

Bendrojo hematologinio tyrimo leukocitų rodiklių pokyčių interpretacija: leukocitozė ir leukocitopenija

Benas Matuzevičius¹, Gabrielė Jonauskaitė¹, Rėda Matuzevičienė^{2,3}

¹Vilniaus universiteto Medicinos fakultetas

Faculty of Medicine, Vilnius University

²Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Biomedicinos mokslų instituto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedra

Department of Physiology, Biochemistry, Microbiology and Laboratory Medicine, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Vilnius University

³Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centras

Vilnius University Hospital Santaros Klinikos, Centre of Laboratory Medicine

El. paštas: benas.matuzevicius@mf.stud.vu.lt

Santrauka

Įvadas. Praėjus daugiau nei 100 metų nuo pirmųjų bandymų automatizuoti kraujo ląstelių skaičiavimą, bendrasis hematologinis tyrimas su automatizuota leukograma (BHT) išlieka vienu dažniausiai užsakomų tyrimų visame pasaulyje. Nemaža dalis ligų yra susijusios su BHT rezultatuose matomais leukocitų ir leukogramos pokyčiais. Tinkamai įvertinęs pokyčius gydytojas gali gauti daug informacijos apie tolesnį paciento ištyrimą, gydymo taktiką ar ligos prognozę. Autorių nuomone, Lietuvoje bendrosios praktikos gydytojams, medicinos studentams bei kitų medicinos sričių specialistams trūksta orientacinės bei edukacinės informacijos

apie BHT ir kitų hematologinių tyrimų vietą ligos diagnostikos kelyje, todėl reikia apžvelgti ne tik tyrimų rezultatus, bet ir kokiais metodais jie pasiekiami.

Tyrimo tikslas. Atlikti literatūros analizę pateikiant pagrindinių leukocitų tyrimo metodų principus, aptariant jų rezultatų klinikinį panaudojimą ir bendro leukocitų kiekio pokyčių diferencinę diagnostiką.

Tyrimo metodai. Literatūros apžvalga atlikta naudojantis laisvos paieškos metodu ir keliomis duomenų bazėmis: *PubMed*, *ScienceDirect* ir *ResearchGate*, įvedus reikšminius žodžius: leukocitai, leukocitozė, bendrasis hematologinis tyrimas, hematologiniai analizatoriai, hematologinio analizatoriaus veikimo principas, leukocitozės algoritmas. Atrinktos 57 studijos, aktualios tyrimo tikslo sąlygoms tenkinti neapsiribojant laiku ar išankstiniu atrankos protokolu.

Išvados. Nepaisant didėjančio naujų diagnostinių metodų arsenalo, BHT išlieka vienu kliniškai reikšmingiausių tyrimų, duodančių greitą, pigų ir informatyvų atsakymą apie paciento kraują. Tinkama BHT rezultatų interpretacija atkreipiant dėmesį į leukogramos pokyčius, peržiūra pagal peržiūros kriterijus ir paciento siuntimas konsultuoti specialistams pagal turimus duomenis sudaro pagrindinius leukocitų pokyčių diferencinės diagnostikos principus.

Reikšminiai žodžiai: kraujo tyrimai, leukocitozė, leukocitopenija, algoritmas, tėkmės citometrija, hematologinis analizatorius.

SANTRUMPOS

– absoliuti vertė, % – procentinė vertė, 3-D TLS – 3-D tūrio, laidumo ir sklaidos technologija (angl. 3-D Volume, Conductivity and Scatter – 3-D VCS), AS-LYMP – antikūnus sintetinantys limfocitai (angl. Antibody-synthesizing Lymphocytes), BAS – bazofilai (angl. Basophils), BHT – bendrasis hematologinis tyrimas (angl. Complete / Full Blood Count – CBC / FBC, Full Blood Exam – FBE), CD – diferenciacijos antigenas (angl. Cluster of Differentiation), CKT – citomorfologinis kraujo tyrimas (s. mikroskopinis kraujo tepinėlio tyrimas; angl. Peripheral Blood Smear / Peripheral Blood Film), DC – nuolatinė elektros srovė (angl. Direct Current), DIFF – leukograma (angl. Leukocyte Differential), DNR – deoksiribonukleorūgštis, EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis, EOS – eozinofilai (angl. Eosinophils), FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija, FTC – fluorescencinė tėkmės citometrija (angl. Fluorescence Flow Cytometry – FFC), GRAN – granulocitai (angl. Granulocytes), HA – hematologinis analizatorius (angl. Hematologic Analyzer), HCT – hematokritas (angl. Hematocrit), HGB – hemoglobino koncentracija (angl. Hemoglobin), HPC – hemopoezės pirmtakai (angl. Hematopoietic Progenitor Cells), ICSH – Tarptautinė hematologijos standartizacijos taryba (angl. International Council for Standardization in Haematology), IG – nebrandūs granulocitai (angl. Immature Granulocytes), LIC – didelės nebrandžios ląstelės (angl. Large Immature Cells), LYM – limfocitai (angl. Lymphocytes), LUC – didelės nenusidažiusios ląstelės (angl. Large Unstained Cells), MCH – vidutinis hemoglobino

kiekis eritrocite (angl. *Mean Corpuscular Hemoglobin*), MCHC – vidutinė eritrocitų hemoglobino koncentracija (angl. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*), MCV – vidutinis eritrocitų tūris (angl. *Mean Corpuscular Volume*), MDW – monocitų pasiskirstymo plotis (angl. *Monocyte Distribution Width*), MON – monocitai (angl. *Monocytes*), MPV – vidutinis trombocitų tūris (angl. *Mean Platelet Volume*), NEU – neutrofilai (angl. *Neutrophils*), NEUT-GI – neutrofilų grūdėtumo intensyvumas pagal šviesos sklaidą (angl. *Neutrophil Granularity Intensity*), NEUT-RI – neutrofilų reaktyvumo intensyvumas pagal nukleorūgščių fluorescenciją (angl. *Neutrophil Reactivity Intensity*), NLR – neutrofilų ir limfocitų santykis (angl. *Neutrophil to Lymphocyte Ratio*), NRBC – branduolėti eritrocitai (angl. *Nucleated Red Blood Cells*), PDW – trombocitų pasiskirstymo plotis (angl. *Platelet Distribution Width*), PK – peržiūros kriterijai (angl. *Review Criteria*), PLT – trombocitai (angl. *Platelets*), PSO – Pasaulio sveikatos organizacija (angl. *World Health Organization* – WHO), PŠS – priekinė šviesos sklaida (angl. *Forward Scatter* – FSC), PTP – pseudotrombocitopenija, RBC – eritrocitai (angl. *Red Blood Cells*), RBHT – refleksinis bendrasis hematologinis tyrimas (angl. *Reflex CBC*), RDW – eritrocitų pasiskirstymo plotis (angl. *Red Cell Distribution Width*), RDW-CV – eritrocitų pasiskirstymo plotis – variacijos koeficientas (angl. *Red Cell Distribution Width – Coefficient of Variation*), RDW-SD – eritrocitų pasiskirstymo plotis – standartinis nuokrypis (angl. *Red Cell Distribution Width – Standard Deviation*), RE-LYMP – reakciniai limfocitai (angl. *Reactive Lymphocytes*), RF – radijo dažnio bangos (angl. *Radiofrequency*), RNR – ribonukleorūgštis, ŠFS – šoninė fluorescencinė šviesa (angl. *Side-fluorescence Light* – SFL), ŠSS – šoninė šviesos sklaida (angl. *Side Scatter* – SSC), UBHT – užsakomasis bendrasis hematologinis tyrimas (angl. *CBC ordered*), WBC – leukocitai (angl. *White Blood Cells*).

1. ĮVADAS

Svarbią praktikuojančio gydytojo diagnostinio arsenalo dalį sudaro laboratoriniai tyrimai – manoma, kad net 70 % klinikinių sprendimų pagrindžiami laboratorinių tyrimų duomenimis [1]. Vieni dažniausiai užsakomų yra laboratoriniai kraujo tyrimai, o iš jų bene dažniausiai – bendrasis hematologinis tyrimas su automatizuota leukograma (BHT), anksčiau vadintas bendruoju kraujo tyrimu (BKT) [2]. Šis tyrimas pateikia kiekybinę informaciją apie kraujo ląsteles, ėminio surinkimo metu cirkuliuojančias paciento kraujyje. BHT yra automatizuotas tyrimas, analizuojantis kraujo ląstelių – eritrocitų (RBC), trombocitų (PLT) ir leukocitų (WBC) – kiekio bei kitų jų parametrų pokyčius.

Dabar, praėjus daugiau nei 100 metų nuo pirmųjų bandymų automatizuoti ląstelių skaičiavimą, sparčiai besiplečiantis kliniškai reikšmingų BHT analizių spektras reikalauja atitinkamos medicininio personalo ekspertizės [3]. Kelių JAV, Afrikos ir Pakistano autorių duomenimis, 80–90 % gydytojų mano, kad kliniškai reikšmingi yra tik 3–4 BHT rodikliai (hemoglobino koncentracija (HGB), hematokritas (HCT), absoliutus leukocitų kiekis (WBC#), absoliutus trombocitų kiekis (PLT#)). Ženkliai mažesnė dalis nurodė, kad klinikinėje praktikoje naudingi likę rodikliai. Taip pat buvo pastebėtas didesnis pasitikėjimas procentinėmis nei absoliučiomis leukogramos vertėmis [4–6]. Leukograma – tai BHT rezultatuose pateikiama leukocitų diferenciacija, kurią sudaro absoliučios (#) ir procentinės (%) leukocitų rūšių kiekio vertės: neutrofilų (NEU), limfocitų (LYM), monocitų (MON), eozinofilų (EOS) ir bazofilų (BAS), tačiau leukogramos sudėtis gali varijuoti.

Autorių nuomone, Lietuvoje trūksta edukacinių ir orientacinių publikacijų, galinčių padėti įvairaus profesinio lygio medicinos srities atstovams išnaudoti visas diagnostines BHT galimybes. Dėl šios priežasties parengta serija straipsnių, apžvelgiančių WBC ir leukogramos pamatinių biologinių verčių intervalų nuokrypius ir jų reikšmę pasirenkant teisingą diagnostikos kryptį iš plačios diferencinės kiekybinių leukocitų rodiklių pokyčių gamos. Kiekviename straipsnyje pateikiama nagrinėjamo rodiklio suteikiama informacija ir jos reikšmė diferencinei ligų diagnostikai.

Šio, įvadinio, darbo tikslas – apžvelgti pagrindinių leukocitų tyrimo metodų principus, jų rezultatų klinikinį panaudojimą ir bendro leukocitų kiekio pokyčių diferencinę diagnostiką.

2. LEUKOCITŲ TYRIMAI

2.1. Nespecializuoti kraujo ląstelių tyrimai

2.1.1. Bendrasis hematologinis tyrimas

BHT suteikia kiekybinę informaciją apie paciento kraujo ląstelių sudėtį. Šiame skyriuje pateikiami pavyzdžiai, aktualesi leukocitų kiekio matavimui, tačiau, siekiant iliustruoti tam tikrus mechanizmus, pasitelkiami pavyzdžiai ir iš kitų kraujo ląstelių matavimo.

BHT yra atliekamas hematologiniu analizatoriumi (HA). Paciento veninis ar kapiliarinis kraujas paimamas į vakuuminį mėgintuvėlį, jame sumaišomas su antikoagulantu (vandenyje tirpiomis etilendiamintetraacto rūgšties (EDTA), heparino ar citrato druskomis) ir pateikiamas analizatoriui, kuriame mėginys praskiedžiamas izotoniniu elektrolitų tirpalu ir gerai sumaišomas [7]. Taip ląstelės tolygiai paskirstomos visame suspensijos tūryje ir pasiekiamas standartinis skiedimo koeficientas, reikalingas tiksliai ir pakartojamam jų skaičiavimui [8].

Tiriamas mėginys paskirstomas į mažiausiai du tyrimo kanalus, kurių vienas skirtas RBC ir PLT vertinti, o kitas – WBC ir HGB nustatyti (šiam kanale specialiu reagentu atliekama eritrocitų lizė, kad būtų įmanoma suskaičiuoti leukocitus). Tyrimo kanalų skaičius priklauso nuo HA techninio pajėgumo: kai kuriuose gali būti įrengti atskiri kanalai leukogramai, tam tikriems trombocitų parametrų, atskirai BAS, HGB nustatyti.

Su tyrimo kanalais glaudžiai susiję ir atskiri HA ląstelių parametrų matavimo metodai. Ląsteles matuojant šviesos sklaidos ir ląstelių fluorescencijos intensyvumo metodais, HA programinė įranga ląstelių populiacijas pateikia taškinėse diagramose – citogramose (angl. *Scattergram / Dot Plot*). Citogramų skaičius sutampa su analizatoriuje įrengtais „fiziniais“ tyrimo kanalais (pvz. DIFF, WBC / BAS, peroksidazės kanalas). Ląstelių, skaičiuojamų pagal elektrinę varžą, pasiskirstymas pateikiamas ląstelių tūrio histogramoje (angl.

Blood Cell Histogram). Joje HA paskirsto tą pačią ląstelių rūšį į smulkesnius tūrio intervalus, kurie gali būti laikomi „statistiniais“ kanalais ir atvaizduojami histogramoje. Toks skirstymas naudojamas eritrocitų pasiskirstymo kreivei nubrėžti pagal vidutinį eritrocitų tūrį (MCV) ir iš jos išvesti eritrocitų pasiskirstymo plotį (RDW).

Fiziniuose tyrimo kanaluose praskiestas kraujo mėginys leidžiamas žemo slėgio skysto nešiklio (angl. *Sheath Fluid*) srovėje, tekančioje stikline ar plastikine kiuvete. Dėl šių skysčių tankio ir leidimo greičio skirtumų sukuriamama laminarinė srovė. Kiuvetei siaurėjant, srovės viduryje keliaujančios ląstelės įgyja didžiausią tekėjimo greitį, todėl aplenkia šonuose išsidėsčiusias lėčiau judančias ląsteles ir siauriausioje kiuvetės vietoje išsirikiuoja vorele [9]. Tai vadinama hidrodinaminiu fokusavimu – šis principas sudaro sąlygas ląstelėms po vieną pratekėti pro HA detekcines

sistemas, labai patikslindamas ląstelių parametrų matavimą [10].

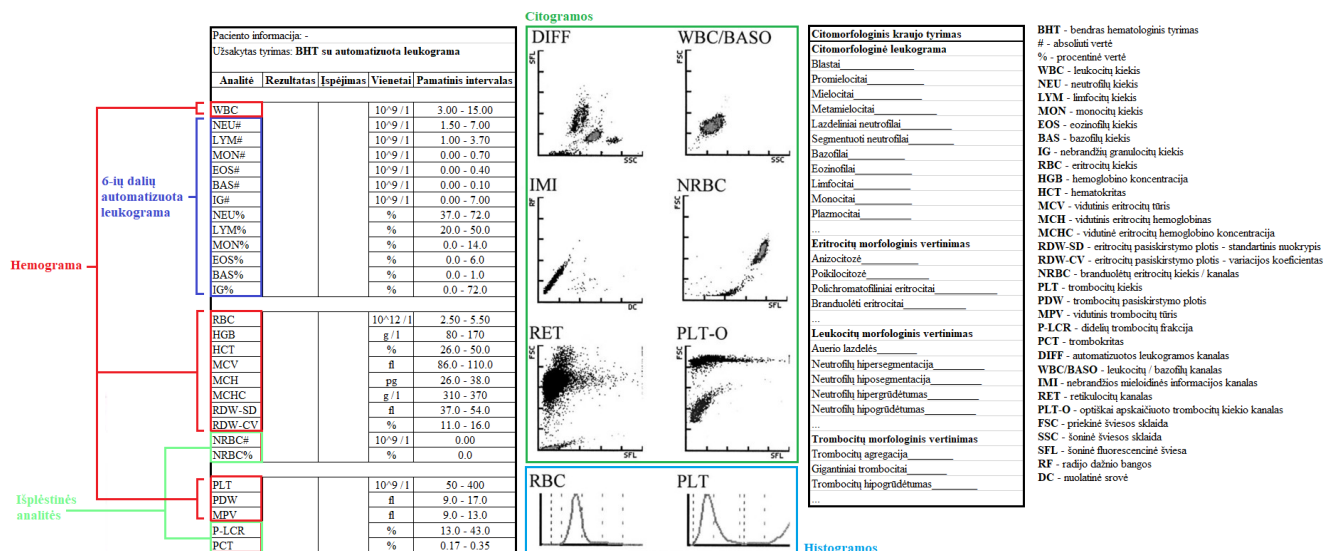
Išmatavęs ir suskaičiavęs visas įsiurbto mėginio ląsteles, HA apdoroja duomenis įdiegta programine įranga ir pateikia BHT rezultatą. Standartiškai Lietuvoje jis susideda iš hemogramos (WBC, RBC, PLT ir tam tikri jų parametrai), leukogramos (NEU, MON, LYM, BAS, EOS) ir išplėstinės analičių (didelė įvairovė), tačiau BHT gali sudaryti tik hemogramą (1 lentelė). Leukograma skirstoma į automatizuotą (vertinama HA) (angl. *Automated Leukocyte Differential*) ir citomorfologinę (vertinama atliekant citomorfologinį kraujo tyrimą (CKT)) (angl. *Manual Leukocyte Differential*). Pagal analičių kiekį leukograma gali būti mažiau kaip 5-ių dalių bei 5-ių ir daugiau dalių. Leukogramos analičių kiekis priklauso nuo HA technologinio pajėgumo, taikomų ląstelių skaičiavimo metodų. Šiame straipsnyje autoriai, rašydami trumpinį BHT, visada turi omenyje BHT su automatizuota leukograma.

1 lentelė. Bendrojo hematologinio tyrimo dalys
Table 1. Components of the Complete Blood Count

Hemograma	Leukograma	Išplėstinės analitės
Leukocitai (WBC)	Neutrofilai (NEU)	Monocitų pasiskirstymo plotis (MDW)
Eritrocitai (RBC)	Monocitai (MON)	Granulocitai (GRAN)
Hematokritas (HCT)	Limfocitai (LYM)	Nebrandūs granulocitai (IG)
Hemoglobinas (HGB)	Bazofilai (BAS)	Branduolėti eritrocitai (NRBC)
Vidutinis eritrocitų tūris (MCV)	Eozinofilai (EOS)	...
Vidutinis hemoglobino kiekis eritrocite (MCH)		
Vidutinė eritrocitų hemoglobino koncentracija (MCHC)		
Eritrocitų pasiskirstymo plotis – variacijos koeficientas (RDW-CV)		
Eritrocitų pasiskirstymo plotis – standartinis nuokrypis (RDW-SD)		
Trombocitai (PLT)		
Trombocitų vidutinis tūris (MPV)		
Trombocitų pasiskirstymo plotis (PDW)		

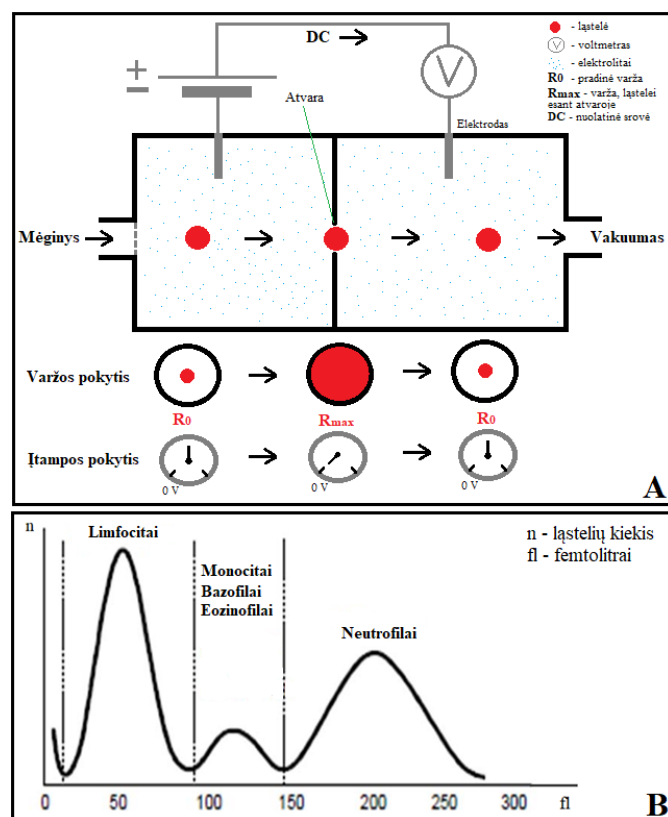
Prie visų BHT parametrų pateikiamas kiekvieno patininis biologinių verčių intervalas. Taip pat pateikiamos kraujo ląstelių citogramos ir kraujo ląstelių tūrio

histogramos. Jei BHT rezultato peržiūrai atliekamas ir CKT, tame pačiame rezultatų protokole prirašomi ir jo duomenys (1 pav.).



2.1.1.1. Hematologinio analizatoriaus ląstelių parametrų nustatymo metodai

Ląstelių skaičiavimas pagal elektrinę varžą (s. Kulte-rio (Wallace H. Coulter) metodas, angl. *Impedance-based Cell Counting*). Kraujo mėginys įpilamas į dviejų indų, pripildytų elektrolitų tirpalo ir susisiekančių per siaurą atvarą (angl. *Aperture*), sistemą. Viename indų sukuriamas vakuumas, susidaro slėgių skirtumas, kuris varo elektrolitų tirpalo praskiestą kraujo mėginį per atvarą. Abipus atvaros į šiuos indus įmerkiami elektrodai, kuriais teka nuolatinė elektros srovė (DC). Prie elektrodų prijungtas voltmetras sistemos įtampos pokyčiams matuoti (2 pav., A). Ląstelių elektrinis laidumas yra labai mažas [11], todėl kiekviena ląstelė eidama pro siaurą atvarą sukelia pulsinį tirpalo elektrinės varžos padidėjimą, kuris voltmetru išmatuojamas kaip tirpalo įtampos kritimas. Taigi, kiekvienas įtampos sumažėjimas HA programinės įrangos užfiksuojamas kaip viena pro atvarą praėjusi ląstelė – tai leidžia nustatyti ląstelių kiekį mėginyje. Tirpalo įtampos kritimo amplitudė yra proporcinga ląstelės dydžiui (kuo ląstelė didesnė, tuo didesnė ir jos elektrinė varža), taigi HA programinė įranga įtampos kritimo amplitudę proporcingai perskaičiuoja į ląstelės tūrį. Pavieniai ląstelių pulsai pagal tūrį surūšiuojami į ląstelių tūrio histogramą (2 pav., B). Elektrinės varžos metodas, grindžiamas leukocitų rūšiavimu pagal tūrį, leidžia HA sudaryti trijų dalių leukogramą (3 ląstelių pikai tūrio histogramoje).

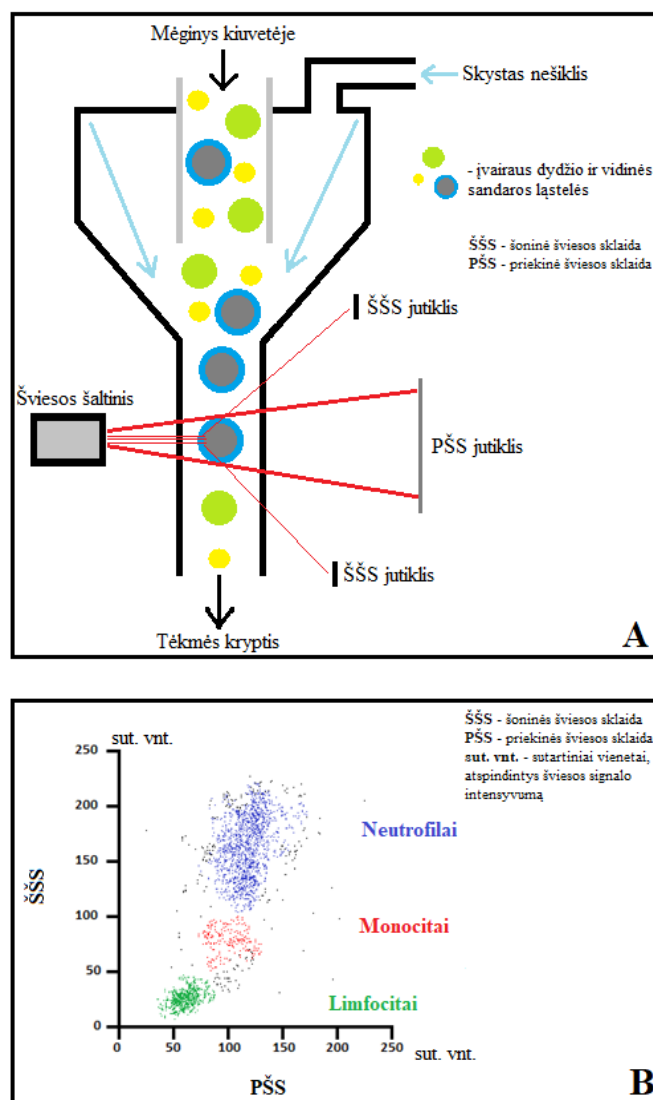


2 pav. Ląstelių skaičiavimo pagal elektrinę varžą principas (A) ir leukocitų tūrio histograma (B)

Fig. 2. Electrical impedance cell counting principle (A) and leukocyte volume histogram (B)

Ląstelių skaičiavimas pagal šviesos sklaidą (s. optinis metodas, angl. *Light Scatter-based Cell Counting* (s. *Optical Principle*). Kiuvete tekantis kraujo ląstelių mėginys hidrodinamiškai fokusuojamas ir apšviečiamas monochromine lazerio ar tungsteno halogeninės lempos (naudojamos nukleorūgščių citometruose) šviesa [12], kurią ląstelės ir jų vidinės struktūros išsklaido skirtingais kampais. Neišsklaidyti šviesos spinduliai apšviečia priekinės šviesos sklaidos (PŠS), o išsklaidyti – šoninės šviesos sklaidos (ŠŠS) jutiklius (3 pav., A).

PŠS jutikliai teikia informaciją apie ląstelių dydį ir kiekį, o ŠŠS jutikliai – apie ląstelių vidaus sandarą (branduolio formą ir grūdėtumą). Rezultatai pateikiami šviesos sklaidos citogramoje (angl. *Light Scattergram*) (3 pav., B), kurioje kiekvienas taškas atitinka nuskaitytą mėginio ląstelę. Šis metodas leidžia sudaryti 5-į ir daugiau dalių leukogramas, kadangi ląstelių vidinės struktūros vertinimas suteikia daugiau informacijos, nei vien tik ląstelės tūrio vertinimas Kulterio metodu.

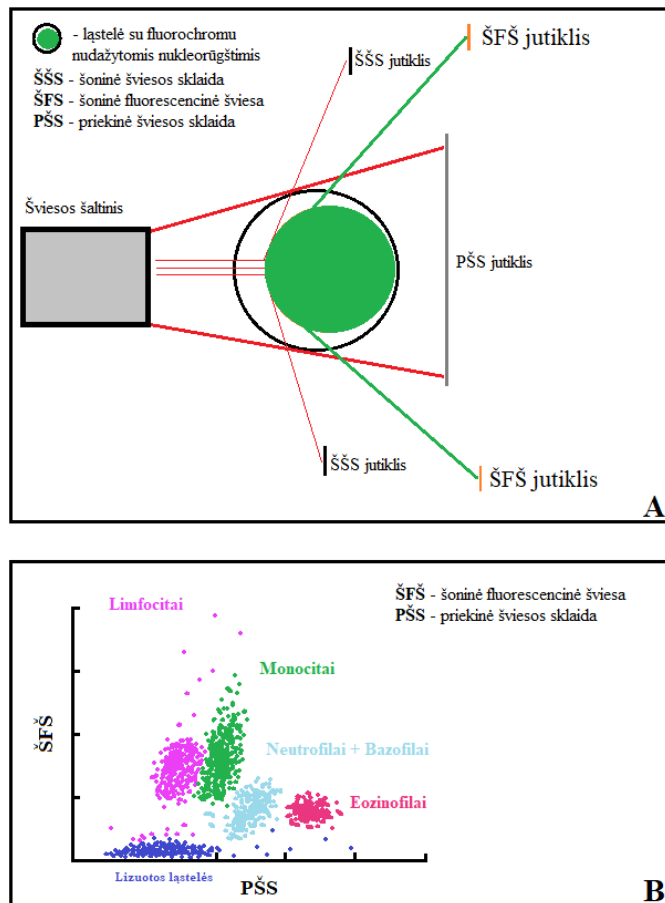


3 pav. Ląstelių skaičiavimo pagal šviesos sklaidą principas (A) ir šviesos sklaidos citograma (B)

Fig. 3. Light scatter cell counting principle (A) and light scattergram (B)

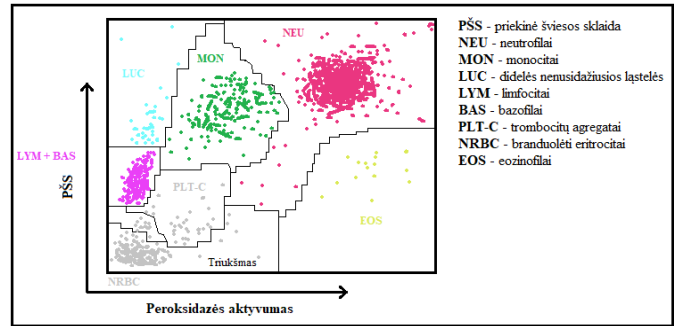
Ląstelių dažymas ir fluorescencija. Naujausios kartos HA galimas optinių metodų derinimas su ląstelių struktūrų dažymu specialiais dažais. Derinimas gali būti įvairus pagal analizatoriaus gamintojo pasirinktą technologiją: naudojami fluorescuojantys dažai (fluorochromai) [13] arba citocheminiai dažai, palengvinantys tam tikrų vidinių ląstelių struktūrų optinę detekciją [14].

Fluorescencinės tėkmės citometrijos (FTC) principas taikomas nudažant ląstelių struktūras fluorochromais tiesiogiai arba per konjuguotus monokloninius antikūnus. Monochrominio lazerio šviesos fotonų sužadintas fluorochromas išspinduliuoja ilgesnę nei sugertą paties lazerio šviesos bangą, o ją užfiksuoja analizatoriuose įrengti atskiri šoninės fluorescencinės šviesos (ŠFS) jutikliai [15] (4 pav.). Fluorochromais tiesiogiai dažomi retikulocitai ir branduolėti eritrocitai (jų nukleorūgštys gali būti dažomos propidžio jodidu), monokloniniais antikūnais – įvairios kraujo ląstelės.



4 pav. Fluorescencinės tėkmės citometrijos principas (A) ir FTC citograma (B)
Fig. 4. Fluorescence flow cytometry principle (A) and FFC scattergram (B)

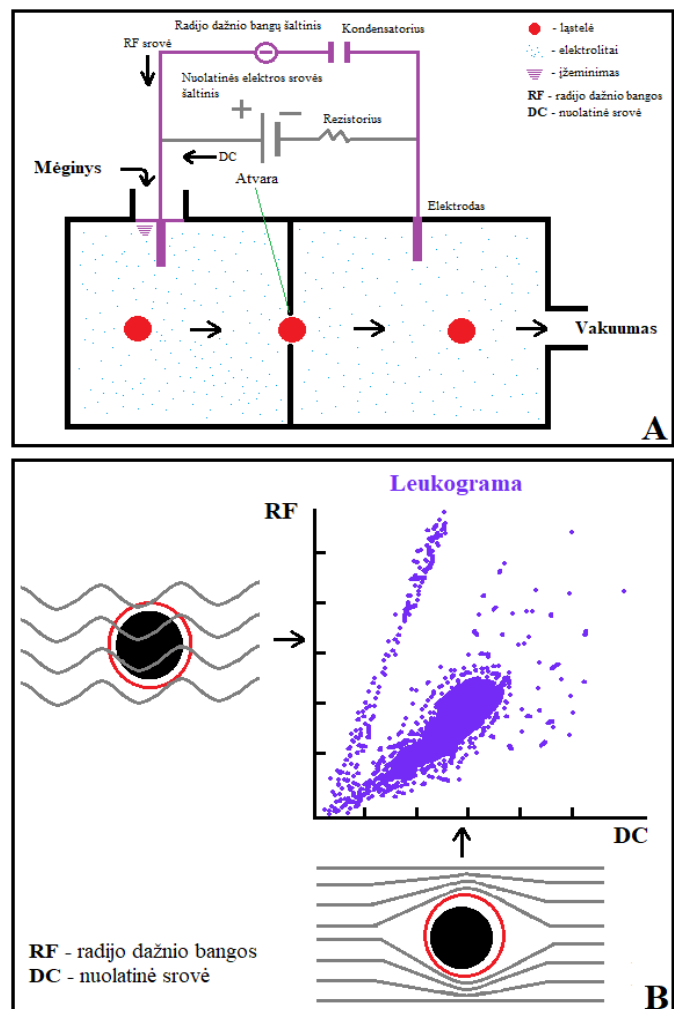
Citocheminis dažymas ląstelių vidines struktūras išryškina naudojant ląstelių fermentus. Pavyzdžiui, mieloperoxidazė (mieloidinės kilmės ląstelių fermentas) reaguoja su į ląstelę patekusia dažo pirmtakine molekule ir susidaro tam tikros spalvos produktas. Leukocitai diferencijuojami pagal šio produkto optinį aktyvumą ir PSS [16]. Rezultatai taip pat vaizduojami šviesos sklaidos citogramoje (5 pav.).



5 pav. Citocheminio dažymo derinimas su šviesos sklaida
Fig. 5. Cytochemical staining combined with light scatter

Ląstelių dažymą derinant su optiniais metodais galima išgauti net 7-ių dalių leukogramą, į kurią, be penkių leukocitų rūšių, gali įeiti nebrandūs granulocitai, atipiniai limfocitai, blastai [17].

Ląstelių skaičiavimas pagal radio bangų sklaidą (angl. *Radiofrequency-based Cell Counting*). Iš esmės tai yra Kulterio metodas, papildytas aukšto dažnio elektromagnetinėmis bangomis – radio bangomis (RF). RF bangos prasiskverbia į ląstelės vidų ir išsisklaido atsimušdamos į ląstelių vidines struktūras. Išsklaidytų bangų spinduliuotę užfiksuoja radio dažnio jutikliai (6 pav., A).



6 pav. Ląstelių skaičiavimas taikant radio bangų metodą (A) ir radio dažnio bangų sklaidos citograma (B)
Fig. 6. Radiofrequency cell counting principle (A) and RF scattergram (B)

Kartu su RF naudojama ir DC – tai leidžia nustatyti ląstelių kiekį ir jas surūšiuoti tiek pagal tūrį, tiek vidinę struktūrą. Rezultatai užrašomi radijo dažnio bangų sklaidos citogramoje (angl. *RF Scattergram*) (6 pav., B). Kaip ir šviesos sklaida, RF bangos suteikia pakankamai informacijos penkių ir daugiau dalių leukogramai sudaryti.

Tam tikri HA ląstelių skaičiavimui naudoja elektrinės varžos, šviesos sklaidos ir radijo dažnio bangų technologijas vienu metu – tai vadinama 3-D tūrio, laidumo ir sklaidos technologija (3-D TLS). 3-D TLS technologija pateikia trimatę citogramą, užtikrindama didesnę tyrimo jautrumą ir specifiškumą [18].

2.1.1.2. Bendrojo hematologinio tyrimo artefaktai

Nors HA geba greitai ir dažniausiai teisingai nustatyti ląstelių kiekybinius ir kokybinius parametrus, visgi dėl įvairių tyrimo preanalizės ir analizės etapų veiksnių BHT rezultatų skaitinės vertės gali būti klaidinančios. Čia aptarsime su leukocitų skaičiavimu susijusius bei dažniausiai pasitaikančius BHT artefaktus.

BHT klaidos gali būti klasifikuojamos įvairiai, tačiau kliniškai svarbiausios yra dvi grupės: su tyrimo technika susiję artefaktai ir su kraujo mėginio sudėtimi susiję artefaktai.

2.1.1.2.1. Su tyrimo technika susiję artefaktai

Pseudotrombocitopenija (PTP) – tai vienas kliniškai svarbiausių BHT artefaktų. PTP gali atsirasti dėl nepakankamo mėginio sumaišymo su antikoagulantu arba ji gali būti sukelta paties mėgintuvėlyje esančio antikoagulianto, dažniausiai EDTA. Manoma, kad EDTA pakeičia trombocitų receptorių konformaciją ir atveria kriptotigenus, prie kurių prisijungia plazmoje cirkuliuojantys autoantikūnai, o prie jų – kiti trombocitai (agliutinacija) [19, 20]. *In vitro* trombocitai taip pat aplimpa leukocitus per šių antikūnų Fc fragmentą. Tokia trombocitų adhezija prie leukocitų vadinama trombocitų satelitizmu. BHT fiksuojama trombocitopenija (trombocitų agregatai neatitinka PLT kanalo kriterijų), taip pat gali būti leukopenija (leukocitai neatitinka WBC kanalo kriterijų dėl satelitizmo) ar leukocitozė (pakankamai dideli trombocitų agregatai imituoja leukocitus ir patenka į WBC kanalą) [20, 21]. PTP ir satelitizmą galima nustatyti CKT, kuriame matomi akivaizdūs trombocitų agregatai, trombocitais aplipę leukocitai [22].

Jatrogeninė hemodilucija – dėl intraveninių infuzijų skyrimo pacientams, kuriems yra didelė kraujavimo rizika operacijų metu, nesilaikant kraujo paėmimo iš intraveninių kateterių rekomendacijų, BHT atsakyme gali būti nustatomas hemoglobino koncentracijos sumažėjimas, kuris ne visada reiškia anemiją [23].

Netinkamas mėginio laikymas – netinkama mėginio laikymo temperatūra ir trukmė gali iškreipti BHT rodiklius. Jei mėginys laikomas per šaltai ar per šiltai – gali įvykti šalčio ar šilumos imunoglobulinų sukelta agliutinacija. Kambario temperatūroje ilgai laikomas mėginys dėl ląstelių membranos laidumo pokyčių taip pat generuos netikslius BHT

rezultatus. Labiausiai pakinta eritrocitų parametrai: MCV ir nuo jo priklausomi HCT bei MCHC. Taip pat gali sumažėti RBC dėl per laiką vykstančios hemolizės. Leukocitų pokyčiai pastebimi jau po dviejų dienų – santykinai sumažėja MON, padaugėja LYM. EOS pokyčiai aprašomi įvairiai, po keturių dienų gali būti matoma leukocitozė. Tikslus pokyčių mechanizmas nėra žinomas. Manoma, kad netinkamomis sąlygomis laikomos ląstelės ilgainiui degeneruoja, pasikeičia jų savybės ir tada jos HA užfiksuojamos joms neskirtuose tyrimo kanaluose. Tinkama laikymo trukmė ypač aktuali transportuojant kraujo mėginius. Patikimiems rezultatams gauti rekomenduojama kraujo mėginį BHT tyrimui laikyti kambario temperatūroje ne ilgiau kaip 6 val., o 4 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 24 val. [24, 25].

Žmogiškojo veiksnio klaidos – tiriamam pacientui klaidingi rezultatai nustatomi, jeigu supainiojamas mėginys ir ištiriamas kito paciento kraujas.

Instrumento netikslumai – neprižiūrėtas ar netinkamai sukalibruotas hematologinis analizatorius gali pateikti įvairaus pobūdžio klaidingus duomenis.

2.1.1.2.2. Su kraujo mėginio sudėtimi susiję artefaktai

Hiperlipidemija – didelė triacilglicerolių koncentracija kraujyje didina eritrocitų rodiklių reikšmes: HGB, MCH ir MCHC. Lipidai sudrumsčia kraują, todėl sutrinka spektrofotometrinis HGB matavimas bei iš jo išvedami MCH bei MCHC [26]. Artefaktui patikslinti naudingas CKT – atmesti pjautuvo formos ląsteles, sferocitozę, akantocitozę, gali būti matomi riebalų lašeliai, neryškūs eritrocitai, pažeisti leukocitai („ląstelės be sienelės“). Nustačius, kad analizę sutrikdė lipidai, mėginys gali būti peranalizuojamas jį nucentrifugavus ir kraujo plazmą pakeitus izotoniiniu tirpalu, nepažeidžiant leukocitų ir trombocitų sluoksnio (angl. *Buffy Coat*) [27].

Hemolizė – labiausiai paveikia raudono kraujo rodiklius: *in vitro* hemolizės atveju sumažėja RBC ir kartu HCT, bet padidėja MCH ir MCHC, o *in vivo* hemolizės atveju padidėja tik MCH ir MCHC. Taip pat gali būti klaidingai nustatoma trombocitozė, nes lizavusių eritrocitų atplaišos patenka į hematologinio analizatoriaus PLT kanalą. Rodiklių pokyčiai priklauso nuo hemolizės laipsnio – *in vitro* hemolizė paveikia daugiau eritrocitų, nei *in vivo*, todėl BHT rezultatų pokyčiai yra didesni [28]. Geras būdas įvertinti hemolizę – išmatuoti hemoglobino koncentraciją mėginio plazmoje.

Ląstelių agliutinacija – gali paveikti tiek eritrocitų, tiek leukocitų, tiek trombocitų parametrus, priklauso nuo agliutinino. Eritrocitų agliutininiai – šalčio IgM klasės antikūnai, dėl kurių eritrocitai sulimpa ir klaidingai sumažėja RBC, HCT, bet padidėja MCV, MCH ir MCHC [28]. Eritrocitų agliutinatuose gali įstrigti leukocitai – dėl to gali būti klaidingai nustatoma leukopenija. Leukocitų agliutinacija įvyksta nedažnai, ji susijusi su PTP ir trombocitų satelitizmu. Manoma, kad ji taip pat sukelia šalčio IgM antikūnų bei nustatyta sąsaja su EDTA [29]. Dėl agliutinacijos sumažėja WBC, dažniausiai granulocitų ir limfocitų sąskaita. Trombocitų

agliutinacija gali įvykti dėl EDTA ir trombocitų GPIIb/IIIa receptoriaus sąveikos, kuri leidžia prie šio receptoriaus prisijungti IgG, IgA ar IgM antikūnams ir sukelti PTP [30]. Šio tipo artefaktus galima matyti CKT – nustatomi atitinkamų ląstelių agliutinatai.

Hiperbilirubinemija – jei bilirubino koncentracija kraujyje viršija 425–600 $\mu\text{mol/l}$, sutrikdomas HGB spektrofotometrinis matavimas dėl panašių hemoglobino ir bilirubino šviesos sugerties savybių [31]. Todėl klaidingai padidėja HGB, MCH ir MCHC parametrai.

Proteinemijos – padidėjęs baltymų kiekis dėl hiperproteinemijos, paraproteinemijos trikdo spektrofotometrinių HGB matavimą dėl šių baltymų nuosėdų susidarymo, veikiant kraujo mėginio lizę sukeliančiais ir kitais reagentais [32]. Krioproteinemijos atveju susidarę krioglobulinai ar kriofibrinogenas kristalizuojasi laikant mėginį žemesnėje nei 37 °C temperatūroje ir gali klaidingai padidinti WBC, PLT rodiklius. Amorfiški, kristalų ar apvalios formos precipitatai gali būti matomi atlikus CKT [33].

Hiperglikemija – jei gliukozės koncentracija kraujyje

$\geq 33 \text{ mmol/l}$, gali klaidingai padidėti MCV dėl nefermentinio eritrocitų membranos baltymų glikozilimo. Dėl šio proceso išorinėje eritrocitų membranoje sumažėja suminis neigiamas krūvis ir pakinta Cl^- ir Na^+ jonų pusiausvyra abipus membranos – į ląstelę patenka daugiau vandens ir jos tūris padidėja. Be to, pati gliukozė, difundavusi į eritrocitų vidų, pakeičia osmosinį gradientą. Galima pastebėti klaidingai padidėjusius HCT ir RBC, ypač pacientams, sergantiems cukriniu diabetu, dėl hiperinsulinemijos, kadangi insulinas yra eritropoetino stimuliuojamas eritropoezės kofaktorius. Svarbu žinoti, kad MCHC klaidingai sumažėja, o MCH gali arba sumažėti, arba išlikti pamatinių verčių intervale [34].

Atipinės ląstelės – BHT rezultatai gali būti klaidingi dėl pačių kraujo ląstelių ar jų kiekio pokyčių, lemiančių jų rūšiavimą į joms neskirtus kanalus ar dydžio parametrų intervalus. Ne visi BHT rodikliai pakinta vienu metu, tai gali priklausyti nuo pokyčio masto. Svarbesni pokyčiai, sukeliami atipinių ląstelių, pateikiami 2-oje lentelėje [35–38].

2 lentelė. Klaidingi ląstelių parametrų pokyčiai BHT ir juos sukėlusios ląstelės
Table 2. Spurious cell parameter changes in CBC and the causative cells

Klaidingi pokyčiai BHT	Pokyčius sukėlusios ląstelės
RBC ↑	Hiperleukocitozė ($\text{WBC\#} \geq 100,000 / \mu\text{l}$), leukeminių ląstelių fragmentai
HGB, MHC, MCHC ↑	Hiperleukocitozė
WBC ↑	Gigantiniai trombocitai, patologiniai megakariocitai, branduolėti eritrocitai, lizei atsparūs eritrocitai, karcinomatозinės ląstelės, leukeminių ląstelių fragmentai
PLT ↑	Eritrocitų fragmentai (šistocitai), leukeminių ląstelių fragmentai
HCT ↑	Hiperleukocitozė
MCV ↑	Hiperleukocitozė
PLT ↑	Trombocitų satelitizmas, PTP

2.1.1.3. Bendrojo hematologinio tyrimo užsakymas ir įspėjimai

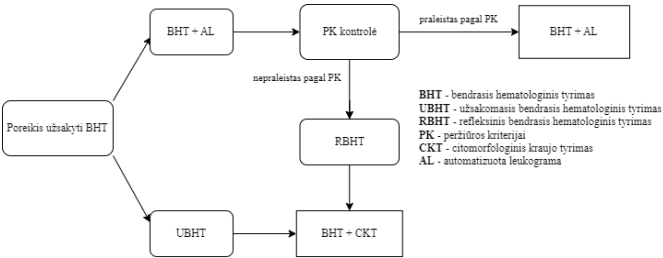
Prieš užsakant BHT svarbu žinoti ėminio paėmimo tvarką, kad būtų galima išvengti ne tik analizinio, bet ir preanalizinio bei poanalizinio etapų klaidų. Kaip ir kiekvienas tyrimas, BHT suteikia tam tikrą apibrėžtą informaciją apie kraujo pokyčius, kuria remiantis galima sudaryti tolesnį paciento ištyrimo planą. Šis tyrimas turi savų apribojimų, todėl, priklausomai nuo ligos, dažnai pasitelkiami jį patikslinantys rankiniai tyrimai (CKT) bei gydytojo hematologo skiriami tyrimai (kaulų čiulpų biopsija, tėkmės citometrija, molekulinės genetikos, biocheminiai tyrimai).

Norėdamas bendrojo hematologinio tyrimo rezultato, gydytojas turi dvi galimybes – užsakyti BHT (angl. *CBC*) arba užsakomąjį BHT (UBHT, angl. *CBC ordered*).

BHT metu paciento kraujyje HA gali aptikti pokyčių. Tokiu atveju BHT rezultatuose pateikiami įspėjimai (angl. *Flags* / *Suspect Flags*). Jie gali būti kiekybiniai (s. parametrų interpretacija (angl. *Quantitative Flags*)) – kai paciento kraujo parametrų kiekybinės vertės išeina už pamatinio intervalo ribų, ir kokybiniai (angl. *Qualitative Flags*) – kai pačios paciento

kraujo ląstelės yra pakitusios (pvz. nebrandžios ar piktybinės). Paciento BHT esančius įspėjimus HA programinė įranga analizuoja laboratorijoje pagal įdiegtus peržiūros kriterijus (PK, angl. *Review Criteria*). Kiekybinio įspėjimo vertei nukrypęs nuo PK nustatytų kiekybinių intervalų ribų (jos yra platesnės už pamatinių intervalų ribas), ir / ar esant kokybiniais įspėjimams, laboratorijoje inicijuojamas refleksinis BHT (RBHT, angl. *Reflex CBC*) – papildomai atliekamas CKT (citomorfologinė leukograma ir morfologinis eritrocitų, trombocitų bei leukocitų vertinimas). Jei kiekybinių įspėjimų vertės nenukrypsta nuo PK nustatytų kiekybinių intervalų ribų ir nėra kokybinių įspėjimų, CKT neatliekamas ir gydytojui atiduodami tik automatizuoti BHT rezultatai su automatizuota leukograma kartu su kiekybiniais įspėjimais (jei jie yra ir neviršija PK nustatytų kiekybinių intervalų ribų).

Jei gydytojas iš klinikinių duomenų ar kitų tyrimų iš anksto įtaria galimus kokybinius kraujo pokyčius (pvz. limfadenopatiją, hepatosplenomegaliją, karščiavimą...), gali iš karto užsakyti UBHT (BHT su CKT). Šiuo atveju laboratorijoje nesivadovaujama PK ir pateikiamas BHT su citomorfologine leukograma ir morfologiniu eritrocitų, trombocitų bei leukocitų vertinimu (7 pav.).



7 pav. Bendrojo hematologinio tyrimo užsakymo būdai
Fig. 7. Options of ordering a complete blood count

2005 m. Tarptautinė laboratorinės hematologijos asociacija (angl. *International Society for Laboratory Hematology*) pateikė apibendrintus BHT peržiūros kriterijus, siūlomus taikyti

kiekvienoje laboratorijoje [39]. Dėl laboratorijose naudojamų metodikų skirtumų, regionų geopopuliacinių ypatumų, skirtingos epidemiologinės situacijos peržiūros kriterijai turi būti nuolat atnaujinami, papildomi ir individualizuojami kiekvieniui laboratorijai kartu su patologijos, klinikos ir hematologijos sričių specialistais [40, 41].

2.1.1.4. Naujieji hematologinio analizatoriaus leukocitų parametrai

Didėjant hematologinių analizatorių technologiniam pajėgumui, šiuo metu į klinikinę praktiką įtraukiami nauji ląstelių parametrai, apibūrinantys vis daugiau kiekybinių bei kokybinių ląstelių savybių. Nauji leukocitų parametrai gali padėti nustatyti atskirų leukocitų rūšių savybes (3 lentelė) [42–46].

3 lentelė. Naujieji leukocitų parametrai pagal rūšį
Table 3. New leukocyte parameters by leukocyte type

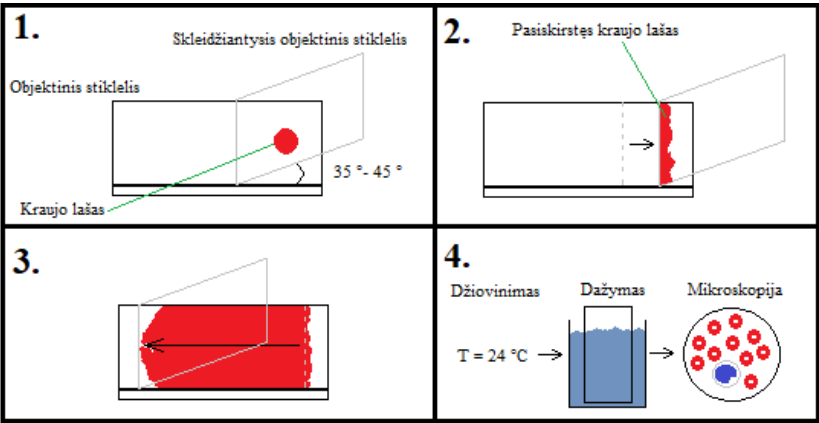
Leukocitų rūšis	Naujieji parametrai
Monocitai	Monocitų pasiskirstymo plotis (MDW)
Granulocitai	Nebrandūs granulocitai (IG), nebrandi žema granulometrija (IML), nebrandi vidutinė granulometrija (IMM), neutrofilų reaktyvumo intensyvumas pagal nukleorūgščių fluorescenciją (NEUT-RI), neutrofilų grūdėtumo intensyvumas pagal šviesos sklaidą (NEUT-GI), neutrofilų ir limfocitų santykis (NLR)
Limfocitai	Antikūnus sintetinantys limfocitai (AS-LYMP), reakciniai limfocitai (RE-LYMP), atipiniai limfocitai (ALY), neutrofilų ir limfocitų santykis (NLR)
Blastai ir kitos ląstelės	Didelės nebrandžios ląstelės (LIC), didelės nenusidažiusios ląstelės (LUC), hemopoezės pirmtakai (HPC)

Kai kurie parametrai jau aktyviai taikomi klinikinėje praktikoje, pažangesni analizatoriai BHT rezultatuose pateikia IG, leidžiantį įtarti reakcinį atsaką ankstyvose infekcinės ligos stadijose, sepsį ar mieloidinės kilmės onkologinę ligą [47]. Kitų parametrų klinikinė reikšmė nėra tiksliai apibrėžta, nors šie parametrai aktyviai analizuojami paciento ligos diagnostikos, prognozės, gydymo efektyvumo, recidyvo rizikos predikcijos, mirtingumo vertinimo kontekste. Todėl mokslui žengiant į priekį galima tikėtis standartizuoto šių parametrų taikymo modelio.

2.1.2. Citomorfologinis kraujo tyrimas

Jau ne kartą minėtas citomorfologinis kraujo tyrimas (s. mikroskopinis kraujo tepinėlio tyrimas), anksčiau Lietuvoje neteisingai vadintas „leukograma“ – tai manualinis

kraujo tyrimas, skirtas kokybiniam paciento kraujo pokyčiams įvertinti mikroskopu ir BHT kontrolei pagal PK atlikti. Kraujo tepinėlis paruošiamas ant objekcinio stiklelio periferijoje užlašinus paciento kraujo mėginio lašą. Tada prie lašo prigludžiama kito objekcinio stiklelio arba specialaus skleistuvo briauna, pakreipiama 30–45° kampu. Kraujo lašui pasiskirsčius ant briaunos apatinės pusės, mėginys staigiu rankos judesiu, braukiant link distalinio objekcinio stiklelio galo, paskleidžiamas ant stiklelio paviršiaus. Tepinėlis džiovinamas kambario temperatūroje ir dažomas pagal laboratorijoje nustatytą dažymo procedūrą. Dažniausiai naudojami Romanowsky dažymo būdai, pvz. Romanowsky–Giemsa, May–Grünwald [48]. Po dažymo procedūros tepinėlis išplaunamas vandeniu ir išdžiovinamas kambario temperatūroje. Paruoštas tepinėlis analizuojamas šviesiniu mikroskopu (8 pav.).



8 pav. Kraujo tepinėlio tyrimo paruošimas ir citomorfologinė kraujo analizė
Fig. 8. Preparation of peripheral blood smear and cytological blood analysis

Morfologinės analizės metu vertinamos eritrocitų, leukocitų ir trombocitų kokybinės ir kiekybinės charakteristikos, aprašytos 2015 m. Tarptautinės hematologijos standartizacijos tarybos (angl. *International Council for Standardization in Haematology – ICSH*) morfologinio kraujo tyrimo standartizavimo rekomendacijose [49]. Pagal eritrocitų formą, dydį ir spalvą galima diferencijuoti anemijos rūšį. Kartais specifinių eritrocitų formų aptikimas leidžia įtarti labai konkrečią paciento patologiją, kurios neaptinka HA. Analizuojant leukocitus, įmanoma patikrinti automatizuotą leukogramą perskaiciuojant ją manualiai (citomorfologinė leukograma), taip pat vertinti leukocitų tarpus kaip toksinį neutrofilų grūdėtumą ir kitus kokybinius pokyčius. Trombocitų analizė dažnai leidžia vertinti tepinėlio atlikimo technikos kokybę – matomi trombocitų agregatai, kurie gali sufleruoti, kad tepinėlis paruoštas nekokybiškai ar yra mieloproliferacinė neoplazija. Dėl kokybinės analizės galimybių CKT yra reikalingas klaidingiems ar patologijos atveju pamatinių verčių intervalų peržengiantiems BHT rezultatams vertinti ir tolesnei paciento ištyrimo taktikai planuoti.

2.2. Specializuoti kraujo ląstelių tyrimai

Šie tyrimai skiriami specializuoto gydytojo hematologo, todėl šiame straipsnyje nebus plačiai aprašomi.

2.2.1. Kaulų čiulpų biopsija ar kaulų čiulpų aspiratas (angl. *Bone Marrow Trephine Biopsy / Fine Needle Aspiration*) skirti kaulų čiulpų patologijai nustatyti ir diagnostinėms galimybėms praplėsti, kai nepakanka BHT ir CKT rezultatų, pavyzdžiui, pacientui nustačius persistuojančią neutropeniją ar trombocitopeniją, aplastinei anemijai nustatyti bei kaulų čiulpų transplantacijos indikacijoms vertinti.

2.2.2. Tėkmės citometrija (angl. *Flow Cytometry*) taip pat naudojama kaip atskiras kraujo ląstelių tyrimas, kurio svarbiausia funkcija: greitai ir tiksliai nustatyti ir diferencijuoti leukemijas bei limfoproliferacines neoplazijas pagal piktybinių ląstelių paviršiaus ir vidinius CD žymenis. Tėkmės citometrijos principas taikomas ir HA įrangoje ląsteles skaičiuojant pagal šviesos sklaidą, supravitalaus dažo optinį aktyvumą ar fluorescencijos intensyvumą. Visgi, HA negali būti laikomas tikruoju tėkmės citometru, nes pagrindinis skirtumas tarp šių tyrimų yra tas, kad tėkmės citometrijos tyrime ląstelių skaičiavimui naudojami fluorochromais žymėti antikūnai, specifiskai besijungiantys su tam tikru CD žymeniu. Be to, tėkmės citometruose įdiegta duomenų rinkimo ir analizės programinė įranga leidžia išgauti tikslesnę ir gilesnę informaciją apie ląsteles, negu standartizuotais duomenų analizės algoritmais aprūpinti HA. Tai leidžia tiksliau išrūšiuoti ląstelių populiacijas ne tik pagal jų struktūrą, bet ir žymenų raišką.

2.2.3. Molekulinės genetikos tyrimai (angl. *Molecular Genetic Testing*) ypač svarbūs leukemijų diagnostikai ir prognozei. Tokie metodai kaip blastų kariotipavimas, fluorescencinė *in situ* hibridizacija (FISH), genų (DNR) ir jų transkriptų (RNR) sekoskaita, epigenetinių pokyčių nustatymas leidžia aptikti mutacijas ląstelių genetiniame kode, kurios nurodo būsimą ar patvirtina esamą leukemijos diagnozę. Be to, genetiniai tyrimai plačiai naudojami Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) leukemijų klasifikacijoje [50].

3. LEUKOCITOZĖ IR LEUKOCITOPENIJA

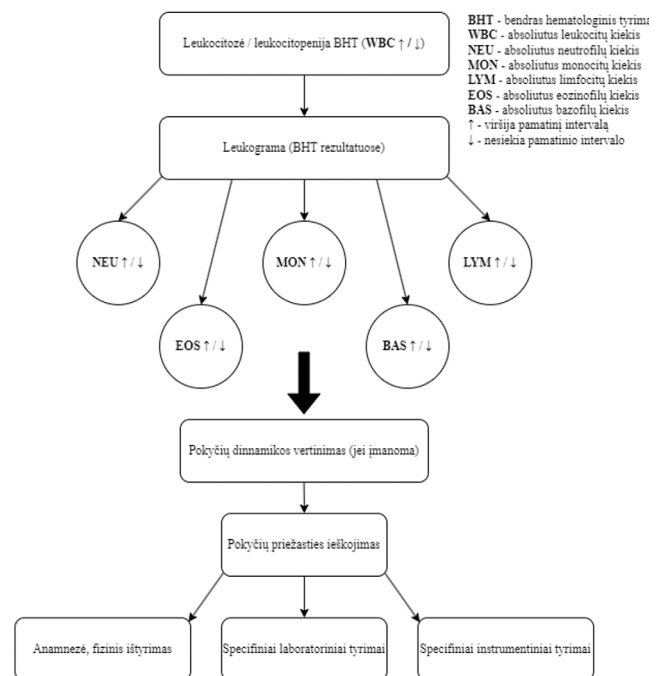
Leukocitozė – pamatinių verčių intervalą viršijanti WBC# reikšmė [47]. Kiekvieno HA pateikiamas pamatinių verčių intervalas skiriasi, suaugusiesiems dažniausiai jo variavimo ribos yra $3,00\text{--}11,00 \times 10^9/\text{l}$ [51, 52]. Leukocitopenija – žemiau pamatinių verčių intervalo esanti WBC# reikšmė [53].

Nustačius leukocitozę ar leukocitopeniją, toliau svarbu vertinti leukogramos pokyčius. WBC gali padidėti dėl NEU, LYM, MON, EOS, BAS padidėjimo ar jų kombinacijos. NEU, LYM, MON padidėjimas dažniausiai įvyksta dėl reakcinių priežasčių (bakterinės, virusinės infekcijos), EOS, BAS padidėjimas dažniausiai būdingas alerginėms ligoms ar lėtiniam uždegimui [54–57]. WBC sumažėjimas taip pat gali būti nulemtas vienos iš leukogramos dalių kiekio sumažėjimo dėl galimų imunodeficitų būklių, kaulų čiulpų funkcijos sutrikimo.

Tolesnei diagnostikai svarbu BHT duomenis derinti su paciento anamneze, fizinio ištyrimo duomenimis bei kitais specifiniais tyrimais. Gydomo efektyvumui ir paciento būklei stebėti svarbu vertinti leukocitų kiekio pokyčių dinamiką (angl. *Trend Evaluation*). Net jei paciento WBC peržengia pamatinių biologinių verčių intervalo ribas, esamas rezultatas turi būti palyginamas su buvusiu (jei buvo atliktas BHT). Pavyzdžiui, jei paciento WBC# yra $13,0 \times 10^9/\text{l}$, tačiau neseniai atlikto BHT WBC# buvo $20,0 \times 10^9/\text{l}$ – tai rodo gerėjančią būklę.

4. IŠVADOS

Tinkamai interpretuojami BHT rezultatai yra naudingas diagnostinis įrankis, galintis pasitarnauti plačiam ligų diagnostikos spektrui. Visos literatūros apžvalgos apibendrinimui autoriai pateikia algoritmą, kuriuo vadovaujantis turėtų prasidėti kiekviena BHT analizė, nustačius leukocitozę ar leukocitopeniją (9 pav.).



9 pav. Leukocitozės / leukocitopenijos diagnostinis algoritmas
Fig. 9. Leukocytosis / leukocytopenia diagnostic algorithm

Pagrindinis gydytojo tikslas yra atskirti, ar leukogramos pokyčiai yra reakciniai, ar patologiniai. Pavyzdžiui, nebūtinai EOS ir BAS padidėjimas visada reiškia alergiją ir nebūtinai LYM padidėjimas – virusinę infekciją. Detalesnė

kiekvieno leukogramos pokyčio apžvalga bus pateikiama kituose serijos straipsniuose.

Gauta: 2023 07 02

Priimta spaudai: 2023 07 02

Summary

INTERPRETATION OF CHANGES IN LEUKOCYTE PARAMETERS IN COMPLETE BLOOD COUNT: LEUKOCYTOSIS AND LEUKOCYTOPENIA

Benas Matuzevičius, Gabrielė Jonauskaitė, Rėda Matuzevičienė

Background. After more than 100 years since the first attempts to automate blood cell counting, the Complete Blood Count with an Automated Leukocyte Differential, abbreviated as CBC w/ auto-DIFF (CBC), remains one of the most commonly ordered tests worldwide. A significant portion of diseases is related to changes in White Blood Cells and the Leukocyte Differential seen in CBC results. By properly assessing these changes, doctors gather a lot of information about further patient examination, treatment strategy, or disease prognosis. In the authors' opinion, there is a lack of orientational and educational information in Lithuania for general practitioners, medical students, and other medical specialists regarding the role of CBC

and other hematological tests in the diagnostic pathway of disease. Therefore, it is necessary to review not only the test results but also the methods by which they are achieved.

Aim of the study. To perform a literature analysis, presenting the main methods of leukocyte testing, the clinical utility of their results, and the differential diagnosis of changes in the total leukocyte count.

Material and methods. A literature search was conducted using free search and several databases: *PubMed*, *ScienceDirect* and *ResearchGate*. The following keywords were used: leukocytes, leukocytosis, complete blood count, hematological analyzers, principles of hematological analyzer operation, leukocytosis algorithm. 57 relevant studies that met the research objectives were selected. Neither a predefined search period nor inclusion protocol were applied to this study.

Conclusions. Despite the increasing amount of new diagnostic methods, CBC remains one of the most clinically significant tests, providing a quick, cost-effective, and informative assessment of a patient's blood. Proper interpretation of CBC results, attention to changes in the leukocyte differential, implementation of Review Criteria and patient referral for specialist consultation constitute the fundamental principles of differential diagnosis of leukocyte changes.

Keywords: blood tests, leukocytosis, leukocytopenia, algorithm, flow cytometry, hematology analyzer

LITERATŪRA

- Jacob EA. Complete Blood Cell Count and Peripheral Blood Film, Its Significant in Laboratory Medicine: A Review Study. 2016; 1(3): 34. Available from: <http://article.sciencepublishinggroup.com/html/10.11648.j.ajlm.20160103.12.html>
- Seo IH, Lee YJ. Usefulness of Complete Blood Count (CBC) to Assess Cardiovascular and Metabolic Diseases in Clinical Settings: A Comprehensive Literature Review. *Biomedicine* 2022; 10(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35447310/>
- Green R, Wachsmann-Hogiu S. Development, History, and Future of Automated Cell Counters. *Clin Lab Med* 2015; 35(1): 1–10.
- Birhaneselassie M, Birhanu A, Gebremedhin A, Tsegaye A. How useful are complete blood count and reticulocyte reports to clinicians in Addis Ababa hospitals, Ethiopia? *BMC Hematol* 2013; 13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24325971/>
- Sandhaus LM, Meyer P. How useful are CBC and reticulocyte reports to clinicians? *Am J Clin Pathol* 2002; 118(5): 787–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12428801/>
- Ahmed MM, Ghauri SK, Javaeed A, Rafique N, Hussain W, Khan N. Trends of utilization of Complete Blood Count parameters for patient management among doctors in Azad Kashmir. *Pak J Med Sci* 2020; 36(5): 999. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3372683/>
- Hollis VS, Holloway JA, Harris S, Spencer D, van Berkel C, Morgan H. Comparison of Venous and Capillary Differential Leukocyte Counts Using a Standard Hematology Analyzer and a Novel Microfluidic Impedance Cytometer. *PloS One* 2012; 7(9): 43702. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23447872/>
- DeNicola DB. Advances in hematology analyzers. *Top Companion Anim Med [Internet]* 2011; 26(2): 52–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21596345/>
- Golden JP, Justin GA, Nasir M, Ligler FS. Hydrodynamic focusing-a versatile tool. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402(1): 325–35. Available from: https://www.researchgate.net/publication/51667500_Hydrodynamic_focusing-a_verseatile_tool
- Shuler ML, Aris R, Tsuchiya HM. Hydrodynamic Focusing and Electronic Cell-Sizing Techniques. *Appl Microbiol* 1972; 24(3): 384. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/376528/>

11. Peters MJ, Stinstra JG, Hendriks M. Estimation of the electrical conductivity of human tissue. *Electromagnetics* 2001; 21(7–8): 545–57. Available from: https://www.researchgate.net/publication/261846497_Estimation_of_the_Electrical_Conductivity_of_Human_Tissue
12. Kim YR, Paseltiner L, Kling G, Chien Kuo Yeh. Subtyping lymphocytes in peripheral blood by direct immunoalkaline phosphatase labeling and light scatter/absorption flow cytometric analysis. *Am J Clin Pathol* 1992; 97(3): 331–7.
13. D'Onofrio G, Kim YR, Schulze S, Lorentz T, Dörner K, Goossens W, et al. Evaluation of the Abbott Cell Dyn 4000 automated fluorescent reticulocyte measurements: comparison with manual, FACScan and Sysmex R1000 methods. *Clin Lab Haematol* 1997; 19(4): 253–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9460566/>
14. Siekmeier R, Bierlich A, Jaroß W. Determination of reticulocytes: three methods compared. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38(3): 245–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10905762/>
15. Fluorescence flow cytometry [Internet]. Available from: <https://www.sysmex.se/academy/knowledge-centre/technologies/fluorescence-flow-cytometry.html>
16. Gleghorn DM, Thomas W. Prevalence of myeloperoxidase deficiency determined using an ADVIA 2120i. *Int J Lab Hematol* 2020 Oct 1; 42(5): e220–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32543762/>
17. Hematology Analyzers Buying Guide [Internet]. Available from: <https://www.linkedin.com/pulse/hematology-analyzers-buying-guide-tracy-s-j-/>
18. COULTER® 3-D VCS TECHNOLOGY [Internet]. Available from: <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto2/6/coulter/ss000125.htm>
19. Narang V, Kaur H, Selhi PK, Sood N, Singh A. Preanalytical Errors in Hematology Laboratory - an Avoidable Incompetence. *Iran J Pathol* 2016; 11(2): 151. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22868803/>
20. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A. Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part I: platelets. *Int J Lab Hematol* 2007; 29(1): 4–20. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2257.2006.00870.x>
21. DL Solanki, Blackburn BC. Spurious leukocytosis and thrombocytopenia. A dual phenomenon caused by clumping of platelets in vitro. *JAMA* 1983; 250(18): 2514–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6632146/>
22. Lardinois B, Favresse J, Chatelain B, Lippi G, Mullier F. Pseudothrombocytopenia—A Review on Causes, Occurrence and Clinical Implications. *J Clin Med* 2021 Feb 2; 10(4): 1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3415523/>
23. Perel A. Iatrogenic hemodilution: A possible cause for avoidable blood transfusions? *Crit Care* 2017; 21(1): 1–3. Available from: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-017-1872-1>
24. Wu D-W, Li Y-M, Wang F. How Long can we Store Blood Samples: A Systematic Review and Meta-Analysis. *EbioMedicine* 2017; 24: 277–85.
25. Gulati GL, Hyland LJ, Kocher W, Schwarting R. Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126(3): 336–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11860310/>
26. Zandecki M, Genevieve F, Gérard J, Godon A. Spurious Counts and Spurious Results on Hematology Analyzers: White Blood Cells, Red Blood Cells, Hemoglobin, Red Cell Indices, and Reticulocytes. *Laboratory Hematology Practice* 2012; 79–95. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781444398595.ch8>
27. Gulati G. Blood cells: morphology & clinical relevance. Jefferson Faculty Books [Internet]. 2015. Available from: <https://jdc.jefferson.edu/jeffersonfacultybooks/92>
28. de Jonge G, dos Santos TL, Cruz BR, Simionatto M, Bitencourt JIM, Krum EA, et al. Interference of in vitro hemolysis complete blood count. *J Clin Lab Anal* 2018; 32(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3017011/>
29. Sultan S, Irfan SM. In Vitro Leukoagglutination: A Rare Hematological Cause of Spurious Leukopenia. *Acta Med Iran* 2017; 55(6): 408–10. Available from: <https://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/article/view/5004>
30. Chae H, Kim M, Lim J, Oh EJ, Kim Y, Han K. Novel method to dissociate platelet clumps in EDTA-dependent pseudothrombocytopenia based on the pathophysiological mechanism. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(8): 1387–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22868803/>
31. Dolci A, Panteghini M. Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? *Clinica Chimica Acta* 2014; 432: 38–43.
32. Piyopirapong S, Wongtiraporn W, Sribhen K. Factitious Results in Clinical Chemistry Tests Caused by Common Endogenous Interferents. *Siriraj Med J* 2010; 62(4): 185–8. Available from: <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/sirirajmedj/article/view/243902>
33. Brouet JC, Clauvel JP, Danon F, Klein M, Seligmann M. Biologic and clinical significance of cryoglobulins. A report of 86 cases. *Am J Med* 1974; 57(5): 775–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4216269/>
34. Alamri BN, Bahabri A, Alderehim AA, Alabduljabbar M, Alsubaie MM, Alnaqeb D, et al. Hyperglycemia effect on red blood cells indices. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23(5): 2139–50.
35. Akwari AM, Ross DW, Stass SA. Spuriously elevated platelet counts due to microspherocytosis. *Am J Clin Pathol* 1982; 77(2): 220–1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7064920/>
36. Booth F, Mead SV. Resistance to lysis of erythrocytes containing haemoglobin C—detected in a differential white cell counting system. *J Clin Pathol* 1983; 36(7): 816–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6863574/>
37. Kakkar N, Garg G. Cytoplasmic fragments of leukaemic cells masquerading as platelets in an automated haematology analyser. *J Clin Pathol* 2005 Feb; 58(2): 224. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15770578/>

38. Garg N, Gupta RJ, Kumar S. Megakaryocytes in Peripheral Blood Smears. *Turk J Hematol* 2019; 36(3): 212. Available from: [/pmc/articles/PMC6682780/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16024331/)
39. Barnes PW, McFadden SL, Machin SJ, Simson E. The international consensus group for hematology review: suggested criteria for action following automated CBC and WBC differential analysis. *Lab Hematol* 2005; 11(2): 83–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16024331/>
40. Comar SR, Malvezzi M, Pasquini R. Are the review criteria for automated complete blood counts of the International Society of Laboratory Hematology suitable for all hematology laboratories? *Rev Bras Hematol Hemoter* 2014; 36(3): 219. Available from: [/pmc/articles/PMC4109747/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16024331/)
41. Gulati G, Song J, Florea AD, Gong J. Purpose and Criteria for Blood Smear Scan, Blood Smear Examination, and Blood Smear Review. *Ann Lab Med* 2013; 33(1): 1. Available from: [/pmc/articles/PMC3535191/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16024331/)
42. Khodaiji S. Newer CBC Parameters of Clinical Significance. *Hematopathology* 2019; 3–25. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-7713-6_1
43. 10 Part Diff – HORIBA [Internet]. Available from: <https://www.horiba.com/pol/medical/academy/technology/10-part-diff/>
44. Piva E, Zuin J, Pelloso M, Tosato F, Fogar P, Plebani M. Monocyte distribution width (MDW) parameter as a sepsis indicator in intensive care units. *Clin Chem Lab Med* 2021; 59(7): 1307–14.
45. Vanker N, Ipp H. Large unstained cells: a potentially valuable parameter in the assessment of immune activation levels in HIV infection. *Acta Haematol* 2014; 131(4): 208–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24296523/>
46. Large Immature Cells | HORIBA Medical Yumizen BIO [Internet]. Available from: <https://www.horiba.com/int/medical/academy/yumizen-bio/large-immature-cells/>
47. Mishra MN, Odyuo B, Webster J. Immature granulocyte percentage in early chronic myeloid leukemia. *J Appl Hematol* 2021; 12(4): 217. Available from: <https://www.jah-journal.org/article.asp?issn=1658-5127;year=2021;volume=12;issue=4;spage=217;epage=219;aulast=Mishra>
48. Adewoyin A, Nwogoh B. Peripheral blood film – a review. *Ann Ib Postgrad Med* 2014; 12(2): 71. Available from: [/pmc/articles/PMC4415389/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25728865/)
49. Palmer L, Briggs C, Mcfadden S, Zini G, Burthem J, Rozenberg G, et al. ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(3): 287–303. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25728865/>
50. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36(7): 1703–19. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-022-01613-1>
51. Riley LK, Rupert J. Evaluation of Patients with Leukocytosis. *Am Fam Physician* 2015; 92(11): 1004–11. Available from: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2015/1201/p1004.html>
52. Bendras kraujo tyrimas – profilaktikai – „Antėja laboratorija“ [Internet]. Available from: <https://anteja.lt/bkv-bendras-kraujo-tyrimas-5-dif>
53. Ing VW. The Etiology and Management of Leukopenia. *Can Fam Physician* 1984; 30: 1835. Available from: [/pmc/articles/PMC2154209/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25728865/)
54. Kobayashi SD, Malachowa N, DeLeo FR. Neutrophils and Bacterial Immune Evasion. *J Innate Immun* 2018; 10(5–6): 432–41. Available from: <https://karger.com/jin/article/10/5-6/432/180346/Neutrophils-and-Bacterial-Immune-Evasion>
55. Lynch DT, Hall J, Foucar K. How I investigate monocytosis. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(2): 107–14. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijlh.12776>
56. Kuang FL. Approach to Patients with Eosinophilia. *Med Clin North Am* 2020; 104(1): 1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31757229/>
57. Ferial J, Depasse F, Geneviève F. How I investigate basophilia in daily practice. *Int J Lab Hematol* 2020; 42(3): 237–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31841278/>