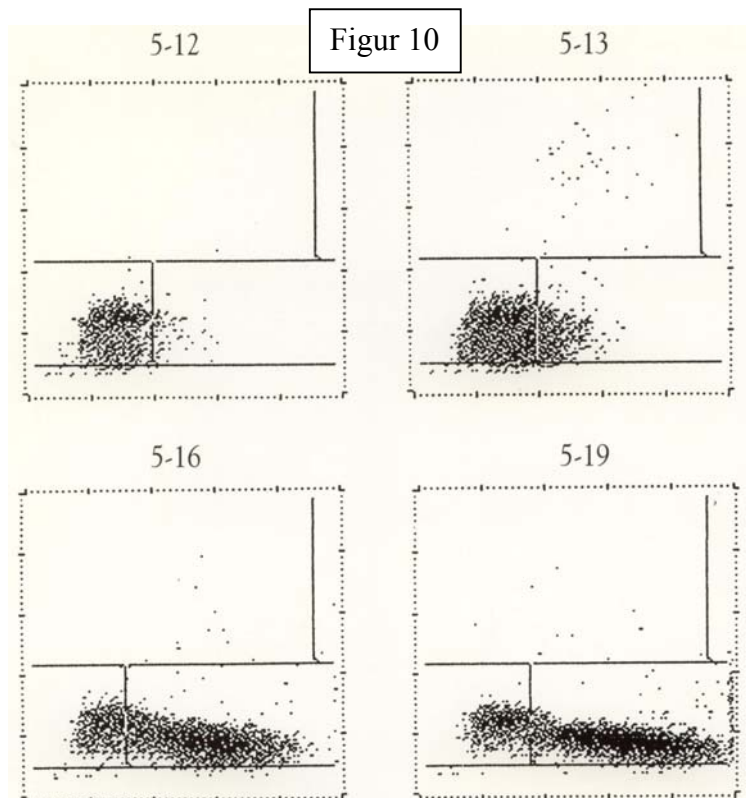
Øvre cytogram er fra peroxidase kanalen, nedre cytogram er fra basofil kanalen.

A. Normal hund

B. Uttalt leukopeni, for det meste lymfocytter. (Hundevalp med parvovirus enteritt)

C. Leukocytose (”tett” diagram) og venstreforskyvning. Stort innslag av kjerneholdige erythrocytter. (Immunmediert hemolytisk anemi)

D. Peroxidase cytogrammet har stor tetthet i området for ”LUC-celler”. Lymfoblaster er store celler uten peroxidase aktivitet. (Akutt lymfoblast leukemi)



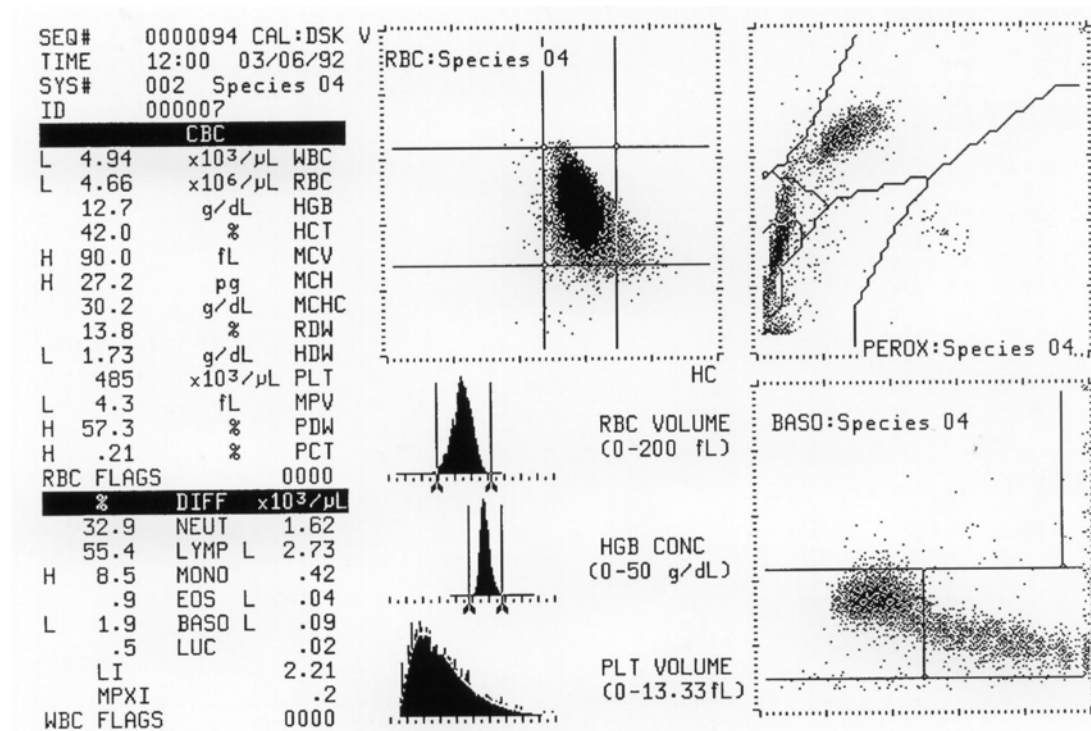
Disse cytogrammene (fra basofilkanalen) (Figur 10) illustrerer utviklingen over en uke hos et føll med *Salmonella typhimurium* enteritis.

5-12: Uttalt venstre forskyvning og neutropeni. Vurdering av blodutstryk resulterte i 13 % segmenterte neutrofile granulocytter og 19 % båndformede neutrofile granulocytter med toksiske forandringer.

5-13/5-16/5-19: Utvikling mot neutrofili uten venstre forskyvning og toksiske forandringer.

Eksempler på utskrifter fra noen andre dyrearter:

Figur 11. Marssvin



Figur 12. Asiatisk elefant

