

Kroppsvæsker, morfologi og plott

HEMATOLOGIMASKINER er spesialiserte for å analysere i blod. Hvor godt egner de seg til å analysere celler i andre kroppsvæsker? Her presenteres eksempler fra tre ulike kroppsvæsker og utfordringene som bioingeniører møter i tolkningen av data.

Av **GRETHE HELLEM**, fagansvarlig bioingeniør, Seksjon for hematologi og immunologi, Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin, St. Olavs Hospital, Trondheim

Celletelling og klassifisering av celletyper i ulike kroppsvæsker har blitt utført i en årrekke ved de fleste hematologiske laboratorier. For enkelte kroppsvæsker, som leddvæske og spinalvæske, er referanseverdier veldefinerte og resultatene brukes også til å stille diagnose. Selv for disse væskene ser vi at interfererende celletyper dukker opp fra tid til annen, noe som kan gi usikre resultater i automatiserte hematologimaskiner. Ved vår seksjon mottar vi prøver fra de fleste pasientkategorier. Laboratoriet har døgnåpent og mottar ulike kroppsvæsker hele døgnet. I tillegg til seksjonsleder er vi tre fagansvarlige bioingeniører som har utvidet kompetanse til å vurdere kroppsvæsker. Gjennom en årrekke har vi samlet en mengde data for en rekke kroppsvæsker.

Utstyr og metoder

De fleste kroppsvæskene analyseres på analysemaskin Advia 120, men i noen tilfeller benyttes i tillegg

Tabell 1. Antall kroppsvæsker analysert og fordelingen av disse. BAL= bronkial-skyllvæske

År	1995	2001	2006	2008
Spinal	1095	926	994	1179
Ledd	127	182	104	130
BAL		71	130	139
Pleura, Ascites, (Uspesifisert)	113	83	160	144

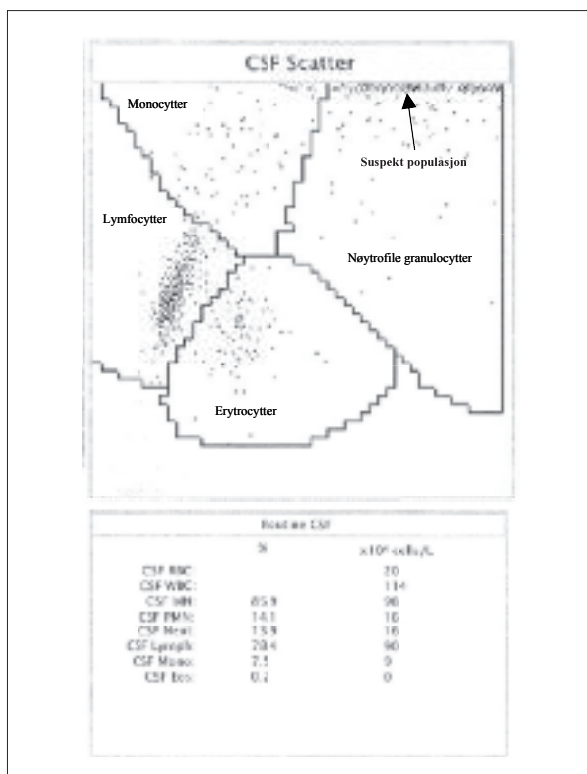
Sysmex XE-2100 og Celldyn 4000. Ingen av maskinene i vår park har program for å analysere andre kroppsvæsker enn blod, med unntak av Advia 120 som har spesifikk spinalvæskekanal. I tillegg til de automatiserte tellingene lager vi av og til utstryk, eventuelt cytopinpreparat av kroppsvæsken. Disse preparatene farger vi med May-Grünwald-Giemsa fargemetode i en Sysmex SP-1000 utstryk- og fargemaskin. Ved behov blir disse preparatene vurdert i mikroskop av bioingeniører med relevant kompetanse. Rekvirenten ber i hovedsak om totalantall leukocytter, ofte med differensialtelling, men av og til også erytrocytter og hemoglobin. I 2008 mottok og rapporterte vi leukocytresultat i 1592 kroppsvæsker med hovedtyngde fra spinalvæske (tabell 1).

Hensikt, mål og utfordringer

Hensikten med å analysere ulike kroppsvæsker er å avdekke sykdom (stille diagnose) eller følge behandlingseffekt. Målet for ansvarlige bioingeniører er å rapportere mest mulig korrekt celletall. Hvilke celler er det vi teller, og hvilken nytte har våre rekvirenter av svaret? Utfordringen er at vi til stadighet finner en del interfererende celler når vi analyserer i de automatiserte celletellerne (tabell 2). I en del tilfeller finner vi suspekterte celler hvor vi får mistanke om malignitet. Som ansvarlige bioingeniører kan vi ikke bare anta at dette er kjent for rekvirenten. Per dags dato har vi ikke felles datasystem med Avdeling for patologi og har dermed ikke innsyn i om tilsvarende prøvemateriale er sendt dit for analyse. Vi har heller ikke innsyn i pasientjournal. Vi ser stor nytte i at de forskjellige fagmiljøene har faglig kontakt, for pasientens beste.

Tabell 2. Oversikt over ulike kroppsvæsker med tilhørende celletyper som kan interferere med leukocytter ved automatiserte celletellinger.

Spinalv.	Maligne celler, Choroid plexus, bakterier
Ledd.	Synovialceller, Chondrocytter, LE-celler
Pleurav.	Mesothel, makrofager, maligne celler
Acites/peritoneal	Mesothel, makrofager, maligne celler
Pericard	Mesothel, makrofager, maligne celler
BAL	Mastceller, makrofager, epitelceller
Amnion	Epitelceller

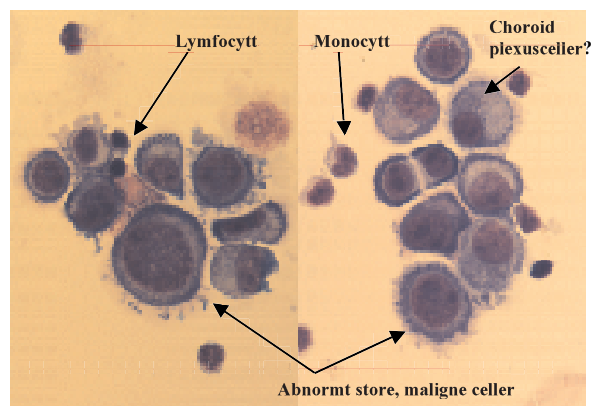


Figur 1. Spinalvæske analysert på Advia 120, CSF-kanal. CSF-scatter viser en suspekt populasjon celler høyt opp i regionen for nøytrofile granulocytter. Totalantall leukocytter og prosentfordeling av populasjonene blir feil.

Kasus 1. Spinalvæske

Kvinne 77 år. Ingen opplysninger om pasienten da vi mottok prøven. Leukocytter i spinalvæske er rekvirert og prøven analyseres rutinemessig på Advia 120, CSF-kanal (CSF = Cerebro Spinal Fluid).

Vi finner en populasjon celler høyt oppe i plottet (suspekt populasjon) (figur 1) som indikerer at andre celler enn de forventede lymfo-, mono- og granulocytene er til stede. Cytospinpreparat blir laget og her sees unormalt store celler i tillegg til lymfocytter og monocytter (figur 2). Vi la fram vårt funn for ekspertise ved Avdeling for patologi som bekreftet at dette var maligne celler. Pasienten hadde for flere år siden fått diagnosen cancer mamma og i senere tid fått diagnosen malignt melanom. Typisk for de maligne cellene er at de er abnormt store, har tofarget cytoplasma, at de har lite cytoplasma og stor kjerne. I enkelte kjerner sees makronukleoler, noe som er typisk ved malignt melanom. Runde celler tyder på vekst. En celle er i deling og det har oppstått et "vindu" mellom de to nye cellene. Vi kjenner igjen mange av de samme karakteristika som for umodne celler i blodbanen - blaster. Vi ser også store celler hvor kjernene er mindre og desentrerte. Dette kan være celler som kler ventriklene i hjernen, choroid plexusceller. Morfologisk vil det være umulig å bestemme hvor disse ukjente

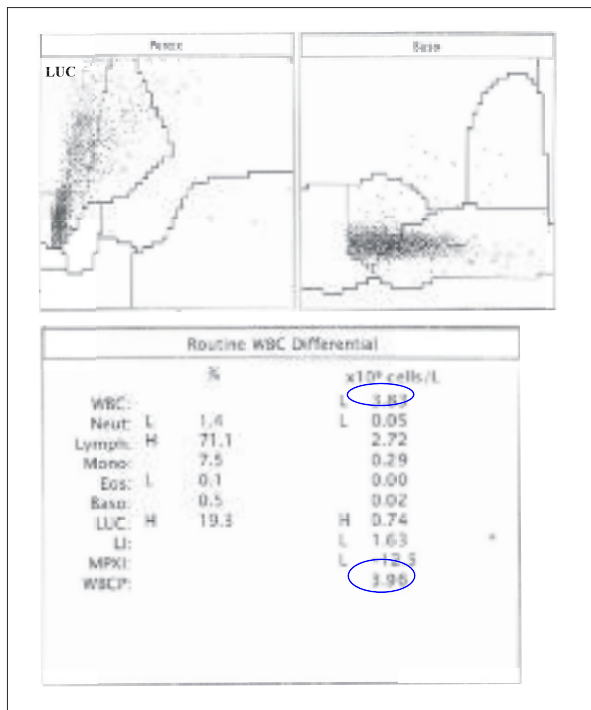


Figur 2. Cytospinpreparat fra spinalvæske fra kvinne 77 år. Bilde viser blant annet lymfocytter, monocytter, maligne celler og celler som likner på choroid plexusceller.

cellene har sin opprinnelse i et May-Grünwald-Giemsa-farget preparat. Ved bruk av immunologiske fargemetoder, som benyttes ved Avdeling for patologi, og eventuelt flowcytometri, vil det være mulig å klassifisere dem. I dette eksempelet vil CSF-WBC være falskt for høyt da en del av de store maligne cellene er talt med (figur 1). Det mest korrekte leukocytresultatet vil vi få ved manuell telling i tellekammer, hvor de store cellene kan ekskluderes.

Kasus 2. Leddvæske

Kvinne 46 år. Leddvæske fra kneledd. Ingen opplysninger om pasienten da vi mottok prøven. Prøven blir rutinemessig tilsatt enzymet hyalase for å spalte hyaluronsyren som gjør leddvæsken seig. Prøven blir analysert på hematologimaskinene Advia 120, Sysmex XE-2100 og Celldyn 4000. Leukocytresultat varierer mellom de ulike instrumentene fra $3,7 - 4,3 \times 10^9/L$ med en stor overvekt av mononukleære celler, tilnærmet 100 prosent (figur 3-5, side 18-19). Vi lager et utstryk av prøvematerialet som i mikroskopet viser en god del synovialceller og makrofager (figur 6, side 19). Synovialceller danner synovialhinnen som kler hulrommet i leddet. Forekomst av synovialceller i leddvæske er ikke unormalt, men skal ikke inngå i leukocytallet. Synovialceller og makrofager er celler med liknende kjernestørrelse og tetthet som leukocytter. Dette gjør at disse celletypene detekteres i leukocyttkanalene. Prinsippet for basalkanalene i Advia og Sysmex, er at cellene strippest for cytoplasma, og cellekjernene forblir intakte. Antallet kjerner telles og tettheten/indre struktur for hver enkelt celle blir detektert. Der hvor hele cellen detekteres og hvor det sorteres på størrelse, kan vi gjøre oss opp en mening om hvor vi vil finne dem igjen. Av og til har vi problemer med å finne igjen celler fra mikroskopet i plottene. Cellene kan være for store/små til at de blir fanget opp i den forhåndsinnstilte kanalen. En del av disse cellene kan også være så skjøre at de med den



Figur 3. Leddvæske analysert på Advia 120. Scattergram fra perox- og basokanal (øverst). Leukocyttresultat fra begge kanaler med diff fordeling fra peroxkanal (nederst).

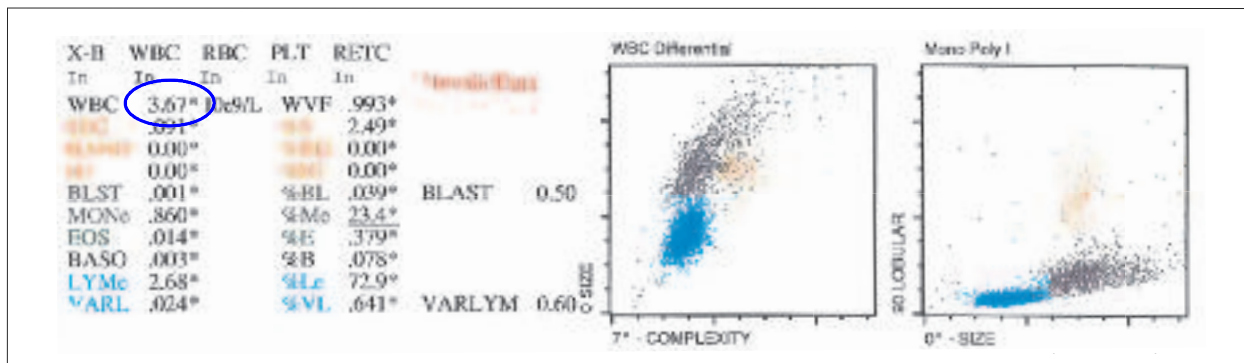
behandlingen de får, med kjemikalier og temperatur, vil fragmentere. Hvis de store cellene er intakte, og ikke inneholder enzymet myeloperoksidase, vil vi finne dem igjen høyt oppe i LUC-regionen i Advias peroxydasekanal (LUC = Large Unstained Cells). Hvis enzymet myeloperoksidase er tilstede, farges det. Er det mange celler, eller de inneholder myeloperoksidase, vil de ligge som et bånd i øverste billedkant fra toppen av LUC-regionen mot høyre. Vår oppgave som bioingeniører vil være å vurdere hvilket celletall vi skal rapportere. I dette eksempelet har vi fått talt med en del synovialceller, som er betydelig større enn leukocytene, i tillegg til makrofagene (figur 6). En normal leddvæske skal ha et leukocyttall mindre enn 0,20 x 10⁹/L. Leddvæsken i eksempelet er patologisk både med og uten medtalte synovialceller og makrofager. Leukocytter i området 0,2- 5,0 x 10⁹/L indikerer en

ikke-inflamatorisk lidelse. Materiale fra denne leddvæsken ble også levert mikrobiologisk laboratorium for analyse. Rapportert resultat på mikroskopi, grampreparat: "Ingen sikre mikrober".

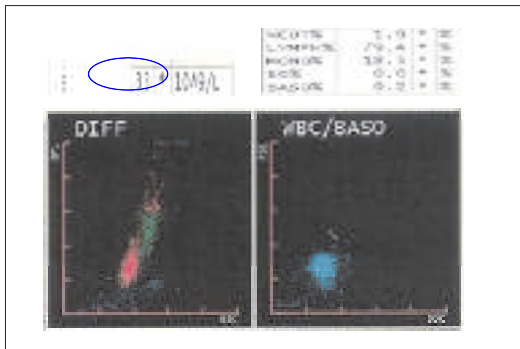
Kasus 3. Pleuravæske

Kvinne 48 år. Fra prøvehistorikken kunne vi se at kvinnen hadde vært innlagt både på gynekologisk avdeling, lungeavdelingen og kreftavdeling da prøven ble mottatt. Prøven analyserte vi først på Advia 120. De to leukocyttkanalene viste svært sprikende resultater og et scattergram med tegn på interferens av annet enn leukocytter (figur 7). Prøven ble deretter analysert på Sysmex XE-2100 som ga et tredje leukocyttresultat og et ikke overbevisende scatterplott (figur 8). Vi laget et preparat for mikroskopering. Vi så sammenklumping av celler (celleaggregater) og svært lite frie leukocytter (figur 9). Ved sammenlikning av maskinelle tellinger og mikroskopbildet så vi at alle våre maskinelle metoder for telling av leukocytter hadde feilet. Vi syntes ikke at cellene vi så i mikroskopet liknet på leukocytter. Kunne dette være mesothelceller? Reaktive mesothelceller? Eller maligne celler? Mesothelceller danner mesothelium som er et encellet lag som kler pleurarommet. Reaktive mesothelceller kan være vanskelig å skille morfologisk fra maligne celler. Vi forela vårt funn for ekspertise ved Avdeling for patologi, og fikk bekreftet at dette dreide seg om maligne celler. Det var blant annet blitt benyttet immuncytokjemiske metoder og det var påvist Adenokarsinom.

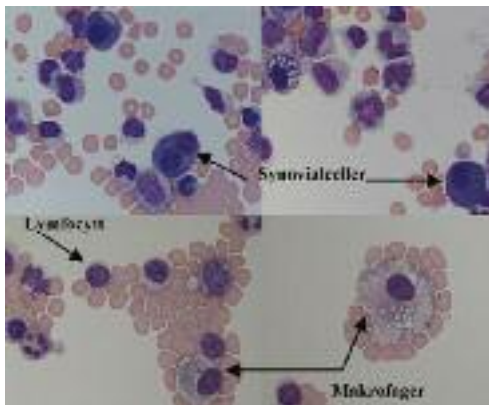
I Advias peroxydasekanal finner vi igjen mindre celleaggregater som et bånd øverst i scattergramet (figur 7). I Advias basokanal, hovedsakelig i blast-regionen, men også glidende over i noise- og mononukleærregionen, finner vi igjen rester av ødelagte celler sammen med umodne og "løse" kjerner (figur 7). Sysmex rapporterte enda høyere leukocyttresultat enn resultatene fra Advia 120. Kjemikaliene og temperaturene som blir benyttet i de forskjellige leukocyttkanalene påvirker og løser opp bindinger i cellesammenklumpinger i ulik grad. Forholdene i Sysmex så ut til å løse opp cellesammenklumpningene mer enn i



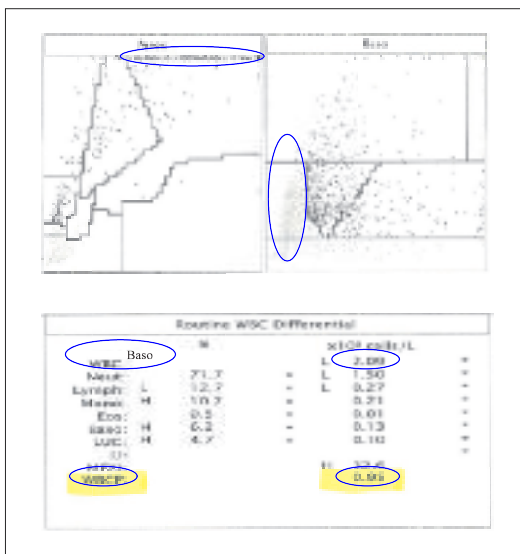
Figur 4. Leddvæske analysert på Celldyn 4000. Til venstre vises leukocytt- og diffresultat. Til høyre vises scattergram.



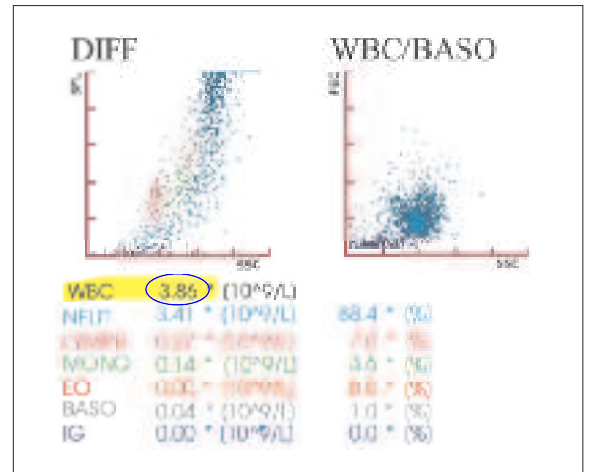
Figur 5. Leddvæske analysert på Sysmex XE-2100. Scattergram for diff- og basokanal samt WBC-baso og diff-fordeling.



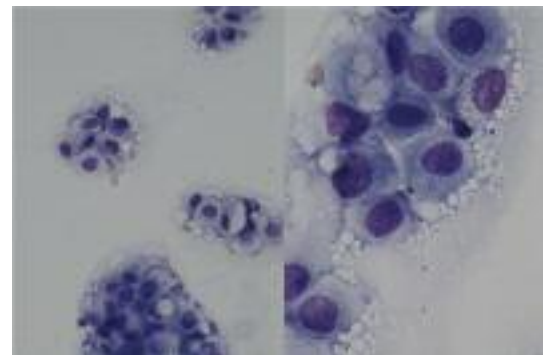
Figur 6. Leddvæske fra kvinne 46 år, høyre kne. Bilde viser store makrofager og synovialceller. I tillegg ser vi monocytter, lymfocytter og en nøytrofil granulocyt. I øverste høyre del av bildet sees en celle med pyknotisk kjerne og kraftige vakuoler, lipofag?



Figur 7. Pleuravæske analysert på Advia 120. Øverst til venstre viser peroxplott med en populasjon store celler øverst i nøytrofilregionen. Basoplot øverst til høyre viser en stor og ubestemmelig populasjon som ligger hovedsakelig i blastregionen, men glir over i MN-regionen og i Noiseregionen. Nederst resultat av leukocyttnmålinger med diff. Legg merke til den dårlige overensstemmelsen mellom WBC-Baso og WBC-Perox.



Figur 8. Pleuravæske analysert på Sysmex XE-2100.



Figur 9. Pleuravæske fra kvinne 48 år. Bilde viser celler i runde, tredimensjonale "baller" (cellesammenklumpninger) i ulike mikroskopforstørrelser.

Advia 120, og flere frie celler ble talt med. Det nærmeste vi kom et leukocytresultat i dette eksempelet: WBC < 0,95 x 10⁹/L.

Konklusjon

Som vi ser ut fra de få eksemplene i artikkelen, møter vi stadig på utfordringer ved automatiserte tellinger av leukocytter i ulike kroppsvæsker. Hematologimaskinene er spesialtilpasset kroppsvæskens blod. Det er derfor svært viktig at vi lærer oss å tolke plottene, at vi kan prinsippene for analysene og dermed kan trekke mest mulig riktig informasjon ut av analysene vi utfører. Det er også viktig å skjønne når en må gå videre med manuelle metoder og lære seg å gjenkjenne typiske celler i ulike kroppsvæsker morfologisk. Vi oppnår ikke alltid helt korrekt resultat med våre metoder. Det er viktig å formidle det til rekvirenten. Vi må meddele det vi ser, og ikke gi ut et bastant resultat med flere desimaler.

Nå har vi forventninger om at de nye "body fluid"-kanalene, som flere leverandører har kommet eller kommer med, blir til god nytte for å gi ut korrekte leukocytresultater i framtida. ■