

1

Ocena rozmazów krwi

Odpowiednie przygotowanie i wybarwienie rozmazów krwi ma kluczowe znaczenie dla trafnej interpretacji obrazu mikroskopowego.

PRZYGOTOWANIE ROZMAZÓW KRWI

Krew pobiera się do probówek z antykoagulantem – solą potasową kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA) o stężeniu $1,50 \pm 0,25$ mg/ml. Stosunek objętości krwi do EDTA ma decydujące znaczenie, gdyż nadmiar EDTA powoduje kurczenie i zmianę wyglądu komórek, szczególnie erytrocytów.

Jakość rozmazów krwi jest bezpośrednio związana z jakością materiałów wykorzystywanych do ich przygotowania. Szkiełka podstawowe muszą być wysokiej jakości. Wybiera się czyste i odtłuszczone szkiełka, z polem do opisu i, ze względów bezpieczeństwa, ze szlifowanymi krawędziami.

- Natychmiast po wykonaniu rozmazu preparat umieszcza się w komorze laminarnej i suszy w strumieniu chłodnego powietrza.
- Preparat utrwała się metanolem cz.d.a.
- Preparat wybarwia się metodą Wrighta lub inną metodą z użyciem barwnika Romanowskiego.
- Preparat zamyka się, stosując żywicę dobrej jakości. [W polskich laboratoriach preparat najpierw suszy się, wykorzystując ruch powietrza uzyskany dzięki szybkim zamachom ręki trzymającej preparat, a następnie pozostawia na co najmniej 2 godz. w temperaturze pokojowej. Barwi się najczęściej metodą panoptyczną Pappenheima, z wykorzystaniem barwnika Maya i Grünwalda (jest równocześnie utrwalaczem) oraz barwnika Giemsy (zmodyfikowany barwnik Romanowskiego). Preparatów często nie zamyka się – *przyp. tłum.*].

Rozmaz ocenia się zawsze w ten sam sposób.

- Pod **małym powiększeniem** (obiektyw $\times 10$) poszukuje się zlepow płytek krwi, ocenia się wstępnie liczbę i rozmieszczenie leukocytów.
- Sprawdza się, czy występuje zjawisko rulonizacji erytrocytów i czy jego nasilenie koreluje z wynikiem OB.
- Przy **dużym powiększeniu** (obiektyw $\times 40$) różnicuje się leukocyty.
- Szacuje się liczbę płytek krwi i porównuje obserwację z wynikiem liczenia płytek krwi metodą automatyczną.
- Ocenia się rozmiar, kształt i wybarwienie erytrocytów.
- Pod **immersją** (obiektyw $\times 100$) w cienkim miejscu rozmazu w erytrocytach poszukuje się pasożytów malarii.
- W wybranych przypadkach sprawdza się obecność wtętotów erytrocytarnych.

2 Przypadki w hematologii laboratoryjnej

- Liczy się retikulocyty, jeśli stosowana jest metoda manualna. [W polskich laboratoriach różnicowanie leukocytów, ocenę budowy i wybarwienia płytek krwi oraz erytrocytów przeprowadza się pod immersją (obiektyw $\times 100$) – *przyjp. tłum.*].

ZMIANY MORFOLOGII KRWINEK WYNIKAJĄCE Z BŁĘDÓW TECHNICZNYCH

Artefakty erytrocytów

- Stara krew: przechowywanie krwi pobranej na EDTA ponad 6 godz. prowadzi do postępującego marszczenia powierzchni erytrocytów (erytrocyty morwowate).
- Nieprawidłowy stosunek krwi i EDTA wynika najczęściej z trudności z pobraniem krwi. Nadmiar EDTA powoduje obkurczanie erytrocytów.
- Domieszka wody w metanolu powoduje powstanie pierścieni w erytrocytach, co może mylnie nasuwać wrażenie niedobarwliwości.
- Zbyt wolne suszenie preparatu powoduje adsorpcję zanieczyszczeń z otaczającego powietrza na powierzchni erytrocytów i nierównomierne jej zwiększenie, co sprawia, że przypominają one krwinki tarczowate.
- Wysoka temperatura zwiększa odsetek sferocytów i powoduje fragmentację erytrocytów, co prowadzi w konsekwencji do fałszywie wysokich wyników liczby płytek krwi.

Artefakty leukocytów

- Stara krew: przechowywanie krwi pobranej na EDTA ponad 24 godz. prowadzi do wakuolizacji cytoplazmy granulocytów obojętnochłonnych i monocytów. Dochodzi do degeneracji jąder granulocytów. Płaty jąder rozdzielają się i tworzą ciała charakterystyczne dla procesu apoptozy.
- Cienie komórkowe: w czasie wykonywania rozmazu leukocyty mogą ulec mechanicznemu uszkodzeniu, dotyczy to szczególnie limfocytów w chorobach limfoproliferacyjnych. Rozrywanie leukocytów można ograniczyć, dodając do krwi, przed wykonaniem rozmazu, albuminę (1 kropla 30% albuminy na 9 kropli krwi).

Artefakty płytek krwi

- Trudności z pobraniem krwi: nieprawidłowa technika pobrania krwi żyłnej może być przyczyną agregacji krwinek płytkowych i powstawania ich zlepow. Gdy liczba płytek jest obniżona z nieznanych powodów, należy zawsze zwrócić uwagę na rozmieszczenie płytek w preparacie, szczególnie w końcowej części rozmazu („brodzie”).
- Satelityzm płytkowy jest zwykle spowodowany obecnością immunoglobulin, które szczególnie w obecności EDTA powodują adhezję trombocytów do błony neutrocytów. Zjawisko satelityzmu płytkowego może być przyczyną fałszywie obniżonej liczby płytek krwi.

- Jakość barwienia: do obniżenia jakości barwienia mogą przyczyniać się: wytrącanie barwnika na powierzchni preparatu, niewłaściwy czas barwienia, nieprawidłowy stosunek objętości barwnika i buforu, zmiana pH buforu.

KRWINKI CZERWONE

Morfologię erytrocytów należy oceniać w tych miejscach rozmazu, gdzie erytrocyty leżą swobodnie i ledwie się stykają. Należy unikać oceny zarówno w cienkiej części końcowej rozmazu, jak i w grubej części początkowej, zwłaszcza gdy występuje rułonizacja krwinek.

Nazewnictwo

- Rozmiar (anizocytoza)
Miarą anizocytozy jest szerokość rozkładu objętości erytrocytów (RDW). Komórki większe od typowych określa się jako makrocyty, mniejsze jako mikrocyty.
- Kształt (poikilocytoza, różnokształtność)
Poikilocyty to erytrocyty o nieprawidłowym kształcie, powstające na skutek zaburzeń erytropoezy, zmian patologicznych lub chorób wrodzonych.
- Wybarwienie
Normochromazja (normochromia, prawidłowe wybarwienie), hipochromazja (hipochromia, niedobarwliwość), hiperchromazja (hiperchromia, nadbarwliwość), polichromazja (polichromatofilia, równoczesne barwienie barwnikami kwaśnymi i zasadowymi), anizochromia (różna barwliwość).

Szerokość rozkładu objętości erytrocytów

RDW jest wskaźnikiem określającym zmienność rozmiaru erytrocytów i przedstawia się go jako stopień zmienności wielkości krwinek czerwonych: anizocytoza mierna (+), umiarkowana (++) , znaczna (+++). Przy ocenie anizocytozy należy wstępnie wykluczyć obecność zwiększonej liczby retikulocytów, które są komórkami większymi od dojrzałych erytrocytów.

Anizocytoza jest istotnym parametrem wykorzystywanym w diagnostyce różnicowej niedokrwistości. [W metodach automatycznych RDW jest obliczany jako współczynnik zmienności objętości erytrocytów (RDW-CV) lub odchylenie standardowe objętości erytrocytów (RDW-SD) – *przyj. tłum.*].

- RDW-CV (przedział referencyjny <14,5%)/RDW-SD (przedział referencyjny <48 fl).
- RDW jest zwiększony w niedokrwistości z niedoboru żelaza, a zmniejszony u dzieci pomiędzy 6 miesiącem a 5 r.ż. (u których również może występować niedobór żelaza).
- RDW jest zmniejszony w talasemii *minor*, a zwiększony w talasemii *major* i *intermedia* oraz zespołach mielodysplastycznych.
- Anizocytozę średniego stopnia należy również stwierdzić, gdy występują mikrocyty lub makrocyty.

Kształt

Zmiany morfologii krwinek czerwonych obserwowane w odpowiednio wykonanym i wybarwionym rozmazie krwi mają kluczowe znaczenie dla rozpoznania określonych schorzeń. Inaczej mówiąc, niektóre zmiany patologiczne mogą przyczyniać się do występowania w obrazie krwi erytrocytów o określonym kształcie.

Pamiętając o tym, osoba oceniająca preparat powinna zawsze opisywać kształt krwinek czerwonych, posługując się standardowym nazewnictwem. Duże znaczenie ma umiejętność odróżniania zmian budowy erytrocytów wynikających z błędów technicznych (artefaktów) od rzeczywistych zmian kształtu. Kluczowe jest również sposób opisu liczby erytrocytów o zmienionym kształcie. Nie powinno się w wyniku umieszczać opisu krwinek, które pojawiają się w rozmazie sporadycznie, nawet jeśli podane zostanie określenie „pojedyncze w preparacie”. Dla lekarza dysmorfia mierna, umiarkowana i znaczna jest uważana za istotną klinicznie, natomiast inne określenia mogą wprowadzić go w błąd.

Należy unikać używania terminu „poikilocyt” do opisywania zmiany kształtu krwinek czerwonych. Tą nazwą można określić każdy erytrocyt, który nie jest dwuwklęsłym dyskiem. Do opisu zmiany kształtu erytrocytów należy wybrać określenie jednoznacznie opisujące obserwowane nieprawidłowości, co ułatwi porozumienie pomiędzy osobą oceniającą preparat i lekarzem.

Nazewnictwo

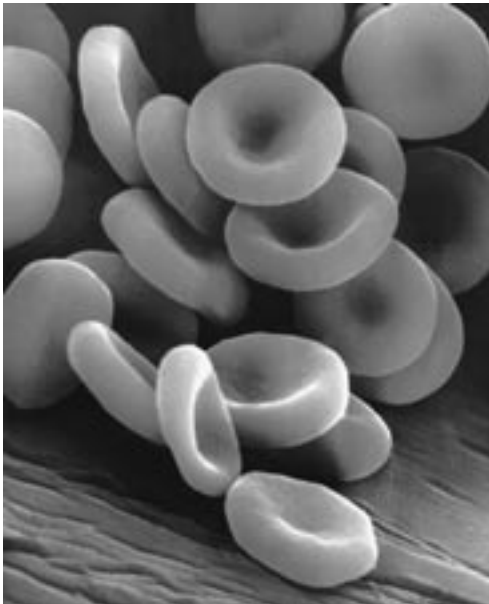
Erytrocyty prawidłowe (normocyty)

Prawidłowa krwinka czerwona jest okrągłą komórką z obustronnym centralnym wgłębieniem, o przeciętnej średnicy 7 μm . Rozmiarem jest zbliżona do jądra małych limfocytów.

Błona komórkowa jest bardzo elastyczna i plastyczna. Pod wpływem nacisku ulega odkształceniu, a po ustaniu działania siły zewnętrznej erytrocyt przybiera pierwotny kształt.



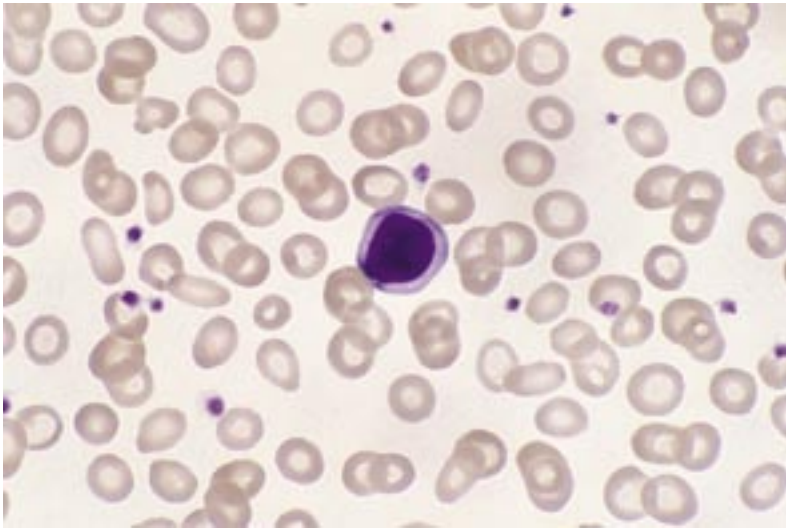
Prawidłowe erytrocyty



Prawidłowe erytrocyty

Mikrocyty (*micrós* = mały)

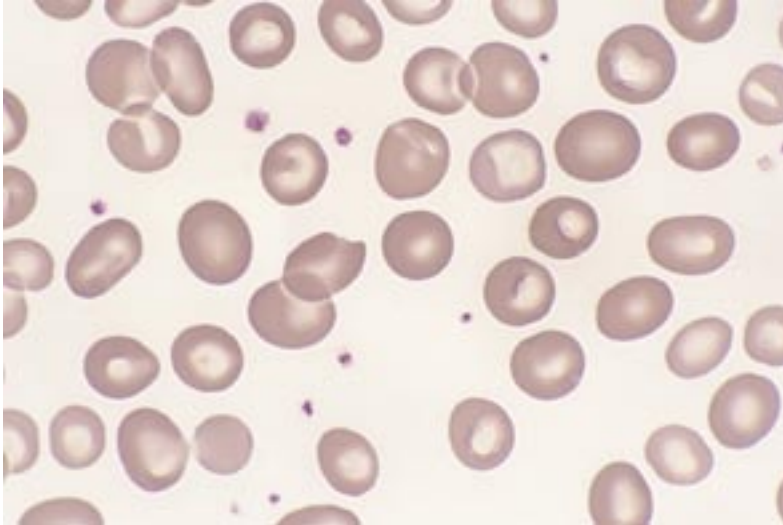
Mikrocyty to erytrocyty o średnicy mniejszej niż $6\ \mu\text{m}$ i zmniejszonej grubości. Stężenie hemoglobiny w mikrocytach jest zmniejszone, a hemoglobina gromadzi się głównie na obrzeżach komórki, co powoduje, że przejaśnienie w części centralnej jest wyraźniejsze. Przejaśnienie może być również większe, tak że komórka przypomina leptocyt lub cienki spłaszczony erytrocyt. Występowanie mikrocytów jest charakterystyczne dla niedokrwistości z niedoboru żelaza i/lub talasemii.



Mikrocyty

Makrocyty (*macrós* = duży)

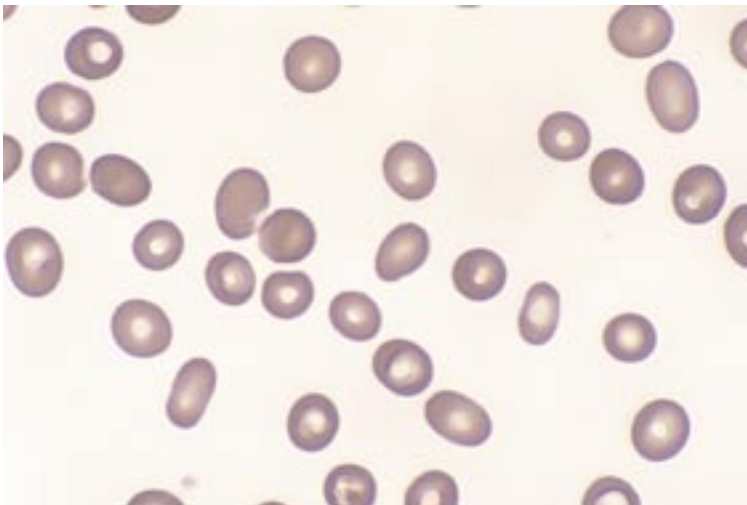
Makrocyty są erytrocytami o średnicy większej niż 8 μm . Mają prawidłowy dwukłesły kształt i dobrze widoczne centralne przejaśnienie. Ich obecność jest charakterystyczna dla przewlekłego nadużywania alkoholu. Występują też w chorobach wątroby.



Makrocyty

Makrocyty owalne

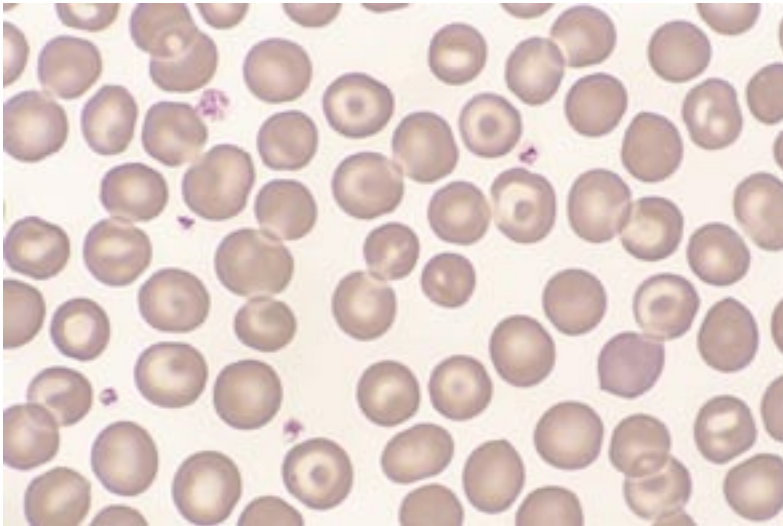
Makrocyty owalne są olbrzymimi krwinkami o średnicy większej niż 9 μm . Występują w niedokrwistości megaloblastycznej (*mégas* = olbrzymi).



Makrocyty owalne

Komórki tarczowate (kodocyty) (*kódon* = dzwon)

Komórki tarczowate są komórkami o kształcie dzwonu i cienkiej błonie. Stosunek powierzchni błony do objętości komórki jest zwiększony. Znaczne powiększenie powierzchni błony komórkowej to wynik nadmiernego gromadzenia lecytyny i cholesterolu na skutek wolnej wymiany z lipidami osocza. Określenie „tarczowate” (*target*) opisuje charakterystyczny wygląd komórek, który jest skutkiem suszenia krwi na szkle. Hemoglobina gromadzi się w centralnej części komórki oraz na jej obwodzie, a obszary te oddziela pierścieniowate przejaśnienie. Krwinki tarczowate występują we krwi pacjentów z chorobami wątroby, w talasemiach, hiposplenizmie i niektórych hemoglobinopatiach.



Komórki tarczowate



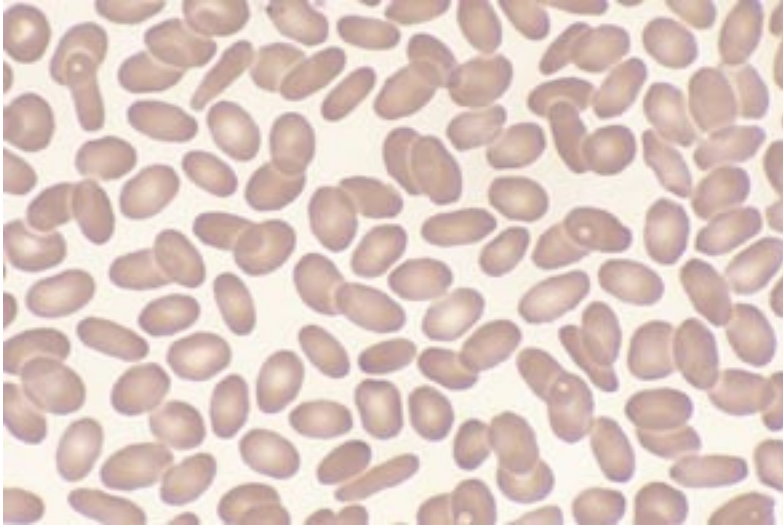
Komórka tarczowata

Eliptocyty (*elleiptikós* = eliptyczny)

Eliptocyty to owalne dwuwklęsłe komórki, które mogą mieć bardzo różny kształt od lekko owalnego po cylindryczny. Jest to wynikiem ilościowych i jakościowych zmian spektryny i białka 4.1, dwóch głównych białek szkieletu błony komórkowej.

W warunkach prawidłowych odsetek eliptycytów może sięgać blisko 5% erytrocytów, ale w eliptycytozie wrodzonej wynosi od 30 do 100% krwinek czerwonych.

Eliptocyty występują także w niedokrwistości z niedoboru żelaza, ale bez nieprawidłowości spektryny lub białka 4.1.



Eliptocyty



Eliptocyt