

Nesten like plott, men svært ulik diagnose

TO KASUSER viser at det er viktig å forstå analyseinstrumentenes prinsipper, fordeler og begrensninger. De viser også at det er til stor hjelp å ha instrumenter med ulike analysemetoder i laboratoriet.

Av **TONY NYGÅRD WEDØ**, fagansvarlig bioingeniør, Seksjon for hematologi og immunologi, Avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin, St. Olavs hospital, Trondheim

Ved Seksjon for hematologi og immunologi, AIT ved St. Olavs hospital, analyseres ca 40 000 differensialtelling pr. år. 14 000 prøver er fra pasienter som er inneliggende i sykehuset, 9 000 prøver er fra pasienter ved sykehusets poliklinikk og 17 000 prøver er tilsendte fra primærhelsetjenesten. Av disse prøvene leveres ca fem stk hver dag til blodutstryk og manuell vurdering i mikroskop, før resultat av prøvene kan gies ut. Det lave antallet blodutstryk skyldes at vi har ulike typer hematologiinstrumenter og derved differensialtelles leukocytene automatisk etter forskjellige prinsipper. Har vi problemer med svarutgivelse på det ene instrumentet kan vi reanalysere prøven på det andre.

Utstyr og metoder

Hovedanalyseinstrumentene på laboratoriet er to Sysmex XE2100 satt sammen i en HST (Hematologi

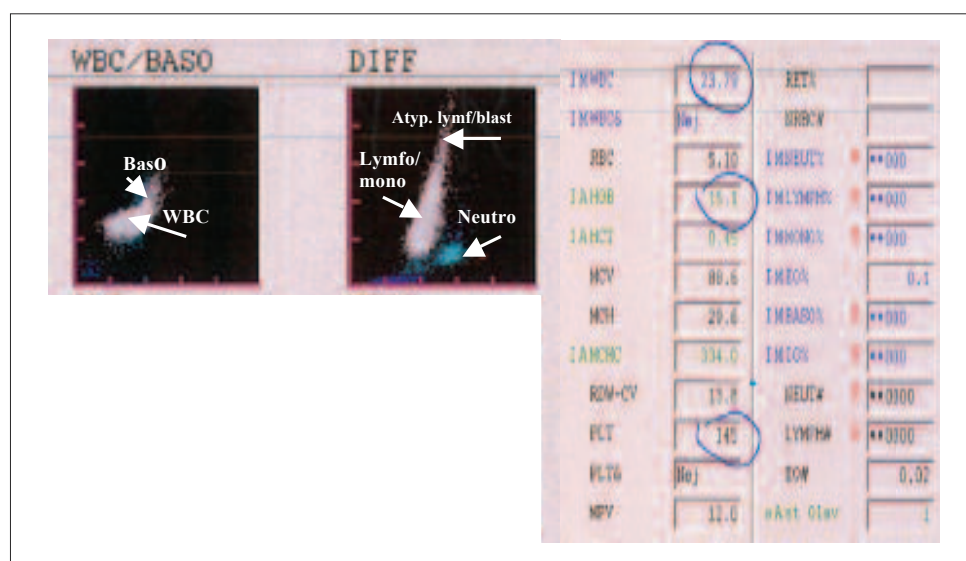
system total). Analyseinstrumentene er koblet sammen via et transportbånd der prøvene føres automatisk inn til analysemaskinene i kombinasjon med en Sysmex SP1000i som både lager og farger blodutstryk. I tillegg har vi to Advia 120 fra Siemens. Om det skal lages blodutstryk av en prøve bestemmes av regler som vi har lagt inn i vårt autovalideringssystem (Sysmex Information System - SIS) på XE2100. De samme reglene kan også anbefale reanalysering på Advia 120.

I tillegg til standard mikroskop har vi en CellaVision DM 96 som er et automatisert mikroskop med kamera som tar bilder av cellene og formidler disse via en pc-skjerm. DM96 gir oss et klassifiseringsforslag om hvilke celler som finnes i blodutstryket. Et bibliotek med referanseceller fra de ulike celletypene som celler i prøven kan sammenlignes med, er innebygd i programvaren. I DM96 kan vi også enkelt sammenligne cellene vi finner med andre celler i samme cellerekke. Vi har også mulighet til å forstørre cellene slik at vi får et godt overblikk over cytoplasma og cellekerner på pc-skjermen.

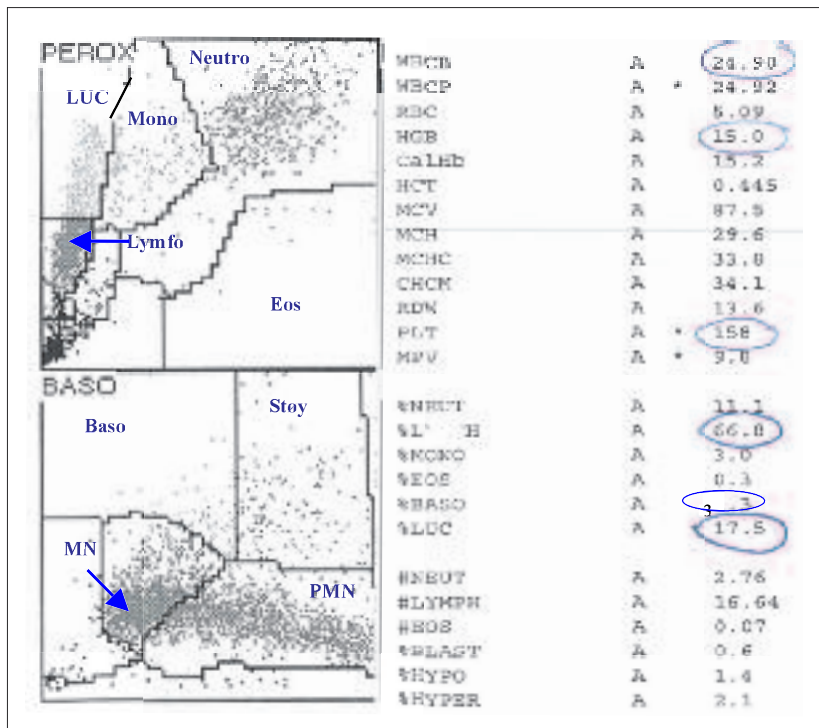
Vi er per i dag tre fagansvarlige bioingeniører, i tillegg til seksjonslederen, som har utvidet kompetanse når det gjelder tolking av plot og morfologi. DM 96 er et svært godt verktøy i dette arbeidet. Cellene vises på pc-skjermen, alle ser den samme cellen og vi kan diskutere det vi ser.

Mål og utfordringer

Når vi mottar prøver til analyse er målet vårt at de skal



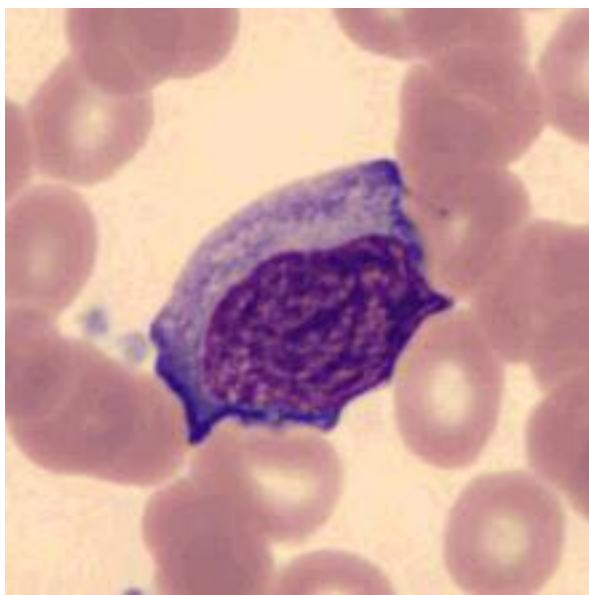
Figur 1. Plot fra Sysmex XE2100.



Figur 2. Plot fra Advia 120.

besvares med korrekte resultater. Det medfører av og til reanalysering i instrument med annen teknologi, eventuelt manuell differensialtelling. I de tilfellene hvor manuell differensialtelling utføres, gir vi rekvisenten en kommentar om eventuelle anormale funn i prøven.

Plot som er vanskelige å tolke, eller som gir meldinger om anormalitet, skal verifiseres i blodutstryk. Instrumentene kan feilklassifisere celler og gi uriktige plot. Like plot kan også være forårsaket av ulike diagnoser.



Figur 3. Aktivert mononukleær celle fra pasient med mononukleose.

Jeg skal ved hjelp av to kasus analysert på XE2100, ADVIA120 og mikroskopisk på DM96, belyse noen av utfordringene vi møter hver dag på enhet for hematologi.

Kasus 1

Kliniske data

Pasienten er en 23 år gammel mann som oppsøker lege på grunn av magesmerter og slapphet. Undersøkelsen hos legen viser hovne lymfeknuter, lett forstørret milt og lever. Det blir tatt blodprøve av mannen til analyse av bla. CBC (complete blood count) og differensialtelling.

Laboratoriedata

Prøven analyseres rutinemessig på XE2100 (figur 1, se side 11).

Vi finner noe forhøyet

leukocytall og trombocytene ligger i nedre normalområde.

I diffplotet ser vi at det ikke er noe skille mellom lymfocytter og monocytter. Meldinger fra SIS indikerer både blaster og atypiske lymfocytter. Disse reglene utløser en bestilling om blodutstryk og prøven styres direkte inn til SP1000i som lager og farger blodutstryket. SIS-reglene sier også at vi skal reanalysere prøven på Advia 120.

Advia 120 gir også lett forhøyede leukocytter og litt lave trombocytter (figur 2). I plotet ser vi at Advia 120 har klart å skille mellom lymfocytter og monocytter. Vi ser også en lymfocytose (>43 % som er øvre normalområde for voksen), en forhøyet LUC (large unstained cells) (>4,4 % som er øvre normalområde for voksen) og basofili (>2 % som er øvre normalområde uansett alder). Det flagges også her for atypiske lymfocytter og blaster. På grunn av pasientens alder, klinikk og funn i plot på Advia 120, har vi grunn til å tro at dette er en virusinfeksjon. Antagelsene må imidlertid verifiseres i et blodutstryk før svarutgivelse.

Morfologi

Vi finner et stort antall mononukleære celler som er store med utflytende cytoplasma. Cytoplasma er blåfarget med brettkant og cellekjernene har et modent preg. Det vil si at kromatinet er kondensert/klumpet. Det er disse cellene som har utløst flaggene både i XE2100 og i Advia 120. Det er viktig å merke seg at i enkelte tilfeller kan de aktiverte cellene ha et noe umodent preg med løsere kromatin og nukleoler, men ikke for denne pasienten. Vi finner ingen blaster. Vi finner heller ikke basofile som Advia 120 varslet om.

Falsk basofili sees ofte på prøver med høy LUC og lymfocytose. Det er de store virusaktiverede mononukleære cellene som har så sterke cellemembraner at de ikke lar seg lysere. På grunn av størrelsen havner disse i regionen for basofile (figur 3 og 4).

Mononukleose

De morfologiske funnene og klinikken er karakteristisk for mononukleose som forårsakes av Epstein-Barr virus. Ved svarutgivelse gir vi i tillegg til differensialtelling en kommentar til rekvirenten om morfologiske funn. Kommentaren lyder "Lymfocytose med en del store aktiverte mononukleære celler. Blodbildet kan være forenelig med mononukleose eller annen virusinfeksjon".

Få dager senere blir de morfologiske funnene verifisert ved at mikrobiologiske blodprøver fra pasienten er positiv på Epstein-Barr virus.

Kasus 2

Kliniske data

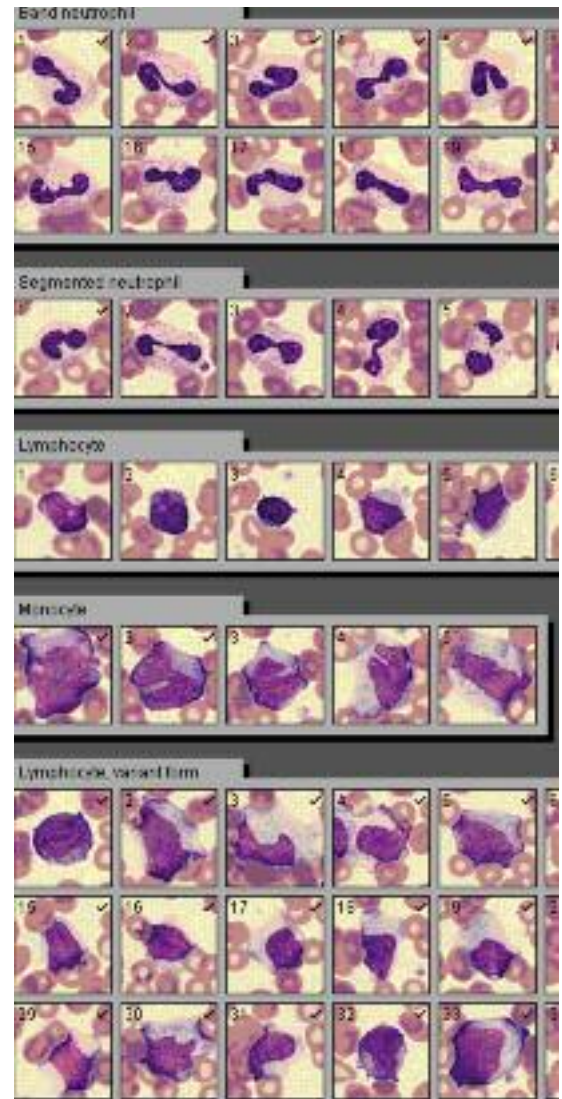
Pasienten er ei to år gammel jente som er slapp og klager over diffuse smerter.

Laboratoriedata

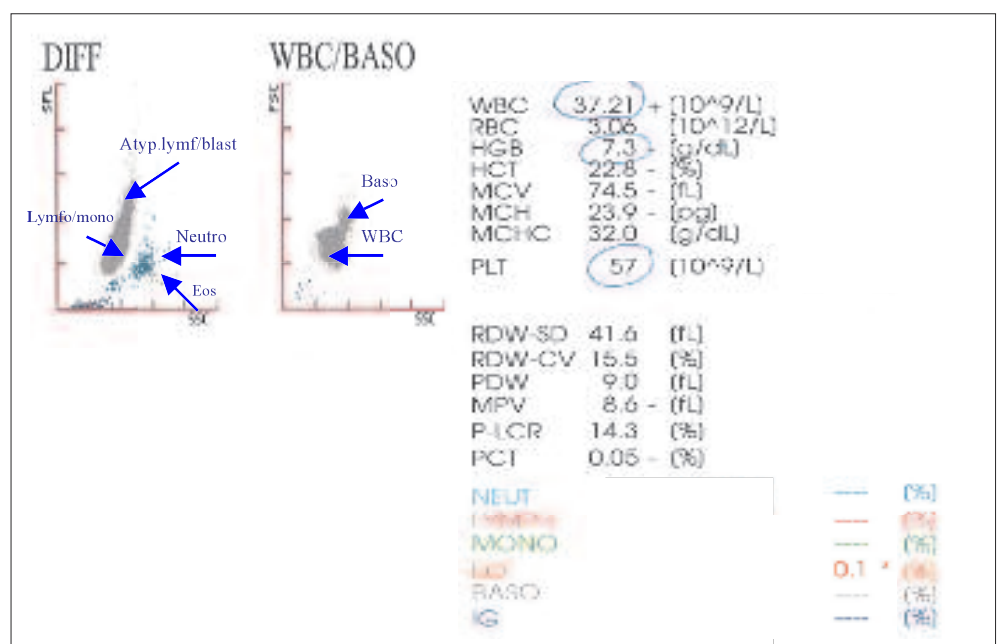
Prøven analyseres rutinemessig på XE2100 (figur 5).

Vi finner økt antall leukocytter, lav hemoglobin og lave trombocytter.

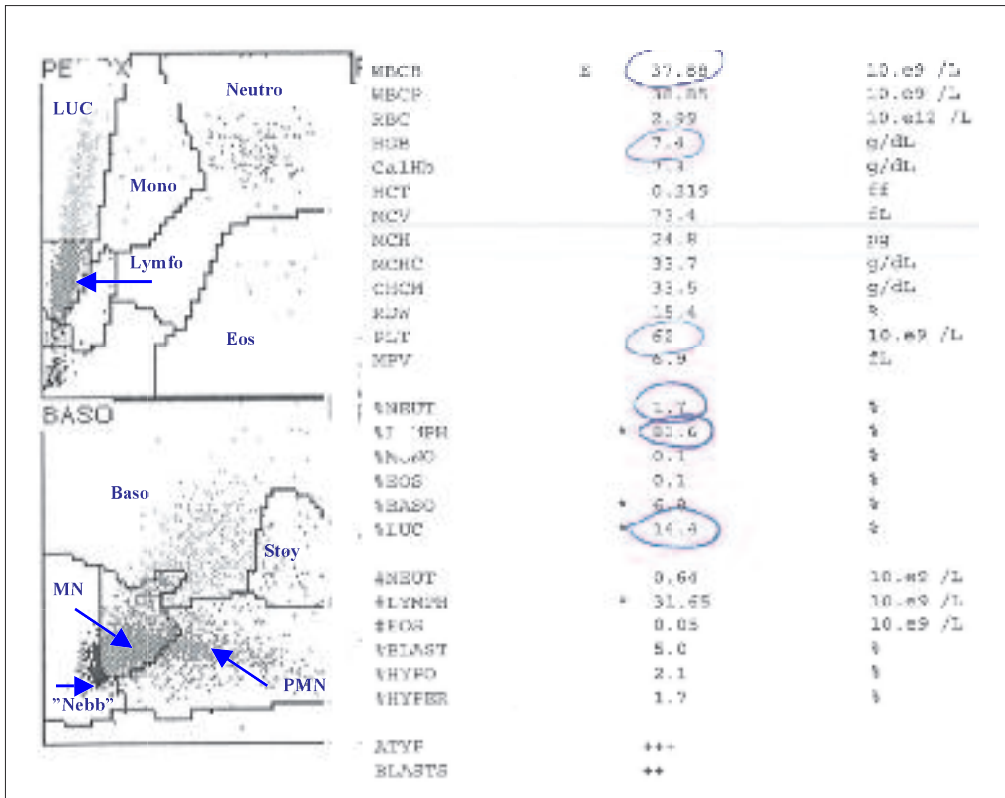
I diffplotet ser vi at det ikke er noe skille mellom lymfocytter og monocytter. Også i dette tilfellet indikerer regler i SIS både blaster og atypiske lymfocytter. Blodutstryk blir automatisk laget i SP1000i. I tillegg til morfologien sjekket vi det lave trombocytaltallet. Vi har en regel om at trombocytter under $100 \times 10^9/L$ første gang alltid skal sjekkes for



Figur 4. Virusaktiverede mononukleære celler.



Figur 5. Plot fra Sysmex XE2100.



Figur 6. Plot fra Advia 120.

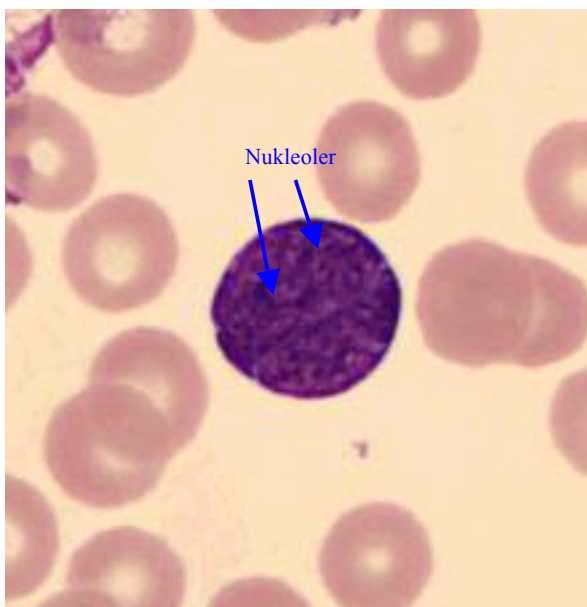
trombocyttaggregering.

Prøven analyseres på Advia 120 etter veiledning fra SIS. Advia 120 gir også lett forhøyede leukocytter, lav hemoglobin og lave trombocytter (figur 6). I plotet ser vi at Advia 120 har klart å skille mellom lymfocytter og monocytter og også i dette kaset har vi lymfocytose og forhøyet LUC. Pasienten har i tillegg neutropeni. Vi merket oss også den "tomme"

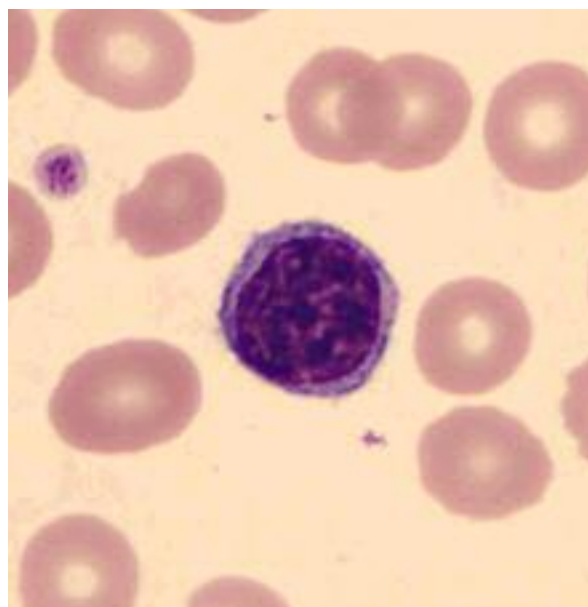
monocytregionen, som ofte er et karakteristisk funn ved akutte leukemier.

Det var også her en unormal cellepopulasjon i baso-plotet. Populasjonen ligger som en sky opp i baso-regionen. Den mononukleære cellepopulasjonen har i tillegg et "nebb". Dette er et karakteristisk funn ved små blaster. Advia 120 estimerer antallet blaster.

Plot og blodverdier indikerer anormalitet som må verifiseres i blodutstryk.



Figur 7A. Blast med løst kromatin og nukleoler.



Figur 7B. Normal lymfocytt med kondensert kromatin.

Morfologi

Vi finner to populasjoner mononukleære celler. En med normale lymfocytter. De er små og cellekjernen har et modent preg med klumpet kromatin. Den andre populasjonen har store mononukleære celler. Cellekjernen utgjør mer enn 2/3 av cellens størrelse. Cellekjernen har et noe løsere kromatin og ved å forstørre opp bildet i DM96 ser vi enkelte nukleoler. Det morfologiske bildet er monotont (lite innslag av andre cellyper). Vi finner ca 50 % blaster i perifert blod (figur 7 og 8).

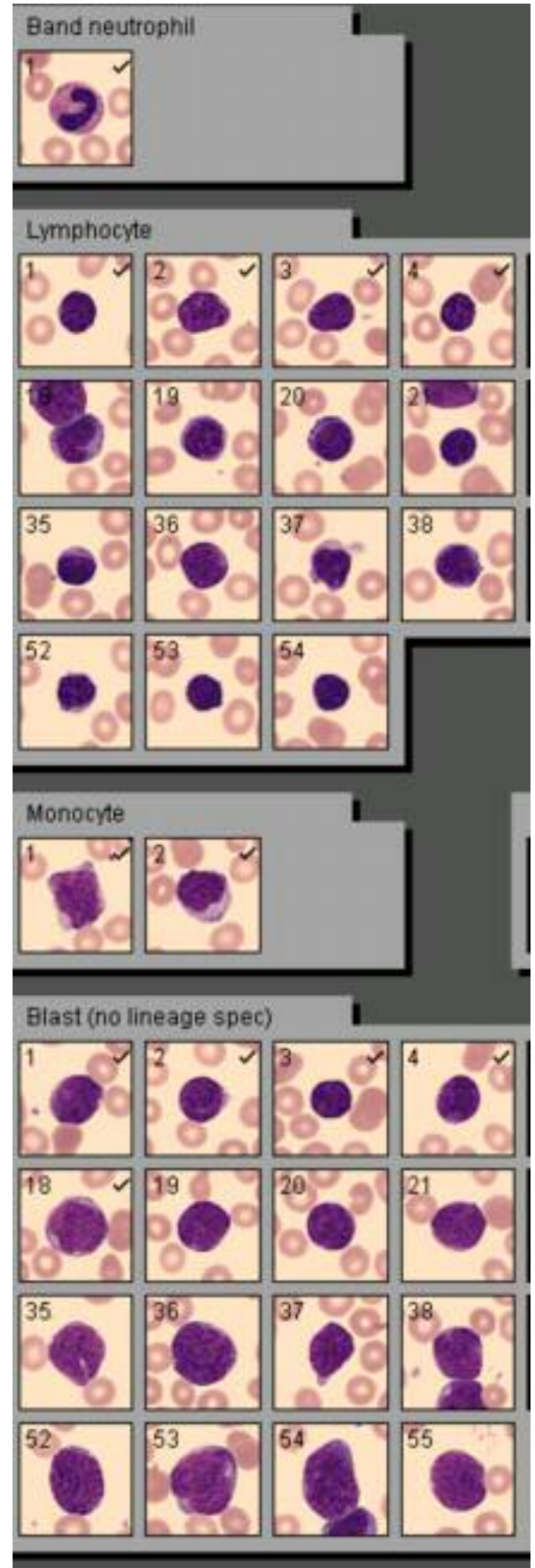
Akutt leukemi

Pasienten har akutt leukemi, mest sannsynlig i den lymfoide cellerekken. I tillegg til å gi ut prosentfordelt differensialtelling, kommenterte vi resultatet med "Utalt lymfocytose med cirka 50 % blaster/blastlignende celler" og "Neutropeni". Vi kommenterte også at trombocytene er kontrollert i blodutstryk og at ingen trombocyttaggregering er funnet.

Morfologien ble verifisert med immunfenotyping dagen etter. Pasienten har leukemi type Pre B-ALL (tidlig akutt b-celle leukemi) med ca 60 % blaster i perifert blod.

Konklusjon

Ved hjelp av disse to kasesene har jeg forsøkt å belyse hvor viktig det er å ha gode kunnskaper om morfologi og manuell mikroskopering, og at plot fra analysemaskiner også skal vurderes. Når man sammenligner de to kasesene ser man at plotene er svært like, men diagnosene er svært forskjellige. I disse to tilfellene var det viktig å vite at analyseinstrumenter i noen tilfeller kun gir *forslag* om hvilke cellyper som finnes, og at disse cellene av og til er feilklassifisert. Det er viktig å forstå analyseinstrumentenes prinsipper og derved deres fordeler og begrensninger. Kasesene viser at det er til stor hjelp å ha instrumenter med ulike analysemetoder i laboratoriet. ■



Figur 8. Modne lymfocytter versus blaster.